

Efeito do tratamento de sementes com o biofungicida bacteriano CNPMS22 na sobrevivência e desenvolvimento de plantas de milho em solo infestado com *Fusarium verticillioides*

Fabrcio Eustáquio Lanza¹, José Edson Fontes Figueiredo², Rodrigo Veras da Costa³, Lorena de Oliveira Moura⁴, Marielle Martins Marcondes⁵, Dagma Dionisia da Silva⁶, Luciano Viana Cota⁷, Carla Lima Corrêa⁸ e Alessandro Nicoli⁹ Talita Coeli Dangelis de Aparecida Ramos¹⁰.

^{1,9}Doutorando Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. ¹falanza@bol.com.br, ⁹alessandro.nicoli@ufv.br
^{2,3,6,7}Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. ²jeff@cnpms.embrapa.br ³veras@cnpms.embrapa.br
⁶dagma@cnpms.embrapa.br ⁷lvkota@cnpms.embrapa.br ⁴Acadêmica Universidade Federal de São João Del Rei/Campus Sete Lagoas, MG. lorena.om@hotmail.com ⁵Mestranda Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR. m_lelinha@hotmail.com ⁸Pós-Doutoranda Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG correa.carla@yahoo.com Acadêmica UNIFEMM, Sete Lagoas, MG talita.tchely@hotmail.com ²Autor para correspondência jeff@cnpms.embrapa.br.

RESUMO – O uso de fungicidas é importante para aumentar a produtividade agrícola. Contudo, fungicidas representam riscos para o meio ambiente e à saúde humana. Os efeitos nocivos dos fungicidas indicam a necessidade de buscar alternativas ambientalmente corretas e sustentáveis para melhorar a resistência de plantas contra doenças fúngicas. O presente estudo objetivou avaliar o efeito do biofungicida bacteriano CNPMS22 para proteção de plantas de milho em solo infestado com *Fusarium verticillioides*. Sementes da variedade Caimbé, altamente sensível ao fungo, foram tratadas com fungicida Captan ou com a bactéria CNPMS22 e plantadas em vasos contendo solo não infestado e solo infestado artificialmente com *F. verticillioides*. Sementes sem tratamento antifúngico foram usadas como controle. O experimento foi conduzido até os 30 dias após plantio (DAP). Foram avaliadas: emergência e altura de plantas, peso da matéria fresca e da matéria seca. As sementes tratadas com CNPMS22 apresentaram índices de sobrevivência de plântulas iguais às sementes tratadas com fungicidas e superiores à testemunha. Com relação ao desenvolvimento das plântulas 30 DAP, o tratamento com o biofungicida foi superior aos demais. Sendo assim, o tratamento de sementes de milho com a bactéria biofungicida CNPMS22, apresenta-se como boa alternativa para o controle de *F. verticillioides* em milho.

Palavras-chave: Milho, fusariose, bactéria endofítica CNPMS22, controle biológico.

Introdução

As sementes são importantes veículos de transmissão de doenças, que podem causar redução da germinação e do vigor das plantas. A maioria das doenças de importância econômica na cultura do milho é causada por patógenos que são transmitidos pelas sementes. *Fusarium verticillioides* Sacc. Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon) é um patógeno primário de milho, com ampla distribuição mundial e predominância em climas tropicais e sub-tropicais (Marasas et al., 1984). *F. verticillioides* apresenta alta ocorrência e pode causar perdas econômicas significativas para produtores, processadores de grãos e criadores de animais (Bacon & Nelson, 1994). As fumosinas, toxinas produzidas por *F. verticillioides*, representam sérios riscos à saúde humana e animal, podendo causar intoxicação ou câncer (Sydenham et

al., 1992; Ueno, 2000; Meirelles et al., 2006). O ciclo de infecção e desenvolvimento da fusariose consiste de um sistema complexo, associado com todas as fases do desenvolvimento da cultura do milho. A doença pode iniciar com o plantio em função da sobrevivência do fungo nos resíduos de colheitas anteriores, que contamina as sementes, inibe o desenvolvimento da raiz das plântulas de milho e dissemina para o colmo e espiga (Figueira et al., 2003; Futrell & Kilgoore, 1969). A disseminação de macro e microconídios pelo ar ou por gotículas de chuva, que atingem diretamente os tecidos vegetais, constituem outras fontes de contaminação no campo (Munkvold, 1997).

Práticas agrícolas modernas incluem o tratamento de sementes com fungicidas para proteger de infecções fúngicas após a semeadura ou ainda para reduzir a transmissão de fungos da semente infectada para parte aérea da planta (Munkvold, 2009). Contudo, a eficácia desse método é relativa para o controle de *F. verticillioides*. Nerbass et al. (2008) analisaram 225 amostras de sementes de milho tratadas com diferentes princípios ativos antifúngicos e obtiveram frequência média de 86,6% de *F. verticillioides*.

Nas últimas décadas, os fungicidas desempenharam papel fundamental no aumento da produtividade em vários países. Contudo, o uso regular de destes agroquímicos pode representar sério risco ao meio ambiente devido a persistência de resíduos no solo e contaminação de lençóis freáticos, impactando ecossistemas terrestres e aquáticos (Wightwick et al., 2010). Os efeitos colaterais nocivos dos fungicidas indicaram a necessidade de buscar alternativas sustentáveis, ambientalmente corretas, para melhorar a resistência de plantas contra diferentes tipos de estresse biótico, a um custo reduzido e acessível aos agricultores.

Embora os efeitos antagonistas de microrganismos endofíticos sobre fungos fitopatogênicos, *in vitro*, sejam bastante conhecidos, seu emprego *in situ* ainda é limitado (Bacon et al., 2001). Metabólitos produzidos por diferentes microrganismos endofíticos inibem uma variedade de agentes causadores de doenças e por isso representam importante e inexplorada fonte de agentes para biocontrole de doenças de plantas (Gunatilaka, 2006; Strobel, 2006). A microbiolização de sementes tem sido realizada para controle de patógenos e também como promotora de germinação e crescimento de plantas de milho (Chang & Kommedahl, 1968; Callan et al., 1990,1991; Luz, 2001; 2003). A microbiolização de sementes de milho empregando a bactéria endofítica *Bacillus subtilis* foi capaz de reduzir os níveis de micotoxinas acumuladas nos grãos por *F. verticillioides* (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 biofungicida endofítica *Bacillus subtilis*, CNPMS22, 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., 2010a; 2011a). Em outro estudo, o tratamento de sementes com a bactéria CNPMS22 foi efetivo no controle de fungos fitopatogênicos do milho durante o período de germinação, principalmente sobre *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (Figueiredo et al., 2010b;2011b).

O controle biológico de fungos apresenta vantagens em relação ao controle químico, pois não contamina e não causa desequilíbrio ambiental, não deixa resíduos tóxicos nos alimentos, e constitui uma alternativa barata e de fácil aplicação (Soares, 2006). A utilização da bactéria biofungicida endofítica CNPMS22 como método de proteção de sementes de milho e do sorgo poderá reduzir consideravelmente o uso de fungicidas nessas culturas. Portanto, o presente estudo teve por objetivo validar, em casa de vegetação, a atividade antagonista da bactéria biofungicida endofítica CNPMS22 contra o fungo fitopatogênico do milho, *Fusarium verticillioides*.

Material e Métodos

O ensaio foi instalado na casa de vegetação do núcleo de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo, localizado em Sete Lagoas, Minas Gerais. O isolado de *F. verticillioides* foi obtido de amostras de grãos de milho cultivados nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo. O isolado de *Fusarium verticillioides* foi identificado ao microscópio com base em sua morfologia típica, de longas cadeias de microconídios produzidas em monofálides (Leslie & Summerell, 2006). Canjiquinha (milho moido) foi utilizada como substrato e meio para crescimento de *F. verticillioides*. Anteriormente a canjiquinha foi distribuída Em 10 erlemeyers de 1 litro foi adicionado canjiquinha até o volume de 800 ml e umidade padronizada para 20%, e autoclavada duas vezes a 120°C por 30 minutos. Em seguida foi inoculado *F. verticillioides* e os Erlemeyers com canjiquinha e *F. verticillioides* foram incubados durante 20 dias a 25 °C em BOD.

Para microbiolização das sementes com a bactéria biofungicida CNPMS22, uma colônia isolada da bactéria foi transferida para 500 mL de meio LB líquido e crescida à 35 °C, por 72 horas, sob agitação intensa (300rpm). Após esse tempo, a cultura foi centrifugada a

2000rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e a massa celular bacteriana foi ressuspensa em 200 mL de solução de sacarose à 20 %. Em seguida, foi realizada a inoculação da suspensão da bactéria CNPMS22 em sementes da variedade de milho Caimbé, reconhecidamente susceptível ao *F. verticillioides*. A incubação foi feita durante 30 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação lenta (80rpm). Em seguida o excesso de inóculo foi descartado e as sementes foram misturadas em amido e sacarose a 50%, secas por 24 h em estufa a 30 °C (microbiolização) e armazenadas em sacos de papel. Lotes de sementes da variedade Caimbé foram tratadas com o fungicida Captan seguindo o padrão de normas e práticas do Laboratório de Sementes da Embrapa Milho e Sorgo.

Para o teste da atividade biofungicida, foram utilizados vasos de 5 litros contendo terra vermelha de barranco (horizonte C). Cento e cinquenta gramas de canjiquinhas de milho e *F. verticillioides* foram colocados em cada vaso e incorporados a 5 cm de profundidade, e como tratamentos controle, foram utilizados vasos sem a adição de inóculo. Finalizando o processo, em cada vaso foram plantadas 4 sementes da variedade de milho Caimbé tratadas com a bactéria, com fungicida e sem tratamento (três tratamentos). Aos 30 dias de crescimento, procedeu-se a análise do estande (numero de plantas vivas por vaso); altura de planta, medida do solo à ponta da última folha totalmente aberta; matéria fresca, que corresponde ao peso das plantas cortadas na altura do colo; matéria seca, que corresponde as mesmas plantas acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 60°C, até peso constante.

Os dados foram submetidos a análise de variância e a um teste de comparação de médias, Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR.

Resultados e Discussão

Através do experimento realizado em casa de vegetação, foi possível observar que as plântulas originadas de sementes sem tratamento antifúngico, germinadas em solo infestado artificialmente com *F. verticillioides*, apresentaram mortalidade significativa, enquanto as plântulas de sementes tratadas com o fungicida Captan ou com a bactéria biofungicida CNPMS22 apresentaram redução da mortalidade e de doença (Tabela1, Figura 1). Em solo não infestado e em solo infestado com *F. verticillioides* não houve diferença estatística dos tratamentos com fungicida Captan ou com a bactéria biofungicida CNPMS22 sobre o número de plantas sobreviventes aos 30 dias após o plantio (DAP) (Tabela 1).

Plantas geradas a partir de sementes não tratadas, em solo infestado, teve média de altura estatisticamente inferior ao das plantas crescidas em solo não infestado (controle). Em

relação as sementes tratadas com o fungicida Captan, verificou-se que a infestação do solo com *F. verticillioides* influenciou negativamente a altura média das plantas, enquanto que o tratamento de sementes com a bactéria CNPMS22 teve efeito positivo na altura das plantas quando estas se encontravam em solo infestado, sendo este estatisticamente diferente dos demais (Tabela 1).

A análise do peso seco da parte aérea das plantas aos 30 DAP, indicou que o solo infestado com *F. verticillioides* influenciou negativamente as plantas originadas de sementes não tratadas ou tratadas com fungicida, enquanto que plantas originadas do tratamento das sementes com a bactéria CNPMS22 não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre o solo infestado com o fungo e o solo não infestado (Tabela 1, Figura 1).

Vários estudos demonstraram que linhagens de *B. subtilis* apresentam grande potencial para serem usadas como agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos (El-Hamshary & Khattab, 2008; Morsy et al., 2009). *B. subtilis* com atividade antagonista tem sido utilizadas como inoculantes para controle de fungos fitopatogênicos. A linhagem comercializada FZB24, de *B. subtilis* confere resistência de plantas para diferentes tipos de fungos fitopatogênicos (Bochow et al., 2001). Os resultados do experimento realizado em casa de vegetação comprovaram o potencial da bactéria endofítica CNPMS22 no controle biológico da fusariose em milho, causada por *F. verticillioides* presente no solo.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Viçosa, ao CNPq, a Embrapa Milho e Sorgo e a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio intelectual e financeiro.

Literatura Citada

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.

BOCHOW H.; EL-SAYED S. F.; JUNGE H. Use of *Bacillus subtilis* strain FZB24 as biocontrol agent. *Journal of Plant disease and Protection*, v.108, 21-30, 2001.

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

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

EL-HAMSHARY O. I. M., KHATTAB, A. A. Evaluation of Antimicrobial Activity of *Bacillus*

subtilis and *Bacillus cereus* and Their Fusants Against *Fusarium solani*. *Research Journal of Cell and Molecular Biology*, 2(2): 24-29, 2008.

FIGUEIRA, E. L. Z.; COELHO, A. R.; ONO, E. Y. S.; HIROOKA, E. Y. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 24, n.2, p.359-378, 2003.

FIGUEIREDO J. E. F., TEIXEIRA M. A., BRESSAN W., PINTO N. F. J., CASELA C. R. Avaliação da atividade antagonista da bactéria endofítica CNPMS-22 sobre fungos fitopatogênicos in vitro Embrapa Milho e Sorgo, Comunicado Técnico, Identificador: 23482, 2011a.

FIGUEIREDO J. E. F., TEIXEIRA M. A., BRESSAN W., PINTO N. F. J., CASELA C. R., JUNIOR A. C., QUINTÃO P. L. Avaliação da atividade antagonista da bactéria endofítica CNPMS-22 sobre fungos fitopatogênicos in vitro. Embrapa Milho e Sorgo, Comunicado Técnico, Identificador: 23483, 2011b.

FIGUEIREDO, J. E. F.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; QUINTAO, P. L.; CORREA, J. A.; BRESSAN W.; PINTO, N. F. J.; CASELA, C. R. Atividade antagonista da bactéria endofítica CNPMS22 contra fungos de sementes do milho (*Zea mays*). In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 4., 2010, Goiânia. Potencialidades, desafios e sustentabilidade: resumos expandidos... Goiânia: ABMS, 2010a.

FIGUEIREDO, J. E. F.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; BRESSAN, W.; PINTO, N. F. J. de.; CASELA, C. R. Atividade antagonista in vitro de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 4., 2010, Goiânia. Potencialidades, desafios e sustentabilidade: resumos expandidos... Goiânia: ABMS, 2010a.

FUTRELL, M.C.; KILGOORE, M. Poor stands of corn and reduction of root growth caused by *Fusarium moniliforme*. *Plant Disease Reporter*, v. 53, p. 213-215, 1969.

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

LUZ, W. C. Combinação dos tratamentos biológico e químico de semente de milho. *Fitopatologia Brasileira*, 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*, v. 26, p. 16-20, 2001.

MEIRELLES, P. G.; BIAZON, L.; ONO, M. A.; da SILVA, A. P.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Produção e caracterização de exoantígenos de *Fusarium verticillioides*. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 27, n. 1, p. 71-80, 2006.

MORSY E.M., ABDEL-KAWI K.A., KHALIL M.N.A. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents gainst *Fusarium solani* on tomato plants. *Egyptian*

Journal of Phytopathology, v.. 37, p. 47-57, 2009.

MUNKVOLD, G. P. Seed pathology progress in academia and industry. Annual review of phytopathology, v. 47, p. 285-311, 2009.

NERBASS, F. R.; CASA, R. T.; ANGELO, H. R. Sanidade de sementes de milho comercializadas na safra agrícola de 2006/07 em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. Revista de Ciências Agroveterinárias, v. 7, n. 1, p. 30-36, 2008.

ONO, E. Y. S.; FUNGARO, M. H. P.; SOFIA, S. H.; MIGUEL, T. A.; SUGIURA, Y.; HIROOKA, E. Y. *Fusarium verticillioides* Strains Isolated from Corn Feed: Characterization by Fumonisin Production and RAPD Fingerprinting. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.53, n.4, p. 953-960, 2010.

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

SYDENHAM, E. W.; MARASAS, W. F. O.; SHEPHARD, G. S.; THIEL, P. G.; HIROOKA E. Y. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of animal mycotoxicosis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, V. 40, p. 994-997, 1992.

WIGHTWICK, A.; WALTERS, R.; ALLISON, G.; REICHMAN, S.; MENZIES, N. Environmental risks of fungicides used in horticultural production systems. In: Fungicides, Edited by Odile Carisse, Publisher: InTech, Agricultural and Biological Sciences, p. 273-304. 2010. DOI: 10.5772/555

UENO, Y. Risk of multi-exposure to natural toxins. Mycotoxins, v. 50, p. 13-22, 2000.

Tabela 1: Diferença média de estande, altura de planta e peso aéreo seco de plantas de milho crescidas em solo infestado (SI) e solo não infestado (SNI) com *Fusarium verticillioides*.

Tratamento de Semente*	Estande**		Altura de planta (cm)		Peso Seco Parte Aérea (g)	
	SI	SNI	SI	SNI	SI	SNI
Não tratada	2,62 Aa	4,00 Ab	65,14 Aa	85,28 Ab	2,48 Aa	3,59 ABb
Fungicida (Captan)	3,5 Ba	3,37 Aa	72,21 Aa	95,42 Bb	2,71 ABa	4,55 Bb
Bactéria	3,12 ABa	4,00 Aa	86,25 Bb	77,91 Aa	3,77 Ba	3,33 Aa

*medias seguidas de letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, analisando cada uma das variáveis separadamente. Medias seguida de letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, analisando cada uma das variáveis separadamente.

**Para o cálculo do estande se considerou o plantio de 4 sementes por vaso.

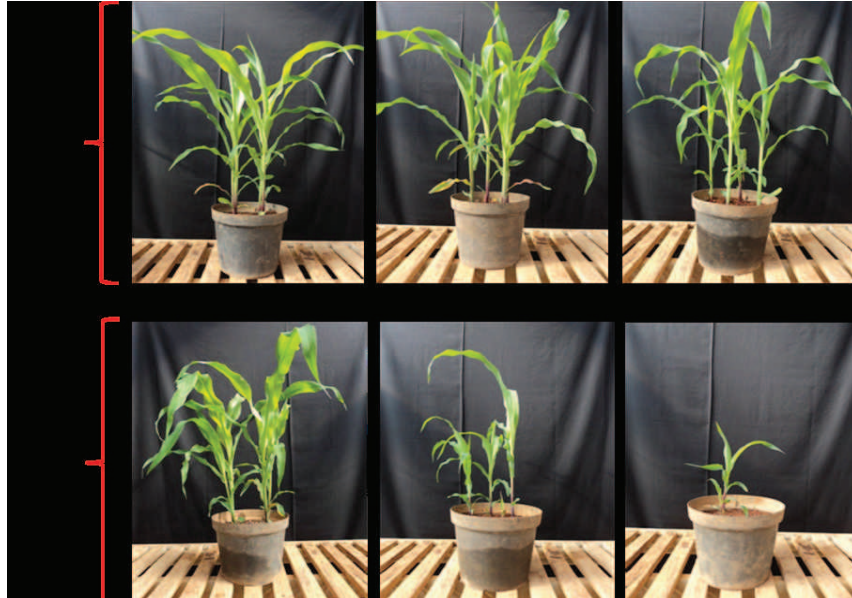


Figura 1: Efeito dos tratamentos de sementes de milho com a bactéria biofungicida CNPMS22 e com fungicida em plantas crescidas em casa de vegetação, empregando solo infestado e não infestado com *Fusarium verticillioides*.