

## **Tecnologia biológica contendo *Paenibacillus polymixa* para controle de doenças e aumento da absorção de N<sup>1</sup>**

Talles Henrique Pereira Alves<sup>2</sup>, Gisele de Fátima Dias Diniz<sup>3</sup>, Ivanildo Evódio Marriel<sup>4</sup>,  
Christiane Abreu de Oliveira Paiva<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo CNPq. <sup>2</sup> Estudante do curso de Engenharia Agrônoma da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. <sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais. <sup>4</sup> Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

### **INTRODUÇÃO**

O milho é uma cultura exigente em nitrogênio (N), sendo este um dos nutrientes que mais limita a produção de grãos, pois grande parte do N absorvido é exportada para os grãos (García, 2005; Ciampitti et al., 2010). Portanto, para que atinja altas produtividades, essa cultura demanda grande uso de fertilizantes nitrogenados que têm um custo elevado e, se manejados incorretamente, acarretam perdas por processos de lixiviação, volatilização e erosão. Neste contexto, pesquisas sobre o processo da fixação natural de N se mostram importantes (Saikia; Jain, 2007; Duete et al., 2008). Entre as possibilidades para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados e aumento na produtividade, estão os microrganismos promotores de crescimento das plantas (MPCP) que, além de serem capazes de fixar nitrogênio atmosférico e solubilizar nutrientes, podem conferir outros benefícios à planta, como a produção de fito-hormônios (Santner; Estelle, 2009), como o ácido indolacético (AIA). Além disso, os MPCP são capazes de produzir compostos antifúngicos e enzimas hidrolíticas que atuam inibindo fitopatógenos (Mabood et al., 2014), o que pode representar uma alternativa promissora para reduzir a dependência no uso de agroquímicos, sendo uma opção segura ao meio ambiente e de baixo custo, comparada aos métodos convencionais (Silva et al., 2003).

No milho, um dos principais patógenos que atacam sementes e grãos é o *Fusarium verticillioides* (Ribeiro et al., 2005; Nerbass et al., 2008), provocando apodrecimento do colmo, da espiga e da raiz, além de produzir toxinas que se acumulam nos grãos (Madrigal et al., 2017).

Entre os MPCP está o *Paenibacillus polymyxa*, que se trata de um grupo de rizobactérias que possuem uma grande variedade de hospedeiros, capacidade de formar endósporos e produzir diversos tipos de antibióticos, o que faz dessas bactérias potenciais agentes de biocontrole (Timmusk et al., 2005). Neste sentido, este estudo teve como objetivo verificar a eficiência de isolados de *P. polymyxa* na promoção de crescimento de planta, quanto a capacidade de produção do hormônio de crescimento AIA, ação de biocontrole sobre *F. verticillioides* e aumento de absorção de N em plantas de milho.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

**Produção de Ácido Indolacético (AIA), avaliação do antagonismo contra *F. verticillioides* e produção de compostos voláteis por isolados de *P. polymyxa***

Sete isolados de *P. polymyxa* obtidos do Laboratório de Microbiologia dos Solos da Embrapa Milho e Sorgo foram utilizados para os testes de produção de AIA, antagonismo e produção de compostos voláteis. Para a avaliação da produção do fito-hormônio AIA, foi utilizada a metodologia descrita por Sarwar e Kremer (1995). Para a avaliação do antagonismo dos isolados de *P. polymyxa*, foram utilizados dois isolados do patógeno de milho *F. verticillioides* com grande capacidade de produzir fumonisinas (CML2743) e grande agressividade para plantas de milho (CML2778). O método utilizado foi o de confronto direto, e a medição do raio da colônia do fitopatógeno foi realizada na presença e ausência dos microrganismos antagonistas cerca de sete dias após a incubação a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz. Para a produção de compostos voláteis pelos isolados, foi cultivado cada microrganismo em placas de Petri separadas, para evitar o contato físico pelo meio sólido. Para montagem do ensaio, foram retiradas as tampas das placas de Petri, e as placas contendo *F. verticillioides* foram invertidas sobre as placas de *P. polymyxa*, lacradas e incubadas, como a metodologia descrita por Bruce et al. (2003). Após sete dias de incubação, foi avaliada a inibição do crescimento micelial do patógeno, medindo-se o raio (cm) médio das colônias do patógeno em todos os tratamentos contendo o patógeno na presença e ausência de cada isolado de *P. polymyxa*.

### **Experimento em casa de vegetação**

Um experimento em vasos de 15 kg foi conduzido em casa de vegetação para avaliar os efeitos da inoculação de cepas de *P. polymyxa* na produção de biomassa da parte aérea (matéria seca), raiz (peso seco) e grãos, usando o híbrido de milho P3862h Pioneer. O experimento consistiu em um fatorial 3x8 disposto em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os fatores foram os três níveis de N (0, 90 e 180 kg ha<sup>-1</sup> de N) e oito tipos de inoculação, seis cepas de bactérias *P. polymyxa*, um controle sem inoculação além de um controle positivo (A1) contendo *Azospirillum* spp., bactéria conhecida pelo potencial na disponibilização de nitrogênio para as plantas.

Aos 60 dias, foram realizadas medidas de diâmetro basal do colmo (DBC) e altura de plantas (AP). A colheita foi realizada 90 dias após o plantio, todas as plantas foram secas em estufa a fim de obter matéria seca da parte aérea (MSPA) e peso seco das raízes (PSR), além do peso de mil grãos (PMG).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Produção de Ácido Indolacético (AIA)**

Os sete isolados de *P. polymyxa* avaliados apresentaram a habilidade de sintetizar AIA (> 1,0µg.mL<sup>-1</sup>) de forma moderada e alta. De acordo com a concentração de AIA obtida, temos: < 1,0µg.mL<sup>-1</sup> (baixa produção); 1-10µg.mL<sup>-1</sup> (média produção) e 11-50µg.mL<sup>-1</sup> (alta produção) (Kavamura et al., 2013). Os isolados de *P. polymyxa* LIS 01 (12,62µg.mL<sup>-1</sup>) e LIS 02 (8,75µg.mL<sup>-1</sup>) apresentaram maior produção de AIA, não havendo diferença significativa entre eles. Os demais isolados apresentaram produção de AIA com valores entre 4,93 e 2,10 µg.mL<sup>-1</sup>.

### **Teste de antagonismo contra *F. verticillioides* e Produção de compostos voláteis pelos isolados**

As estirpes que apresentaram maior antagonismo contra o *F. verticillioides* CML2743, em confronto direto, foram LIS 08 e LIS 04, ambas com média de inibição igual a 67,5%. Para o *F. verticillioides* CML2778 as estirpes LIS 06 e LIS 01 foram as que apresentaram maior antagonismo com 65% de inibição. As demais estirpes também inibiram o crescimento do fungo com valores variando de 60% a 65% (Tabela 1).

**Tabela 1.** Média do raio da colônia e porcentagem de inibição do crescimento de *Fusarium verticillioides* CML2743 e CML2778 em teste de confronto direto com isolados de *Paenibacillus polymyxa* em relação ao controle contendo somente *F. verticillioides*.

Tratamento	CML 2743		CML 2778	
	Média	PI* (%)	Média	PI* (%)
Controle	4,00a	-	4,00a	-
LIS 01	1,70b	57,5	1,42d	65,0
LIS 03	1,67b	58,25	1,50c	62,5
LIS 02	1,67b	58,25	1,50c	62,5
LIS 06	1,60c	60,0	1,40d	65,0
LIS 07	1,55c	61,25	1,62b	60,0
LIS 04	1,32d	67,5	1,50c	62,5
LIS 08	1,30d	67,5	1,47c	63,5

\* Porcentagem de inibição obtida pelo teste de confronto direto entre os isolados de *Paenibacillus polymyxa* e *Fusarium verticillioides*. Letras iguais não diferem entre si na coluna pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Os isolados apresentaram elevada capacidade de inibir *F. verticillioides*, não sendo observado crescimento significativo de hifas no meio de cultura. Este fato provavelmente ocorreu pela produção de compostos voláteis, pois não havia contato físico entre o patógeno e os isolados antagonistas para a emissão de substâncias líquidas ou sólidas no meio de cultura causando inibição.

## Experimento em casa de vegetação

### Diâmetro basal do colmo - 60 dias (DBC), Altura de planta - 60 dias (AP)

O DBC apresentou variação conforme as dosagens da adubação nitrogenada, com valores mais altos na dose de 180 kg ha<sup>-1</sup>. No nível de 0 kg ha<sup>-1</sup> as plantas inoculadas com as estirpes LIS01 (10,39 mm) e LIS 02 (9,49 mm) apresentaram diâmetros maiores que as demais. Com 180 kg ha<sup>-1</sup> de N, não houve diferença significativa, mas a estirpe LIS 07 com 13,49 mm se destacou. No nível de 90 kg ha<sup>-1</sup> de N, porém, não houve diferença estatística entre os tratamentos, com valores próximos aos do controle.

Para altura de plantas aos 60 dias (AP) não houve variação estatística em relação aos níveis de nitrogênio entre 90 e 180 kg ha<sup>-1</sup>. No entanto, dentro de cada nível, as fontes de inóculo tiveram efeitos significativos na altura, comparadas ao controle. Com 0 kg ha<sup>-1</sup> de N, as plantas inoculadas com LIS04, LIS02, LIS01, LIS06 e A1, respectivamente, apresentaram AP de 78,83 cm; 78,67 cm; 78,50 cm, 74,67 cm e 78,00 cm. Nos níveis de 90 e 180 kg ha<sup>-1</sup> de N, não houve acréscimo de altura significativo nos tratamentos com inóculos em relação ao controle.

### Matéria seca da parte aérea (MSPA), Peso seco de raízes (PSR)

A variação estatística da MSPA, em função do inóculo, ocorreu somente com 180 kg ha<sup>-1</sup> de N, sendo que o aumento foi com a inoculação de LIS08 (34,32%), LIS02 (32,15%) e A1 (31,96%), que foram diferentes significativamente quando comparados ao controle (Tabela 2).

Para peso seco de raízes, nos tratamentos com 90 kg ha<sup>-1</sup>, não foi observado aumento em relação ao controle. Em contrapartida, no nível de 0 kg ha<sup>-1</sup>, todos os tratamentos conferiram acréscimo de peso em relação ao controle, com destaque para o A1, LIS08, LIS01 e LIS04 que tiveram os maiores valores, porém sem diferença estatística (Tabela 2).

**Tabela 2** Média de matéria seca da parte aérea (MSPA) e peso seco de raiz (PSR) em razão das diferentes fontes de inoculação e níveis de adubação nitrogenada em planta de milho.

Inoculação <sup>2</sup>	MSPA (%) <sup>1</sup>			PSR (g) <sup>1</sup>		
	0 kg/ha N	90 kg/ha N	180 kg/ha N	0 kg/ha N	90 kg/ha N	180 kg/ha N
Controle	25.76 a	28.74 a	29.48 b	13.84 a	39.79 a	38.11 b
LIS01	24.21 b	30.20 a	30.08 b	21.41 a	34.49 b	42.74 a
LIS02	25.75 a	27.91 a	32.15 a	16.28 a	32.57 b	32.48 b
LIS04	26.65 a	26.82 a	29.68 b	19.49 a	30.42 b	37.01 b
LIS06	22.79 b	30.61 a	29.91 b	18.09 a	30.03 b	44.88 a
LIS07	22.88 b	28.41 a	30.83 b	18.99 a	32.70 b	43.60 a
LIS08	24.60 b	28.99 a	34.32 a	22.28 a	27.58 b	38.52 b
A1	25.43 a	29.64 a	31.96 a	25.26 a	37.96 a	36.75 b

<sup>1</sup>Letras iguais não diferem entre si na coluna pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

<sup>2</sup> O tratamento controle consiste na planta de milho não inoculada e LIS 01 a 07, numeração das cepas avaliadas de *P. polymyxa* e A1 *Azospirillum* spp.

### Peso de mil grãos (PMG)

Diante das três doses de nitrogênio testadas associadas às diferentes fontes de inoculação, para PMG, tem-se que na dose de 0 kg ha<sup>-1</sup> apenas dois inóculos obtiveram peso de grãos significativamente maior que o controle, LIS07 e A1 (Tabela 3). Com a dose de 90 kg ha<sup>-1</sup> dois outros diferenciaram do controle, apresentando ligeiro aumento, são A1 (185,92g) LIS08 (182,14g) e LIS01 (181,71g). Já em 180 kg ha<sup>-1</sup>, LIS04, A1 e LIS06 foram as melhores para o incremento de peso aos grãos.

**Tabela 3.** Média de peso de mil grãos (PMG) em razão das diferentes fontes de inoculação e níveis de adubação nitrogenada em planta de milho.

Inoculação <sup>2</sup>	Peso 1.000 grãos (g) <sup>1</sup>		
	0 kg ha <sup>-1</sup> N	90 kg ha <sup>-1</sup> N	180 kg ha <sup>-1</sup> N
Controle	157.57 c	179.04 c	159.52 d

LIS01	157.42 c	181.71 b	149.00 e
LIS02	152.76 d	177.65 c	159.03 d
LIS04	124.92 e	169.63 d	196.90 a
LIS06	152.40 d	171.55 d	175.31 b
LIS07	167.28 b	177.18 c	164.29 c
LIS08	158.15 c	182.14 b	160.43 d
A1	191.82 a	185.92 a	173.83 b

<sup>1</sup> Letras iguais não diferem entre si na coluna pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

<sup>2</sup> O tratamento controle consiste na planta de milho não inoculada e LIS 01 a 07, numeração das cepas avaliadas de *P. polymyxa* e A1 *Azospirillum* spp.

## CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados obtidos em escala de bancada com as estirpes de *P. polymyxa* testadas evidenciam um potencial no uso como agentes de biocontrole contra *F. verticillioides*. Duas cepas (LIS 01 e LIS 06) apresentaram inibição de 65% do crescimento do fitopatógeno e todas inibiram em 100% o crescimento do fitopatógeno pela liberação de compostos voláteis.

A cultura do milho respondeu significativamente aos três níveis de adubação e, para o nível de 0 kg ha<sup>-1</sup>, destaca-se a estirpe LIS01 que obteve resultados com valores acima do controle nos parâmetros de DBC, AP e PSR.

Para 90 kg ha<sup>-1</sup>, destaca-se a estirpe LIS01 que apresenta valores pouco acima do controle em quase todos os parâmetros analisados, exceto para PSR e MSPA.

Já para 180 kg ha<sup>-1</sup> de N, houve variações pouco expressivas em todos os parâmetros, destacando-se apenas o PMG obtido com as estirpes LIS04 e LIS06, que foi expressivamente maior que os demais tratamentos.

É fundamental avaliar o papel dessas estirpes como fungicida e promotoras de crescimento em condições de campo e em mistura com outras bactérias.

## REFERÊNCIAS

BRUCE, A.; STEWART, D.; VERRALL, S.; WHEATLEY, R. E. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 2, p. 101-108, 2003.

CIAMPITTI, I. A.; BOXLER, M.; GARCÍA, F. O. Nutrición de maíz: requerimientos y absorción de nutrientes. **Informaciones Agronómicas**, v. 48, p. 14-18, 2010.

DUETE, R. R. C.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. da; TRIVELIN, P. C. O.; AMBROSANO, E. J. Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (15N) pelo milho em Latossolo Vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 1, p. 161-171, 2008. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832008000100016>>. Acesso em: 10 ago. 2020.

GARCÍA F. **Criterios para el manejo de la fertilización del cultivo de maíz**. [S.l.]: IPNI, 2005. 19 p.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; AVILA, L. A. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013.

MABOOD, F.; ZHOU, X.; SMITH, D. L. Microbial signaling and plant growth promotion. **Canadian Journal Plant Science**, v. 94, n. 6, p. 1051-1063, 2014.

MADRIGAL, K. Y. L.; CASTRO, E. S.; VÁZQUEZ, C. L. C.; CORONA, C. P. L.; MENDOZA, I. E. M. Pathogenic and genetic variability of *Fusarium verticillioides* from maize in northern Mexico. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 39, n. 4, p. 486-496, 2017.

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.

RIBEIRO, N. A.; CASA, R. T.; BOGO, A.; SANGOI, L.; MOREIRA, E. N.; WILLE, L. A. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1003-1009, 2005.

SAIKIA, S. P.; JAIN, V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma? **Current Science**, v. 92, n. 3, p. 317-322, 2007.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. **Nature**, v. 459, p. 1071-1078, 2009.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 282-285, 1995.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MOUNTEER, A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, v. 151, n. 1, p. 42-46, 2003.

TIMMUSK, S.; GRANTCHAROV, N.; WAGNER, E. G. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. **Applied of Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7292-7300, 2005.