

Seleção e avaliação de microrganismos antagonistas a *Macrophomina phaseolina* em milho⁽¹⁾

Maria Cristina Kalil Rocha⁽²⁾, Micaele Rodrigues de Souza⁽³⁾, Rodrigo Veras da Costa⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Trabalho financiado pela Simbiose-AGRO e CNPq. ⁽²⁾ Estudante de graduação, Instituto Federal do Tocantins, bolsista Pibic/CNPq. ⁽³⁾ Bolsista, Embrapa Milho e Sorgo. ⁽⁴⁾ Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

Resumo – O fungo *Macrophomina phaseolina*, agente causal da podridão-de-carvão-do-milho, infecta mais de 500 espécies de plantas e é capaz de permanecer viável no solo por muitos anos. No milho, o patógeno causa danos que levam a perdas de até 25 sacas por hectare. Diante da dificuldade de manejo da doença, o objetivo deste trabalho foi selecionar e testar potenciais antagonistas para o biocontrole de *M. phaseolina* em milho. In vitro, avaliou-se a compatibilidade entre cepas de antagonistas. Em campo, o híbrido MG447 foi semeado na safrinha de 2024, na fazenda Invernadinha, no município de Paraíso, TO. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições. As parcelas possuíam quatro linhas de 5 m, com 0,5 m de espaçamento entre linhas e média de 65 mil plantas/ha. Os tratamentos foram: T1 (*Bacillus* spp. cepa 1); T2 (*Bacillus* spp. cepa 2); T3 (*Paenibacillus* spp. cepa 3); T4 (*Pseudomonas* spp. cepa 4); T5 (*Bacillus* spp. cepa 5); T6, T7 e T8 (*Actinomiceto* cepa 6, 7 e 8 respectivamente); T9, T10, T11, T12 e T13 (*Trichoderma* spp. isolados 9, 10, 11, 12 e 13 respectivamente); T14 (testemunha inoculada apenas com o patógeno); e T15 (testemunha não inoculada). Os antagonistas foram inoculados via tratamento de sementes, e o patógeno foi inoculado pelo método do palito. Quarenta e dois dias após a inoculação do patógeno, realizou-se coleta de colmo para atribuição de notas de severidade de doença por meio de escala diagramática. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). As médias de severidade diferiram em três grupos. O tratamento T15 apresentou a menor média (1,56), seguido de T10 (5,33). As maiores médias foram T11 (7,9) e T14 (7,73). Os tratamentos T1, T2, T3, T5, T10 e T12 integram o grupo com a menor média de severidade doença de colmo (média do grupo = 6,01). Das combinações testadas entre cepas, observou-se que o isolado 4 (*Pseudomonas* spp.) foi incompatível com todos os demais e o isolado que apresentou maior compatibilidade foi o 3 (*Paenibacillus* spp), sendo incompatível apenas com o isolado 4 (*Pseudomonas* spp.). Portanto combinações envolvendo a cepa 3 se mostraram promissoras para o biocontrole de *M. phaseolina*.

Termos para indexação: *Zea mays*, bioinsumo, controle biológico.

Selection and evaluation microorganisms antagonistic to *Macrophomina phaseolina* in maize

Abstract – The fungus *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot in corn, infects more than 500 plant species and is capable of remaining viable in the soil for many years. In corn, the pathogen causes damage leading to losses of up to 25 bags per hectare (approximately 1,500 kg/ha). Given the difficulty in managing the disease, the objective of this study was to select and test potential antagonists for the biocontrol of *M. phaseolina* in corn. In vitro, the compatibility between antagonist strains was evaluated. In the field, the MG447 hybrid was sown in the safrinha (second season) of 2024, at the Invernadinha farm, in the municipality of Paraíso, State of Tocantins, Brazil. The experimental design was a randomized block design with four replications. The plots consisted

of four 5-meter rows, with 0.5 m spacing between rows and an average of 65,000 plants/ha. The treatments were: T1 (*Bacillus* spp. strain 1); T2 (*Bacillus* spp. strain 2); T3 (*Paenibacillus* spp. strain 3); T4 (*Pseudomonas* spp. strain 4); T5 (*Bacillus* spp. strain 5); T6, T7, and T8 (*Actinomycete* strains 6, 7, and 8 respectively); T9, T10, T11, T12, and T13 (*Trichoderma* spp. isolates 9, 10, 11, 12, and 13 respectively); T14 (Inoculated control, with pathogen only); T15 (Non-inoculated control). The antagonists were inoculated via seed treatment and the pathogen was inoculated using the toothpick method. Forty-two days after pathogen inoculation, stover collection was performed to assign disease severity scores using a diagrammatic scale. The results were subjected to analysis of variance and the treatment means were grouped by the Scott-Knott test. The severity means differed into three groups. Treatment T15 presented the lowest mean (1.56), followed by T10 (5.33). The highest means were T11 (7.9) and T14 (7.73). Treatments T1, T2, T3, T5, T10, and T12 composed the group with the lowest mean stalk rot disease severity (group mean = 6.01). Of the strain combinations tested, it was observed that isolate 4 (*Pseudomonas* spp.) was incompatible with all others, and the isolate that presented the highest compatibility was 3 (*Paenibacillus* spp.), being incompatible only with isolate 4 (*Pseudomonas* spp.). Therefore, combinations involving strain 3 proved promising for the biocontrol of *M. phaseolina*.

Index terms: *Zea mays*, bioinput, biological control.

Introdução

Macrophomina phaseolina é um fungo patógeno de solo pertencente à família Botryosphaeriaceae, considerado um dos mais importantes patógenos de plantas presentes em países tropicais e subtropicais, de clima árido e semiárido (Bernardes, 2023). O patógeno possui potencial para infectar mais de 500 espécies de plantas, dentre elas, culturas que têm elevado valor agrônômico, como milho, sorgo, soja, algodão e outras diversas (Gupta et al., 2012; Mendoza et al., 2015). Essa característica faz com que a rotação de culturas seja ineficiente para a redução do potencial de inóculo do fungo.

O cultivo de milho (*Zea mays* L.) está entre as mais importantes atividades agrícolas desenvolvidas em todo o mundo, uma vez que a cultura se estabeleceu como carro-chefe de grandes cadeias de produção, seja no ramo da nutrição humana e animal, seja na indústria química, farmacêutica e de combustíveis (Kang et al., 2023).

No milho, a *M. phaseolina* causa a doença conhecida como podridão-de-carvão, responsável por grandes perdas nos sistemas de produção em todo o mundo. O estado do Tocantins tem revelado a necessidade de atenção à doença, frente à elevada ocorrência e ao grande potencial de perdas para a região, especialmente em períodos mais secos (Costa et al., 2019).

Diante da dificuldade de se empenhar medidas efetivas de controle a *M. phaseolina*, bem como sua agressividade e danos causados à cultura do milho, é de extrema importância a condução de pesquisas, cujo objetivo seja o estabelecimento de tecnologias e estratégias alternativas para o controle do patógeno (Santos et al., 2010). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a compatibilidade entre potenciais antagonistas a *M. phaseolina* e testar em campo o desempenho desses isolados, visando o controle biológico da podridão-de-carvão na cultura do milho.

Por apresentar informações inéditas e atualizadas sobre a viabilidade técnica de manejo da podridão-de-carvão (*M. phaseolina*), apresentando uma forma de manejo ecologicamente correta e sustentável de um dos principais patógenos que afetam inúmeras culturas agrícolas de importância

social e econômica para o Brasil, este trabalho contribui para o atendimento do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável - ODS 2 da Agenda 2030 proposta pela Organização das Nações Unidas ONU: Objetivo 2. Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável, mais especificamente para com a meta 2.4:

Até 2030, garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e implementar práticas agrícolas resilientes, que aumentem a produtividade e a produção, que ajudem a manter os ecossistemas, que fortaleçam a capacidade de adaptação às mudanças climáticas, às condições meteorológicas extremas, secas, inundações e outros desastres, e que melhorem progressivamente a qualidade da terra e do solo (Nações Unidas, 2024).

Material e métodos

Teste de Compatibilidade

O teste foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Pesca, Aquicultura e Sistemas Agrícolas, no município de Palmas, TO. Para a análise de compatibilidade, foram selecionadas 8 cepas de bactérias antagonistas (cepas 1, 2 e 5 - *Bacillus* spp.; cepa 3 - *Paenibacillus*; cepa 4 - *Pseudomonas*; cepas 6, 7 e 8 - *Actinomicetos*) pertencentes à Coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). O critério para a seleção das cepas foi seu desempenho nos ensaios in vitro (pareamento e compostos voláteis) realizados previamente no Laboratório de Fitopatologia, que comprovaram o antagonismo à *M. phaseolina*.

Os microrganismos foram cultivados em meio líquido TSB (Trypticase Soy Broth) e mantidos por 48 horas em agitação a 140 rpm e temperatura de 28 °C. Em seguida, padronizaram-se as suspensões das cepas para a concentração de 108 UFC/ml, através de espectrofotometria.

Para avaliar a compatibilidade, todas as cepas foram combinadas entre si formando 28 pares. Em cada teste, os pares foram adicionados em placas de Petri contendo meio TSA (Tryptic Soy Agar) através de dois métodos diferentes de aplicação. A primeira cepa aplicada pelo método de espalhamento, em que foram depositados na placa de Petri 100 µl da sua suspensão, seguida do espalhamento com alça de Drigalski; em consequente, foi utilizado o método em gotas para a aplicação da segunda cepa, sendo depositadas três gotas de 20 µl (cada) sobre o primeiro isolado espalhado na placa.

O método de espalhamento tem a finalidade de fazer com que o isolado fique amplamente distribuído sobre a placa de Petri, e o método em gotas objetiva a concentração em uma região específica da placa, permitindo que sejam identificadas as interações locais e se há a ocorrência de inibição de crescimento entre dois isolados. Desse modo, cada uma das 28 combinações de antagonistas foi testada de duas maneiras diferentes, alternando os métodos de aplicação entre os isolados de cada par. Portanto, o ensaio contou com 56 tratamentos e três repetições, totalizando 168 placas. Após 5 dias de preparo do teste, as placas foram avaliadas quanto ao crescimento dos microrganismos e à formação de halos de inibição.

Teste de Tratamento de Sementes

O experimento foi conduzido na área experimental da Embrapa Pesca, Aquicultura e Sistemas Agrícolas, localizada na Fazenda Invernadinha, coordenadas geográficas 10°11'09" S e 48°41'12" W,

no município de Paraíso do Tocantins, TO. O plantio foi realizado na safrinha de 2023, com o híbrido K7510, em razão da baixa resistência à *M. phaseolina*, e os tratos culturais seguiram o padrão da fazenda.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com quatro repetições. As parcelas foram constituídas por quatro linhas de 5 metros, com 0,5 m de espaçamento entre linhas e média de 65 mil plantas/ha. Foram consideradas como área útil da parcela somente as duas linhas centrais, sendo as duas linhas laterais definidas como borda.

Os antagonistas foram obtidos da coleção de microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo. A inoculação das sementes foi realizada com oito diferentes cepas de bactérias e cinco isolados de fungo. Os tratamentos foram constituídos por: T1 - sementes tratadas com *Bacillus* (cepa 1); T2 - *Bacillus* (cepa 2); T3 - *Paenibacillus* (cepa 3); T4 - *Pseudomonas* (cepa 4); T5 - *Bacillus* (cepa 5); T6 - *actinomiceto* (cepa 6); T7 - actinomiceto (cepa 7); T8 - actinomiceto (cepa 8); T9 - *Trichoderma* (isolado 9); T10 - *Trichoderma* (isolado 10); T11 - *Trichoderma* (isolado 11); T12 - *Trichoderma* (isolado 12); T13 - *Trichoderma* (isolado 13); T14 - testemunha inoculada com *M. phaseolina*; e T15 - testemunha não inoculada.

Para o preparo do inóculo das bactérias antagonistas, as cepas foram cultivadas em meio líquido LB + sais (Luria Bertani), no intuito de estimular a esporulação. Os microrganismos foram mantidos por 48 horas em agitação a 140 rpm e temperatura de 28 °C. As suspensões foram padronizadas à concentração de 108 UFC/ml, através de espectrofotometria. Os inóculos dos isolados de fungo foram preparados com água estéril e padronizados à concentração de 10⁶ esporos/ml, pela contagem de esporos com Câmara de Neubauer.

Para o tratamento de sementes, foram empregados 2 ml de suspensão padronizada e 1 g de biomafix para 100 g de sementes. O tratamento de sementes foi feito no dia anterior ao plantio. A inoculação de *M. phaseolina* foi realizada em todos os tratamentos, com exceção do tratamento 15 (testemunha não inoculada), 42 dias após o tratamento de sementes. O patógeno foi inoculado nas plantas pelo método do palito, por raspagem de placas de Petri com cultivo do fungo. As plantas do tratamento T15 (testemunha não inoculada) receberam a inserção de palitos estéreis.

Para a avaliação de severidade, os colmos de todos os tratamentos foram cortados entre o entrenó da base e o entrenó de inserção da espiga e levados ao Laboratório de Fitopatologia, onde foram abertos com cortes longitudinais para avaliação da extensão das lesões, a partir da escala diagramática estabelecida por Nicoli et al. (2015). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

No teste de compatibilidade, todas as placas foram avaliadas quanto ao padrão de desenvolvimento dos microrganismos combinados. A incompatibilidade foi detectada através da formação de halos de inibição no entorno dos isolados aplicados pelo método em gotas. Observou-se que o isolado 4 foi incompatível com todos os demais. O antagonista que apresentou maior compatibilidade foi o isolado 3, sendo incompatível apenas com o isolado 4 (Tabela 1).

Lutz et al. (2004) reforçaram a importância da combinação entre microrganismos a fim de se potencializar o efeito de biocontrole almejado, porém é essencial que esses microrganismos sejam capazes de exercer uma atuação complementar, e não promovam antagonismo entre si.

Tabela 1. Resultado do teste de compatibilidade entre cepas antagonistas à *M. phaseolina* avaliados por meio do método de espalhamento e método de gotas. O sinal positivo (+) indica compatibilidade entre a combinação e o sinal negativo (-) indica incompatibilidade. Laboratório de Fitopatologia, Palmas, TO, 2023.

Cepas	1 *	2	3	4	5	6	7	8
1		+	+	-	+	+	-	-
2	+		+	-	+	+	-	-
3	+	+		-	+	+	+	+
4	-	-	-		-	-	-	-
5	+	+	+	-		-	-	-
6	+	+	+	-	-		+	+
7	-	-	+	-	-	+		+
8	-	-	+	-	-	+	+	

*Valores acima da diagonal referem-se ao método de espalhamento.

** Valores abaixo da diagonal referem-se ao método de gotas.

No teste de tratamento de sementes, foram observados três grupos de médias de severidade que se diferenciaram estatisticamente. A menor média foi obtida com a testemunha não inoculada. O segundo grupo foi constituído por quatro cepas e dois isolados, entre eles *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Trichoderma*. Já o terceiro grupo, foi formado por oito tratamentos, entre eles a testemunha inoculada com o patógeno (Tabela 2).

Tabela 2. Médias de severidade de podridão-de-carvão (*Macrophomina phaseolina*) em tratamento de sementes de milho com diferentes cepas de antagonistas e avaliados nos entrenós acima do inoculado. Fazenda Invernadinha, Paraíso do Tocantins, TO, 2023.

Tratamento	Média de severidade
T15	1,56 a
T10	5,33 b
T1	5.80 b
T5	6.05 b
T2	6.05 b
T3	6.30 b
T12	6.55 b
T8	7.02 c
T4	7.06 c
T13	7.26 c
T6	7.28 c
T9	7.37 c
T7	7.50 c
T14	7.73 c
T11	7.90 c

As três maiores médias de severidade foram obtidas pelos tratamentos T11 (7,9) T14 (7,7325) e T7 (7,5). Já as três menores médias de severidade foram expressas nos tratamentos T15 (1,5625), T10 (5,3325) e T1 (5,8) (Tabela 2).

Conclusões

Das combinações testadas entre cepas antagonistas, catorze mostraram-se potencialmente promissoras para utilização no controle biológico de doenças de plantas, apontando um possível efeito sinérgico que deverá ser comprovado com experimentos futuros conduzidos em condições de campo. No tratamento de sementes, as cepas 1, 2, 3 e 5, e os isolados 10 e 12 reduziram a severidade de doença de colmo. Os resultados servem como referência para trabalhos futuros, que possibilitarão a formulação de um bioproduto para o controle de *M. phaseolina* na cultura do milho.

Referências

- BERNARDES, F. P. **Resistência de híbridos de milho à podridão de macrophomina e à antracnose do colmo em dois ambientes**. 2023. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/20746>. Acesso em: 10 abr. 2024.
- COSTA, R. V.; SILVA, D. D.; COTA, L. V.; CAMPOS, L. J. M.; ALMEIDA, A. R. M.; TUBIANA, D.; EVANGELISTA, B. A.; RIBEIRO, I. L. **Macrophomina phaseolina em milho safrinha**: levantamento da incidência e perdas na produtividade no estado do Tocantins. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 202). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1117367>. Acesso em: 10 abr. 2024.
- GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with especial reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 4, p. 167-180, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01884.x>.
- KANG, B.; LIU, Y.; YANG, R.; LIANG, S. Composition and physicochemical properties of corn wax. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 100, n. 10 p. 783-790, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/aocs.12717>.
- LUTZ, M. P.; WENGER, S.; MAURHOFER, M.; DEFAGO, G.; DUFFY, B. Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, n. 3, p. 447-455, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.03.002>.
- MENDOZA, J. L. H.; PÉREZ, M. I. S.; PRIETO, J. M. G.; VELÁSQUEZ, J. D. Q.; OLIVARES, J. G. G.; LANGARICA, H. R. G. Antibiosis of *Trichoderma* spp strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1093-1101, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-838246420120177>.
- NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 2**: fome zero e agricultura sustentável: erradicar a fome, alcançar a segurança alimentar, melhorar a nutrição e promover a agricultura sustentável. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/2>. Acesso em: 13 maio 2024.
- NICOLI, A.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; ZAMBOLIM, L.; LANZA, F. E.; GUIMARÃES, D. P.; LANDAU, E. C. Validação de escala diagramática para quantificação da severidade da antracnose do colmo do milho. **Ciência Rural**, v. 45, n. 10, p. 1720-1726, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141510>.