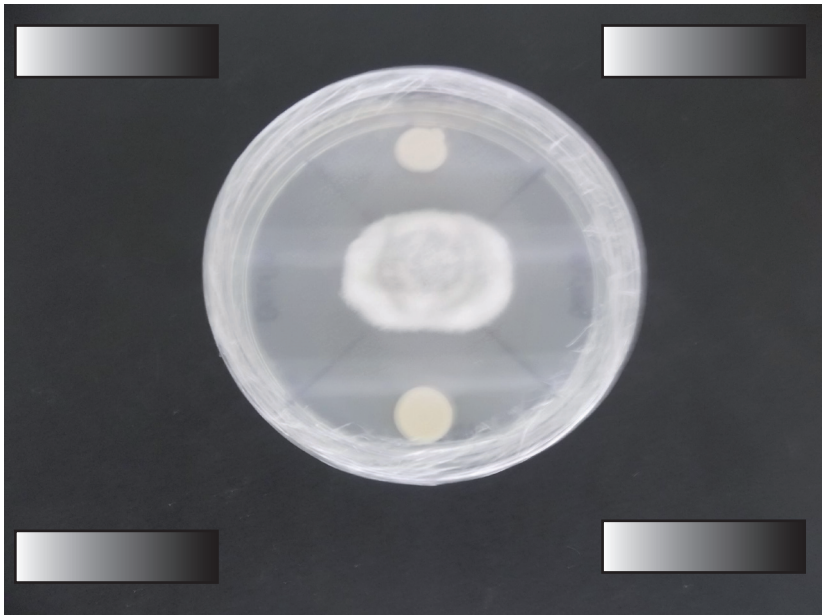


Seleção de Microrganismos Antagonistas para Biocontrole de *Fusarium verticillioides* na Cultura do Milho (*Zea mays* L.)



ISSN 1679-0154
Novembro, 2013

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 75

Seleção de Microrganismos Antagonistas para Biocontrole de *Fusarium verticillioides* na Cultura do Milho (*Zea mays L.*)

Erika Nayara Tomacheski Diniz Alves
Ivanildo Evódio Marriel
Christiane Abreu de Oliveira
Rodrigo Vêras da Costa
Luciano Viana Cota
Dagma Dionísia da Silva
Bianca Braz Mattos
Ana Laura Guimarães Verdolin

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: cnpms.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro,
Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda
de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros.

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: Ana Laura Verdolin

1ª edição

1ª impressão (2013): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Seleção de microrganismos antagonistas para biocontrole de
Fusarium verticillioides na cultura do milho (*Zea mays* L.) /
Érica Nayara Tomacheski Diniz Alves ... [et al.]. – Sete Lagoas :
Embrapa Milho e Sorgo, 2013.
26 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa
Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 75).

1. Controle biológico. 2. Fungo. 3. Doença fungica. I. Alves,
Érica Nayara Tomacheski Diniz. II. Série.

CDD 632.96 (21. ed.)

© Embrapa 2013

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Resultados e Discussão	15
Conclusões	21
Agradecimentos	22
Referências	22

Seleção de Microrganismos Antagonistas para Biocontrole de *Fusarium verticillioides* na Cultura do Milho (*Zea mays* L.)

***Erika Nayara Tomacheski Diniz Alves*¹**

***Ivanildo Evódio Marriel*²**

***Christiane Abreu de Oliveira*³**

***Rodrigo Vêras da Costa*⁴**

***Luciano Viana Cota*⁵**

***Dagma Dionísia da Silva*⁶**

***Bianca Braz Mattos*⁷**

***Ana Laura Guimarães Verdolin*⁸**

Resumo

O objetivo do trabalho foi selecionar e analisar estirpes de bactérias e actinomicetos com potencial antagonista para o biocontrole do *Fusarium verticillioides*, causador de doenças na cultura do milho. O potencial antagonista de 80 isolados, de bactérias e actinomicetos, foi avaliado in vitro por meio do

¹Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária no Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM, Bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, erikatomacheski2008@hotmail.com

²Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Biologia Celular, Pesquisador em Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, ivanildo.marriel@embrapa.br

³Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Biologia Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, christiane.paiva@embrapa.br

⁴Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, rodrigo.veras@embrapa.br

⁵Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, luciano.cota@embrapa.br

⁶Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, dagma.silva@embrapa.br

⁷Bióloga, M.Sc. em Microbiologia, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, bianca.mattos@embrapa.br

⁸Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária no Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM, Bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, anne_agv@hotmail.com

método de culturas pareadas. Dentre os isolados avaliados, foram selecionados Act.336, B.1433 e Act.9, devido aos maiores índices de inibição contra o fitopatógeno, com valores de 66,9%, 53,1% e 51,9%, respectivamente. A seguir, avaliou-se a influência de metabólitos produzidos por estes microrganismos para a inibição do crescimento micelial fúngico em meio líquido e germinação de conídios do patógeno em meio sólido. Estes isolados pré-selecionados apresentaram efeito antagonista contra o crescimento micelial. Entretanto, em meio sólido, somente os isolados Act.336 e Act.9 inibiram a germinação de conídios do fitopatógeno. Os três isolados apresentaram, *in vitro*, potencial para uso como antagonista de *F. verticillioides*.

Termos para indexação: *Zea mays* L., *Fusarium verticillioides*, antagonismo, biocontrole.

Selection of antagonists for biocontrol of *Fusarium verticillioides* in maize (*Zea mays* L.)

*Erika Nayara Tomacheski Diniz Alves*¹

*Ivanildo Evódio Marrie*²

*Christiane Abreu de Oliveira*³

*Rodrigo Vêras da Costa*⁴

*Luciano Viana Cota*⁵

*Dagma Dionísia da Silva*⁶

*Bianca Braz Mattos*⁷

*Ana Laura Guimarães Verdolin*⁸

Abstract

The objective of this work was to select and analyze strains of bacteria and actinomycetes that have antagonistic potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*, disease-causing at maize crop. The antagonist potential of 80 isolates, including bacteria and actinomycetes, was evaluated in vitro by the method of paired cultures. Among the isolates, Act.336, B.1433 and Act.9 were selected due to higher inhibition against the pathogen, and they showed values of 66.9%, 53.1% and 51.9%, respectively. Then, we assessed the influence of the metabolite produced by these microorganisms for inhibiting the fungal mycelial growth in liquid medium and conidia germination of the pathogen on solid medium. These pre-selected isolates showed antagonistic effect against mycelial growth. However, in solid medium, only isolates Act.336 and Act.9 inhibited germination of conidia of the *F. verticillioides*. The three isolates showed potential for use as an antagonist of *F. verticillioides* in vitro.

Index terms: *Zea mays* L., *Fusarium verticillioides*, antagonism, biocontrol

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas destinada à alimentação humana e animal em função da sua composição química e do alto valor nutritivo. Este cereal, além de suas aplicações alimentícias, é utilizado como matéria-prima para a produção de diversos tipos de produtos que apresentam relevância no setor comercial em vários países (DUARTE et al., 2008). Segundo o IBGE (2012), nas avaliações de agosto, a produção nacional recorde de milho em grão foi estimada em 72,7 milhões de toneladas.

Os grãos de milho podem ser afetados por fungos em duas etapas específicas: na pré-colheita (podridões fúngicas de espigas com a formação de grãos ardidos) e na pós-colheita, durante o beneficiamento, o armazenamento e o transporte (grãos mofados ou embolorados) (PINTO, 2005). As podridões destacam-se, no mundo, entre as mais importantes doenças que atacam a cultura do milho por causarem redução de produção e de qualidade de grãos (COSTA et al., 2005).

O fungo *Fusarium verticillioides* (sinônimo, *F moniliforme*.) é um dos principais patógenos associados a sementes de milho (*Zea mays*), no Brasil. O fungo pode ser introduzido pelas sementes em áreas isentas, causando deterioração de sementes, morte de plântulas, podridão radicular, do colmo e da espiga (SARTORI et al., 2004).

A ocorrência da podridão do colmo de milho tem aumentado significativamente nos últimos anos nas principais regiões produtoras de milho do país (COSTA et al., 2005). Vários patógenos podem estar associados a essa doença, sendo que o

mais frequente é o fungo *F. verticillioides* (ALVES; DEL PONTE, 2007). Este fungo tem sido considerado como o contaminante mais comum da cultura do milho, sendo preocupação constante pela sua produção de micotoxinas (GASPERINI, 2011), que causam danos à saúde humana e animal. Na cultura do milho, os principais contaminantes fúngicos são espécies do gênero *Fusarium*. As toxinas de *Fusarium* sp. possuem um amplo espectro de efeitos tóxicos, incluindo a capacidade de modificar o sistema imunológico em humanos e animais (GASPERINI, 2011).

Os fungos fitopatogênicos, em sua grande maioria, são controlados com uso de agroquímicos, o que acarreta efeitos negativos ao meio ambiente e aumento do custo de produção para o agricultor. O uso intensivo e indiscriminado de defensivos agrícolas pode causar danos ambientais ao solo e à água. Pelo impacto a alguns seres vivos destes ambientes, como algas e microrganismos, podem selecionar variantes de fitopatógenos resistentes, e ainda eliminar microrganismos utilizados em programas de biocontrole. Em busca de minimizar os efeitos negativos do uso dos defensivos e aumentar a produção de alimentos com maior qualidade, propiciando assim o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, devem-se buscar novas medidas que visem a proteção das plantas sem causar efeitos negativos ao meio ambiente e à saúde humana, (BETTIOL, 2003), propiciando também diminuição de custos para o agricultor.

A agricultura sustentável preconiza o uso do controle alternativo de doenças de plantas através do controle biológico, e a utilização de microrganismos com potencial antagonista pode ser uma maneira de inibir o desenvolvimento

de fitopatógenos sem contribuir para a degradação do meio ambiente. O controle biológico tem sido alcançado através de várias estratégias, de forma direta ou indireta (MELO; AZEVEDO, 1998), e uma delas é a utilização de microrganismos do solo que possuem potencial de diminuir a ação dos patógenos em plantas. Uma estratégia direta envolve a introdução de antagonistas do solo na semente, nos órgãos de propagação vegetativa ou na parte aérea.

Dentre os possíveis agentes para o controle biológico de doenças, destacam-se as bactérias, que constituem o maior grupo de ocorrência no solo. Além de existirem algumas espécies produtoras de antibióticos, possuem, dentre alguns de seus processos, a ação antagonista aos patógenos (SIQUEIRA, 1988), pela produção de enzimas e substâncias inibidoras. Entre os gêneros de bactérias antagonistas mais prevalentes, destacam-se *Pseudomonas* do grupo fluorescentes e umas do grupo não fluorescentes, como *Pseudomonas cepacia*, e gêneros como *Bacillus* e *Streptomyces*, representantes da família *Enterobacteriaceae* (ROBBS, 1991).

O presente trabalho teve como objetivo realizar teste in vitro com isolados de bactérias e de actinomicetos para identificar isolados antagonistas com potencial para biocontrole do *F. verticillioides*.

Para a determinação do potencial antagonista de isolados de bactérias do solo contra um isolado de *F. verticillioides* da Coleção de Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CFMS), foram escolhidos, aleatoriamente, 44 isolados de bactérias pertencentes à Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo. Essas bactérias

foram originalmente coletadas em solos com diversos tipos de cobertura vegetal, em área de mineração. O isolado de *F. verticillioides* foi originalmente isolado de milho cultivado em Sete Lagoas, MG.

Ativação e Testes de Pureza das Culturas de Microrganismos

As culturas das bactérias testadas estavam conservadas em meio ágar batata sólido – BDA (Batata 200 g L⁻¹; Dextrose, 20 g L⁻¹ e ágar, 15 g L⁻¹) sob óleo mineral esterilizado, e foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Utilizou-se o método de estrias (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994) para a obtenção de colônias puras dos isolados, para o testes de atividade antagonista. O teste foi realizado com duas duplicatas, totalizando quatro repetições para cada microrganismo.

Atividade Antagonista dos Isolados de Bactérias contra *Fusarium verticillioides*

A avaliação do potencial do controle in vitro dos isolados de bactérias contra *F. verticillioides* foi realizada através do método de culturas pareadas, que consiste na confrontação direta dos microrganismos em meio de cultura. Um disco de micélio de *F. verticillioides*, medindo aproximadamente 4 mm de diâmetro, foi inserido no centro da placa de Petri, contendo meio BDA. Em oito pontos equidistantes do disco de micélio, foram adicionados 30µL de suspensão de cada isolado de bactéria, ou de actinomiceto testados como prováveis antagonistas. Placas contendo somente o fitopatógeno foram utilizadas como controle. Após 10 dias de incubação a 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas foi medido o diâmetro do micélio do fitopatógeno,

na presença e ausência dos microrganismos antagonistas. A zona de inibição (ZI) de cada microrganismo foi calculada de acordo com metodologia descrita por Campanile et al. (2007), utilizando-se a seguinte expressão:

$$(ZI) \% = \frac{(N1 - N2)}{N1} \times 100,$$

sendo: (ZI)% = percentagem da zona de crescimento; N1= raio do micélio encontrado na ausência do antagonista; N2= raio do micélio na presença do antagonista.

Influência da Concentração de Metabólitos dos Microrganismos Antagonistas sobre o Crescimento da Massa Micelial do *Fusarium verticillioides* em Meio Líquido

Foi avaliado o efeito dos metabólitos dos isolados B.1433, Act.336 e Act.9 que apresentaram maior potencial antagonista, sendo selecionados com base no maior valor da zona de inibição sobre o crescimento do micélio do fitopatógeno.

Para a obtenção do metabólito utilizaram-se placas de Petri contendo colônias puras dos isolados B.1433, Act.336 e Act.9. Para observação do crescimento micelial deles mesmos no meio líquido, em seguida, transferiram-se estas colônias para meio líquido TSB - Tripticaseína de soja (peptona de caseína 15g L⁻¹, cloreto de sódio 5g L⁻¹, extrato de leveduras 1,5g L⁻¹, extrato de carne 3,0g L⁻¹), sendo mantidas em incubadora a 27 °C e 18 rpm, durante quatro dias. Após este período, as colônias dos isolados foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 10 minutos em meio líquido e, logo após, filtradas em membranas esterilizantes de 0,45 µm para a utilização do sobrenadante.

Concomitantemente, foram produzidos esporos do fitopatógeno em meio BDA, sendo mantidos em câmara de incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante 5 dias.

Para a preparação da suspensão de esporos utilizaram-se 9 ml de água deionizada em tubos de ensaio previamente esterilizados em autoclave por 30 minutos a 120 °C e 1 atm. Para preparo das diluições, em câmara de fluxo laminar, com uma alça previamente flambada, retiraram-se esporos de *F. verticillioides* da suspensão, que foram adicionados a tubos de ensaio contendo 9 ml de água deionizada e esterilizada, efetuando-se a diluição seriada dos esporos. Para o teste utilizou-se a concentração de esporos 10^{-1} ($4,67 \times 10^4$ conídios/ml⁻¹) do fitopatógeno quantificado em hemacitômetro de Neubauer (TANAKA, 1987).

Foram realizadas 4 repetições para cada microrganismos. Utilizou-se como controle, erlenmeyer de 250 ml contendo 25 ml do meio de cultura TSB e 500µl a concentração de 10^{-1} do fitopatógeno. Nos tratamentos, avaliou-se o crescimento micelial de *F. verticillioides* para cada metabólito proveniente dos 3 isolados pré-selecionados em duas concentrações 100 e 50%. Utilizando-se erlenmeyer de 250 ml, contendo a concentração 100%, 25 ml de metabólito de cada microrganismo antagonista e para a concentração de 50%, utilizaram-se 12,5 ml de metabólito com 12,5 ml do meio de cultura TSB, ambos com 500µl da concentração de 10^{-1} de *F. verticillioides*.

Durante dez dias, os microrganismos foram incubados a 27 °C e 18 rpm, permitindo o crescimento da massa micelial fúngica úmida do *F. verticillioides* no teste controle e nos

demais tratamentos. Após 10 dias, a massa micelial foi filtrada utilizando-se papel de filtro de 125 mm, com objetivo de reter apenas a massa micelial fúngica úmida do fitopatógeno. Obteve-se o peso da biomassa através de uma balança com precisão de 4 casas decimais.

Os metabólitos utilizados no teste foram avaliados quanto à densidade de moléculas dos isolados pré-selecionados. Utilizou-se o espectrofotômetro a um comprimento de ondas de 540 nanômetros, constatando as seguintes densidades para os isolados B.1433, Act.336 e Act.9, com 0,084 nm, 0,181nm, 0,155 nm, respectivamente.

Os dados de crescimento micelial foram analisados estatisticamente pela análise de variância das médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Influência do Metabólito dos Microrganismos Antagonista na Germinação de Esporos de *Fusarium verticillioides* em Meio Sólido

Para a avaliação da influência do metabólito dos isolados previamente selecionados sobre a germinação de *F. verticillioides*, tanto a obtenção do metabólito dos isolados pré-selecionados neste teste quanto a preparação da suspensão de esporos foram realizadas conforme descritos para o ensaio anterior. Para cada tratamento em meio sólido foram realizadas três repetições e em cada uma das repetições adicionou-se 100µl de suspensão de esporo obtida através da diluição em série: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Através da contagem dos esporos em hemacitômetro de Neubauer (TANAKA, 1987), constatou-se que a diluição 10^{-3} ($1,5 \times 10^4$ conídios/ml⁻³) seria a mais adequada para

realizar o teste em meio sólido, pois possuía a quantidade ideal de esporos para este tipo de teste, conforme a literatura.

Os ensaios foram realizados utilizando placas de Petri contendo apenas meio ágar-água. Na placa controle, foram adicionados 100µl da concentração de esporos a 10^{-3} do fitopatógeno, sem adição de metabólitos das bactérias. Para o tratamento 1, utilizaram-se placas de Petri contendo meio ágar-água e 1 ml do metabólito do isolado B.1433. Após a absorção do metabólito pelo meio de cultura, foram espalhados 100µl de concentração de esporos a 10^{-3} do *F. verticillioides* com o auxílio da alça Drigalski. Os tratamentos 2 e 3 foram realizados da mesma maneira que o tratamento 1, com os isolados Act.336 e Act.9, respectivamente.

Após 10 dias de incubação em estufa a 30 °C, realizou-se a contagem de esporos germinados de *F. verticillioides* em cada placa, no tratamento controle e nos outros tratamentos contendo metabólitos de bactérias.

Para a realização das análises estatísticas e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), os dados de contagem da germinação de esporos do *F. verticillioides* foram normatizados por meio da função de LOG_{10} .

Resultados e Discussão

Atividade Antagonista de Isolados de Bactérias e Actinomicetos por Método de Culturas Paredadas contra *Fusarium verticillioides*

O teste de culturas paredadas realizado in vitro utilizando-se isolados de bactérias e actinomicetos apresentaram grande variação de inibição contra o fitopatógeno *F. verticillioides* (Tabela 1). Os isolados de bactérias testados que apresentaram maiores índices de inibição foram B.1433, B.01 e B.BAC, apresentando 53,10%, 52,50% e 50,00% de inibição, respectivamente. Os isolados de actinomicetos apresentaram potencial de antagonismo, reduzindo o crescimento entre 12% e 67%, sendo que isolado Act.336 apresentou maior potencial de inibição contra o *F. verticillioides*, com 66,90%, seguido do isolado Act.9, que apresentou 51,9% de inibição (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento in vitro de culturas pareadas com 44 isolados de bactérias e 36 actinomicetos com potencial antagonista sobre *Fusarium verticillioides*, visando o biocontrole. Média do raio do halo de crescimento micelial do fitopatógeno (cm) e índice de inibição apresentado sobre influência dos isolados testados (%)

Bactérias	Crescimento Micelial*		Índice de Inibição (%)	Actinomicetos	Crescimento Micelial*		Índice de Inibição (%)
	(cm)				(cm)		
B.1433	1,875	a	53,1	Act.336	1,3255	a	66,9
B.01	1,900	a	52,5	Act.9	1,900	b	51,9
B.BAC	2,000	a	50,0	Act.13	2,075	c	48,1
B.C05	2,300	b	42,5	Act.07	2,125	c	46,9
B.RZ09	2,350	b	41,3	Act.440	2,350	d	41,3
B.64	3,213	c	35,0	Act.18	2,425	d	39,4
B.79	3,225	c	19,4	Act.1	2,750	e	31,3
B.54	3,250	c	18,8	Act.14	2,875	e	28,1
B.86	3,275	c	18,1	Act.504	2,900	e	27,5
B.47	3,275	c	18,1	Act. AC13	2,825	e	25,0
B.87	3,350	c	16,3	Act.1336	3,000	e	25,0
B.43	3,350	c	16,3	Act.C66	3,000	e	25,0
B.72	3,375	c	15,6	Act.A1	3,400	f	15,0
B.70	3,425	c	14,4	Act.RII86	3,450	f	13,8
B.256	3,475	c	13,1	Act.6A1	3,500	f	12,5
B.46	3,525	c	11,9	Act.497	3,500	f	12,5
B.80	3,525	c	11,9	Act.498	3,525	f	11,9

Cont. Tabela 1.

Bactérias	Crescimento Micelial*	Índice de Inibição	Actinomicetos	Crescimento Micelial*	Índice de Inibição
	(cm)				
B.96	3,600	c	10,0	Controle ⁽¹⁾	4,000 g 0,0
B.62	3,625	c	9,4	Outros ⁽²⁾	
B.49	3,625	c	9,4		
B.50	3,625	c	9,4		
B.77	3,675	c	8,1		
B.48	3,775	d	5,6		
B.68	3,800	d	5,0		
B.65	3,800	d	5,0		
B.78	3,925	d	1,9		
Controle ⁽¹⁾	4,000	d	0,0		
Outros ⁽²⁾					

*Média de quatro repetições, seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade. ⁽¹⁾*Fusarium verticillioides* na ausência do antagonista.

⁽²⁾Demais isolados de bactérias e actinomicetos testados, que não apresentaram halo de inibição contra o fitopatógeno. CV (%)=10,77 para bactérias e CV%=3,87 para actinomicetos.

De acordo com o agrupamento realizado pelo teste Scott-knott, houve diferenças significativas entre os isolados testados e controle (Tabela 1). Não apresentaram nenhum tipo de inibição e diferenças significativas contra o *F. verticillioides* 18 isolados de bactérias e 19 isolados de actinomicetos quando comparados com o controle (Tabela 1). Os demais isolados

mostraram diferenças significativas a 5% de probabilidade, diferindo estatisticamente. O isolado Act.336 apresentou maior efeito antagonista, medido pelo tamanho da colônia, com diferença significativa dos demais isolados e controle (Tabela 1).

O teste de culturas pareadas demonstrou o potencial antagonista de alguns isolados contra o *F. verticillioides*. Segundo Menten (1996), microrganismos podem ser usados como biocontrole, que aplicados em sementes podem eliminar ou impedir o desenvolvimento de patógenos transportados pelas sementes ou presentes no solo, tendo ação de antagonismo, hiperparasitismo e/ou competição contra ele.

O antagonismo pode ocorrer pela produção de bacteriocinas, metabólitos ácidos ou tóxicos, todos estes incompatíveis com a vida do fitopatógeno, bem como pela competição trófica de elementos essenciais ao desenvolvimento do fitopatógeno in vitro (KONDE, 1984).

Beux e Denardin (2001), em estudo com bactérias *Bacillus subtilis* e actinomicetos in vitro, obtiveram resultados positivos no uso desses microrganismos para biocontrole de fitopatógenos. A bactéria endofítica *Bacillus subtilis* foi capaz de reduzir os níveis de micotoxinas acumuladas nas sementes de milho por *Fusarium verticillioides* (BACON et al., 2001).

Influência da Concentração de Metabólito dos Microrganismos Antagonistas sobre o Crescimento da Massa Micelial do *Fusarium verticillioides* em Meio Líquido

Os resultados das análises obtidas entre as diferentes concentrações de metabólitos dos isolados B.1433, Act.336

e Act.9, quanto ao potencial antagonístico sob o crescimento da massa micelial fúngica úmida de *F. verticillioides*, apresentaram variação entre o controle e os tratamentos para as concentrações de 50 e 100% de metabólito (Figura 1). Não foi observada, para os isolados testados, diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade, entre os tratamentos submetidos a 50 e 100% de metabólito (Figura 1).

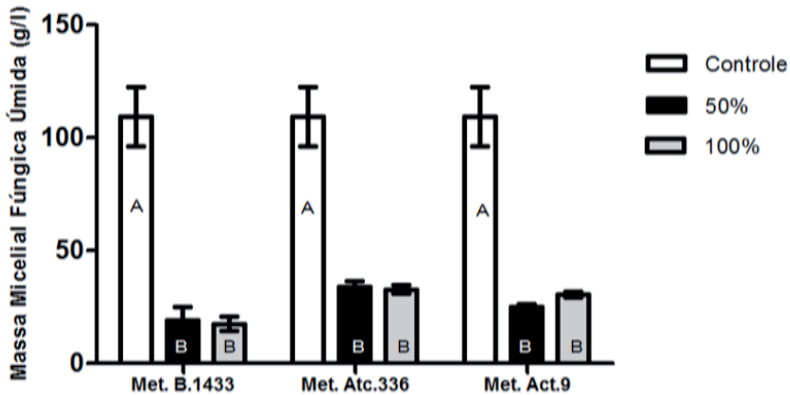


Figura 1. Crescimento micelial de *Fusarium verticillioides* (cm) na presença de metabólito dos isolados B.1433, Act.336 e Act.9, em concentrações de 50 e 100%, e na ausência de metabólito (Controle). Médias de 4 repetições, seguidas pelas letras iguais, não diferem estatisticamente entre si.

Os resultados in vitro com os isolados B.1433, Act.336 e Act.9 demonstram a existência de microrganismos que possuem um potencial de inibição contra o fitopatógeno causador da redução na germinação da semente, morte de plântulas, podridão de raízes e de colmos e podridão dos grãos, independentemente da concentração de metabólito testada, constituindo-se uma

grande alternativa de biocontrole dessa doença na cultura do milho.

Existem relatos na literatura indicando vários microrganismos que podem ser utilizados por possuírem capacidade antagonista contra fungos fitopatogênicos *in vitro* e *in vivo*, podendo ser usados como biocontrole de fitopatógenos. Entretanto, nenhum deles faz parte dos produtos de primeira escolha para aplicação em lavouras, pois nem todos os antagonistas confirmam sua atividade quando transpostos para larga escala (SPADARO; GULLINO, 2005).

Touré et al. (2004) observaram a inibição do crescimento micelial acima de 45% através do antagonismo entre o isolado de *B. subtilis* contra diversos fungos fitopatógenos no solo, como *Fusarium spp.*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus sp.*, pela produção de metabólitos do tipo lipopeptídeos.

Influência do Metabólito dos Microrganismos Antagonista na Germinação de Esporos de *F. verticillioides* em Meio Sólido

Ocorreu diferença significativa entre os isolados testados e o tratamento controle com relação à germinação de esporos de *F. verticillioides* (Tabela 2). Os isolados Act.336 e Act.9 inibiram completamente a germinação dos esporos, portanto, entre estes dois isolados não houve diferença significativa quanto ao potencial de inibição da germinação de esporos. O isolado B.1433, testado contra o fitopatógeno, foi o que apresentou menor índice de inibição contra a germinação de esporo do

F. verticillioides, diferindo estatisticamente do controle, sem adição de metabólitos de isolados.

Tabela 2. Germinação de esporos de *F. verticillioides*, na presença de metabólito dos isolados B.1433, Act.336 e Act.9 e ausência de metabólito (Controle).

Isolados 10^{-3}	Germinação	
	Log _(UFC) /ml	
Controle	3,6499	a*
B.1433	3,2981	b
Act.336	0	c
Act.9	0	dc

*Médias de 3 repetições, seguidas por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Foi observado por Bettiol e Kimati (1990) o potencial inibitório de *B. subtilis* sobre diversos fitopatógenos, dentre eles, *R. solani* e *F. moniliforme* (sing. *F. verticillioides*). Contudo, neste experimento, a utilização do isolado B.1443 contra a germinação de esporos do fitopatógeno foi insatisfatória, comparando-o aos outros isolados.

Conclusões

1. Houve diferença entre os isolados de bactérias e actinomicetos em relação ao potencial antagonista para o biocontrole de *Fusarium verticillioides*.
2. Foi possível selecionar os isolados Act.336, Act.9 e B.1433 como agentes com potencial para o controle biológico de *F. verticillioides* in vitro, com base na inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos.

Agradecimentos

Ao CNPq-PIBIC pela concessão de bolsa de Iniciação Científica e à Embrapa Milho e Sorgo pela oportunidade de estágio.

Referências

ALVES, R. C.; DEL PONTE, E. M. Requeima da batata. In: DEL PONTE, E. M. (Ed.).

Fitopatologia.net - herbário virtual. Porto Alegre: UFRGS, 2007. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/agronomia/fitossan/herbariovirtual/ficha.php?id=101>>. Acesso em: 22 ago. 2012.

BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 109, p. 325-332, 2001.

BETTIOL, W. Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras tecnologias alternativas. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Ed.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. p. 191-225.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 1165-1174, 1990.

BEUX, E.; DENARDIN, N. D. Uso de bactérias antagonistas no controle "in vitro" de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 303, ago. 2001.

Suplemento. Edição dos resumos do 34º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Carlos, 2001.

CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in plant tests. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, p. 237-246, 2007.

DUARTE, J. O.; CRUZ, J. C.; GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J. Economia da produção. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção, 2).

COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; COTA, V. L. **Podridões do colmo e das raízes**: relatório do ano de 2005. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_64_16820051120.html>. Acesso em: 24 set. 2012.

GASPERINI, A. M. **Biocontrole do *Fusarium verticillioides* em milho**. 2011. Monografia (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 542 p. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 46).

IBGE. **Em agosto, IBGE prevê safra de grãos 2,8% maior que a safra obtida em 2011**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2211&id_pagina=1>. Acesso em: 31 ago. 2012.

KONDE, B. K. Studies on soil streptomycetes from Maharashtra III. Antimicrobial properties. **Journal of Maharashtra Agricultural Universities**, Pune, v. 9, p. 8-10, 1984.

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v. 1, 57 p.

MENTEN, J. O. M. Tratamento de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 4., 1996, Gramado. **Tratamento químico de sementes: anais**. Campinas: Fundação Cargill, 1996. p. 3-24.

PINTO, N. F. J. de A. **Grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 66).

ROBBS, C. Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1991. p. 121-133. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 15).

SARTORI, A. F.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Quantificação da transmissão de *Fusarium Moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 456-458, 2004.

SIQUEIRA, J. O. **Biotecnologia do solo**: fundamentos e perspectivas. Brasília, DF: MEC: ABEAS; Lavras: ESAL: FAEPE, 1988. 118 p.

SPADARO, D.; GULLINO, M. L. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. **Crop Protection**, Surrey, v. 24, p. 601-613, 2005.

TANAKA, M. A. S. Técnicas auxiliares em laboratório de patologia de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. da (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 313-329.

TOURÉ, Y.; ONGENA, M.; JACQUES, P.; GUIRO, A.; THONART, P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 1151-1160, 2004.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



CGPE - 10964