

Atividade antagonista da bactéria endofítica CNPMS22 contra fungos de sementes do milho (*Zea mays*)

José E. F. Figueiredo^{1,2}, Marta A. Teixeira³, Guilherme V. C. Lima³, P.L. Quintão⁴, J. A. Correa⁴, Wellington Bressan¹, Nicésio F. J. Pinto¹ e Carlos R. Casela¹

¹Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG.; ² Autor para correspondência – jeff@cnpms.embrapa.br; ³UNIFEMM, Centro Universitário de Sete Lagoas, 35701-242, Sete Lagoas, MG. ⁴Laboratório de Microbiologia, Departamento de Microbiologia, UFMG, CEP-31270-901, Belo Horizonte, MG

Palavras-chave: sementes de milho, endófito, CNPMS22, fungos fitopatogênicos, microbiolização.

Introdução

Fungos patogênicos transmitidos pelas sementes são economicamente importantes, pois reduzem consideravelmente a produtividade, depreciam a qualidade dos grãos e constituem fontes de inóculo para o desenvolvimento de doenças (LUZ, 2001; PINTO, 2001). Os patógenos transmitidos por sementes também podem causar perdas por diminuição da germinação, emergência em solo e vigor das plântulas.

As micotoxinas representam outro grave problema relacionado com a presença de fungos em sementes, podendo ocorrer tanto no período de pré-colheita (fungos de campo) como durante o armazenamento sob condições inadequadas (fungos de armazenamento) (MANUAL..., 2004; SINHA; SINHA, 1991).

O controle de fungos transmitidos por sementes é geralmente realizado com o emprego de agroquímicos, que contaminam o meio ambiente com resíduos tóxicos não biodegradáveis e pela resistência desenvolvida pelos microrganismos a esses compostos (CASELA et al., 1997).

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 (MILLER, 1995; SILVEIRA, 2009; SINHA; SINHA, 1991). 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 apresenta uma série de vantagens em relação ao químico, pois não contamina, não desequilibra o meio ambiente e nem deixa resíduos, além de ser barato e de fácil aplicação (SOARES, 2006).

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., 1991; LUZ, 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, 2001). 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 strictum*, *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus* spp, *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* e *Colletotrichum sublineolum*) (FIGUEIREDO et al., 2009).

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).

Material e Métodos

No presente estudo, foram utilizadas 1000 sementes de milho da variedade BR 105 e BR 106 coletadas diretamente no Campo Experimental da Embrapa Milho e Sorgo e do Campo Experimental de Janaúba, sem tratamento anti-fúngico. As sementes foram incubadas durante 1 minuto em cultura líquida da bactéria CNPMS-22, 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 de CNPMS-22 no meio LB líquido. Em seguida, as sementes foram inoculadas em placas e magentas contendo meio LB ou BDA semi-sólido. Foram realizadas observações diárias durante 30 dias.

No experimento de laboratório, cada tratamento foi constituído de 1.000 sementes microbiolizadas com a bactéria CNPMS-22, distribuídas individualmente em magentas contendo meio LB semi-sólido, repetido quatro vezes. Cinco mil sementes foram utilizadas para controle (sem microbiolização). As magentas com sementes foram colocadas 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 blocos inteiramente casualizados. A presença dos fungos patogênicos foi determinada entre 5-30 dias após a inoculação. Os dados foram expressos em percentagem referente à incidência de cada patógeno nas sementes. A identificação dos fungos foi realizada no Laboratório de Microbiologia da UFMG.

Resultados

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

Em nenhuma magenta contendo sementes de milho inoculadas com CNPMS-22 houve crescimento de fungo (100% de controle), enquanto nas magentas utilizadas como controle ocorreu o desenvolvimento de pelo menos um tipo de fungo em 93% das sementes (Figura 1, Tabela 1). O efeito do fungo 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%). Ocorreu mortalidade de plântulas logo após a germinação (27%) e 10 dias após a emergência (16%). Algumas plântulas permaneceram vivas (46%) durante todo o período em que foi realizado o experimento, mesmo na presença de fungo (Figura 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*, *Gibberella*, *Diplodia* (*Stenocarpela*), *Colletotrichum*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Os fungos *Fusarium moniliformis* e *Diplodia maydis* foram os mais frequentes (21% e



15%, respectivamente), *Fusarium graminearum* e *Penicillium* spp. foram os menos frequentes (4% e 3%, respectivamente), enquanto os fungos *Aspergillus* spp. e *Colletotrichum graminicola* apresentaram valores intermediários (12% e 10%, respectivamente). Além dos fungos identificados, foram anotados 48 morfotipos diferentes, cuja identidade não pode ser estabelecida com base na análise morfológica (observações sob lupa, pelo tipo de colônia, ou forma e tamanho dos esporos, entre outros).

Os resultados do presente estudo, utilizando a bactéria endofítica CNPMS-22 (*Bacillus subtilis*) como agente na microbiolização de sementes de milho para proteção contra fungos fitopatogênicos, são similares aos relatos de vários autores que empregaram outras espécies de bactérias, como *Pseudomonas fluorescens* (CALLAN et al., 1991), *Paenibacillus macerans*, *Flavimonas oryzihabitans* e *Pseudomonas putida* (LUZ, 2003), como a espécie *Bacillus subtilis* (BACON et al., 2001; PAZ et al., 2007).

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.



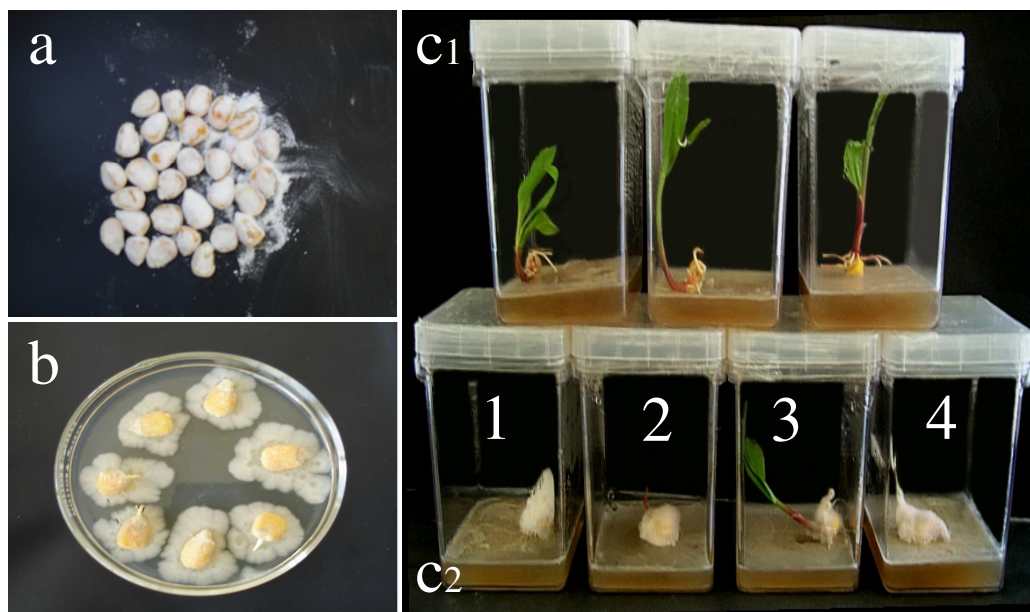


Figura 1. Inoculação e germinação de sementes de milho com a bactéria CNPMS-22. (a) Sementes de milho incubadas por 1 minuto em cultura líquida da bactéria CNPMS-22, misturadas com amido e sacarose a 50% e secas em estufa em temperatura de 30 °C por 24 h; (b) germinação, em placa de petri, de sementes 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.



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 germinativo antes da microbiolização	Índice germinativo após microbiolização	Fungos identificados em sementes e plântulas de milho (%)*							Morfofotipos
			<i>Ausência de fungo</i>	<i>Diploidia maydis</i>	<i>Fusarium moniliformis</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Colletotrichum graminicola</i>	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Penicillium spp.</i>	
Microbiolização	96%	95%	100	0	0	0	0	0	0	0
Controle	96%	92%	7	15	21	4	10	12	3	28

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



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 Microbiol Ecology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 215-229, 2005.

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.

CASELA, C. R.; PINTO, N. F. J. A.; OLIVEIRA, E.; FERREIRA, A. S. Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench): controle de doenças. In : VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997. cap. 22, p. 1025-1063.

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.

FIGUEIREDO, J. E. F.; GOMES, E. A.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; BRESSAN, W. Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 522-534, 2009.

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.

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.

KLOEPPER, 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. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 16-20, 2001.

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. (Série Qualidade e Segurança dos Alimentos).

PAZ, I. C. P.; RUBINI, M. R.; CAGLIARI, J.; BIAZIN, A. G.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; AZEVEDO, J. L. Efeito inibitório na germinação de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e milho (*Zea mays*) microbiolizadas com um isolado endofítico de *Bacillus subtilis*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 1, p. 717-720, 2007.

PINTO, N. F. J. A. **Qualidade sanitária de grãos de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. 4 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 30).

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, 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) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 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) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 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.

