

**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 Lanza<sup>1</sup>, José Edson Fontes Figueiredo<sup>2</sup>, Rodrigo Veras da Costa<sup>3</sup>, Lorena de Oliveira Moura<sup>4</sup>, Marielle Martins Marcondes<sup>5</sup>, Dagma Dionisia da Silva<sup>6</sup>, Luciano Viana Cota<sup>7</sup>, Carla Lima Corrêa<sup>8</sup> e Alessandro Nicoli<sup>9</sup> Talita Coeli Dangelis de Aparecida Ramos<sup>10</sup>.

<sup>1,9</sup>Doutorando Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. <sup>1</sup>[falanza@bol.com.br](mailto:falanza@bol.com.br), <sup>9</sup>[alessandro.nicoli@ufv.br](mailto:alessandro.nicoli@ufv.br)  
<sup>2,3,6,7</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. <sup>2</sup>[jeff@cnpms.embrapa.br](mailto:jeff@cnpms.embrapa.br) <sup>3</sup>[veras@cnpms.embrapa.br](mailto:veras@cnpms.embrapa.br)  
<sup>6</sup>[dagma@cnpms.embrapa.br](mailto:dagma@cnpms.embrapa.br) <sup>7</sup>[lvkota@cnpms.embrapa.br](mailto:lvkota@cnpms.embrapa.br) <sup>4</sup>Acadêmica Universidade Federal de São João Del Rei/Campus Sete Lagoas, MG. [lorena.om@hotmail.com](mailto:lorena.om@hotmail.com) <sup>5</sup>Mestranda Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR. [m\\_lelinha@hotmail.com](mailto:m_lelinha@hotmail.com) <sup>8</sup>Pós-Doutoranda Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG [correa.carla@yahoo.com](mailto:correa.carla@yahoo.com) Acadêmica UNIFEMM, Sete Lagoas, MG [talita.tchely@hotmail.com](mailto:talita.tchely@hotmail.com) <sup>2</sup>Autor para correspondência [jeff@cnpms.embrapa.br](mailto: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 striticum*, *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 moído) 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

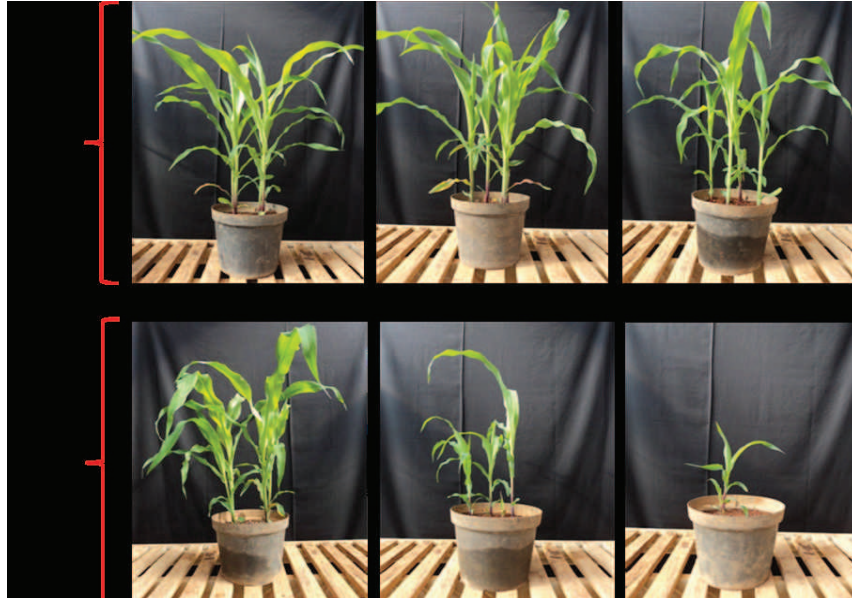
UENO, Y. Risk of multi-exposure to natural toxins. Mycotoxins, v. 50, p. 13-22, 2000.

**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
<b>Não tratada</b>	2,62 Aa	4,00 Ab	65,14 Aa	85,28 Ab	2,48 Aa	3,59 ABb
<b>Fungicida (Captan)</b>	3,5 Ba	3,37 Aa	72,21 Aa	95,42 Bb	2,71 ABa	4,55 Bb
<b>Bactéria</b>	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*.