CONTROLE BIOLÓGICO DE PATÓGENOS DE SEMENTES DE MILHO COM BACTÉRIAS ISOLADAS DO SOLO

José Luiz Berger Camargo Junior (PIBIC/CNPq), David de Souza Jaccoud Filho (Orientador), e-mail: dj1002@uepg.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/DEFITO.

Ciências Agrárias, Agronomia, Fitossanidade, Fitopatologia.

Palavras-chave: *Stenocarpella, Colletotrichum, Zea mays*.

Resumo

As sementes de milho estão sujeitas a danos por fungos, sendonecessário que se realize o tratamento de semente. O controle biológico e o método de menor impacto ambiental para o controle de patógenos de culturas. Desta maneira, o trabalho terá por objetivo avaliar o potencial de inibição de isolados bacterianos rizosféricos perante os agentes etiológicos *Fusarium verticillioides, Colletotrichum graminicola* e *Stenocarpella maydis.* Suspensões bacterianas foram preparadas, as quais foram utilizadas para o tratamento de sementes de milho (previamente inoculadas com esporos dos patógenos já especificados) para testes em casa de vegetação e a campo. Desta forma as bactérias 6, 11 e 73 apresentaram potencial de controle dos fitopatógenos *Fusarium verticillioides, Colletotrichum graminicola e Stenocarpella maydis.*

Introdução

De acordo com Cortini *et al.* (2019) o milho se mostra um produto base e fundamental na produção agrícola brasileira, sendo ele cultivado em todas as regiões do País. Em seu cultivo devemos atentar os diferentes fatores que podem atrapalhar o desenvolvimento da cultura e consequentemente a produção de grãos, tais como doenças fúngicas da semente causadas por *Stenocarpella maydis*, *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum graminicola* (JACCOUD FILHO; JULIATTI, 2012).

Segundo Reis, Casa e Bresolin (2004) os fungos associados às sementes apresentam danos que interferem na podridão de sementes e emergência de plântulas, estes danos podem ser diminuídos pelo tratamento de sementes de milho. Entretanto, a utilização frequente de pesticidas pode causar efeitos nocivos à microbiologia do solo.

Os microrganismos que habitam no solo, considerada uma parte essencial, tem funções de enorme importância, funções estas consideradas atualmente como mais importantes do que previamente era imaginado e nos solos este reservatório biológico é muito grande e diversificado, podendo ser usados como controle biologico de fitopatógenos de sementes (ANDREOTE; CARDOSO, 2016).

Devido à grande importância nacional e mundial, busca-se desenvolver alternativas para a redução do uso de produtos químicos principalmente no tratamento de semente, a alternativa aqui apresentada é a utilização de bactérias oriundas do solo que poderão ajudar no desenvolvimento da agricultura e consequentemente da alimentação humana. Neste ponto, utilizou-se destas bactérias para a tentativa do controle de fitopatógenos de sementes que causam danos consideráveis na cultura do milho, diminuindo assim sua produtividade.

ISSN 1676-0093

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Aplicada, no bloco F de Agronomia, na casa de vegetação, na Fazenda Escola Capão da Onça, na Universidade Estadual de Ponta Grossa durante o período de primeiro de agosto de 2018 até 31 julho de 2019, sendo utilizado Blocos casualizados como delineamento experimental.

Os fungos fitopatógenos, e as bactérias rizosféricas utilizadas pertencem à coleção do Laboratório de Fitopatologia Aplicada, da UEPG; os isolados bacterianos são advindos de coletas realizadas em solos de todo o estado do Paraná.

Na fase pré-seleção dos isolados bacterianos foi utilizado uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA foram divididas em 4 quadrantes iguais, nas quais em cada quadrante foi riscada uma estria de isolado bacteriano. Posteriormente as placas foram incubadas por 48 horas em BOD a temperatura de 28°C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Após este período de incubação de 48 horas, foi colocado em cada placa separadamente um disco do micélio dos fitopatógenos *Fusarium verticillioides, Colletotrichum graminicola* e *Stenocarpella maydis* com 3 repetições as quais foram incubadas por 72 horas nas mesmas condições anteriores.

As placas controle foram preparadas em placas de Petri contendo BDA, sem isolados bacterianos e somente com os disco contendo micélio dos fitopatógenos separadamente, com 3 repetições e incubadas por 72 horas. Foram avaliados após 48h de forma qualitativamente, ou seja, observou se houve desenvolvimento ou não do fitopatógeno.

A segunda fase do projeto foi realizada com os pareamentos dos inoculados bacterianos selecionados. Duas estrias bacterianas em paralelo, distantes 4 cm entre si, foram realizadas em placas de Petri contendo BDA, as quais foram posteriormente incubadas nas mesmas condições da pré-seleção. Após o período de incubação das placas de Petri com as bactérias pré-selecionadas, discos com os mesmos fitopatógenos utilizados na etapa anterior foram colocados entre as estrias bacterianas. Essas placas foram incubadas novamente por um período de 72 horas.

Foram realizadas avaliações a cada 24h, sendo que a primeira só ocorreu 48h depois de colocar os discos dos fitopatógenos. Os dados foram expressos em porcentagem.

Nesta terceira fase foi realizada a implantação "*in vivo*". Foi implantado na casa de vegetação em bandejas plásticas com 32 células preenchidas com substrato. A inoculação das sementes com o patógeno seguiu o método por contato direto, que consiste no desenvolvimento dos patógenos *Fusarium verticillioides, Colletotrichum graminicola* e *Stenocarpella maydis* em meio de Ágar Batata Dextrose (BDA), em BoD, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25°C , até o fechamento da placa. Em seguida, as sementes ficaram em contato com a colônia do fungo por 48 horas (CARVALHO, 1999).

Utilizaram-se os seguintes tratamentos na terceira fase: as bactérias que foram promissoras no controle obtidas na segunda fase, também sementes sem tratamento algum denominada testemunha inoculada, um tratamento com um fungicida padrão e um tratamento com somente a semente sem inoculação denominada de testemunha.

Para a análise dos resultados foi utilizado o programa SASM-AGRI (ALTHAUS, R.A., et al., 2001). As médias, quando significativas, forão comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Na pré-seleção realizou-se avaliações qualitativas dos pareamentos múltiplos entre os fitopatógenos e quatro isolados bacterianos diferentes, sendo resultados apenas de “houve inibição” ou de “não houve inibição”. Assim, desta forma, dentre os 74 isolados bacterianos iniciais foram selecionados para o fitopatógeno *Fusarium verticillioides*, 5 isolados bacterianos (6, 11,19, 50 e 73). Já para o *Colletotrichum graminicola* foram selecionados 6 isolados bacterianos (6, 11, 47.2.1, 50, 73 e 90.4). Em relação ao patógeno *Stenocarpella maydis* foram selecionados 7 isolados bacterianos: 6, 11, 15.1, 47.2.1, 53, 73 e 90.4.

Os resultados referentes ao pareamento do patógeno *Fusarium verticillioides* com os isolados bacterianos pré-selecionados podem ser observado na Tabela 1, onde o controle do patógeno foi efetivo nos isolados bacterianos 6, 11 e 73 com uma inibição média do crescimento do halo do fitopatógeno, na ultima avaliação, de 98.8%, 98.8% e 98.9%, respectivamente.

Em relação ao fitopatógeno *Colletotrichum graminicola,* a porcentagem de inibição proporcionada pelas bactérias 47.2.1, 50 e 90.4 foram pouco promissoras na última avaliação (Tabela 1), já as bactérias 6, 11 e 73 foram promissoras obtendo controle acima de 95% desde a primeira até a última avaliação realizada, como pode ser observada na Figura 5.

Nos pareamentos com o fitopatógeno *Stenocarpella maydis* os isolados de bactérias selecionadas foram às mesmas para os outros dois patógenos estudados. Os resultados disponíveis na tabela 3 mostra novamente o percentual acima de 95% dos isolados bacterianos 6, 11 e 73, os quais podem ser observados pela diferença de crescimento na figura 6.

Tabela 1 – Dados referentes às avaliações das médias das inibições (%) no período de 48, 72 e 96 horas de crescimento do micélio dos fungos *Colletotrichum graminicola* (C), *Fusarium verticillioides* (F) e *Stenocarpella maydis* (S) apresentadas pelos isolados bacterianos 6, 11, 15.1, 19, 47.2.1, 50, 73 e 90.4.

Bactéria	% de inibição								
	48h			72h			96h		
	C	F	S	C	F	S	C	F	S
6	98 a*	81 a	94 a	99 a	95 a	97 a	99 a	98 a	98 a
11	98 a	81 a	94 a	99 a	95 a	97 a	99 a	98 a	98 a
15.1	X*	X	4 bc	X	X	22 bc	X	X	19 bc
19	X	11 b	X	X	2 c	X	X	5 b	X
47.2.1	83 bc	X	32 b	48 c	X	39 b	17 bc	X	35 b
50	87 b	18 bc	23 bc	64 b	15 b	31 b	14 bc	0 b	3 c
73	98 a	82 a	85 a	99 a	95 a	88 a	99 a	98 a	88 a
90.4	77 c	X	5 bc	53 bc	X	23 bc	21 b	X	15 bc
Con.	39 d	0 c	0 c	3 d	0 c	0 c	0 c	0 b	0 c
C.V.%	8,6	3,8	49,8	15,2	15,5	36,7	28,0	17,3	31,7

ISSN 1676-0093

*As médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

X*: Bactéria não pré-selecionada para este patógeno.

Para as avaliações em Casa de Vegetação não foi possível observar, para a maioria dos parâmetros avaliados, as bactérias selecionadas em laboratório tendo um controle significativo estatisticamente em comparação ao tratamento com fungicida.

Conclusão

Conforme observado neste trabalho, as bactérias (6, 11 e 73), isoladas de amostras de solo do estado do Paraná, apresentaram potencial de controle dos fitopatógenos *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum graminicola* e *Stenocarpella maydis*. As mesmas bactérias foram testadas em condições de casa de vegetação, porém não demonstraram o mesmo efeito observado in vitro.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a vida, sempre estar comigo e guiar todos os meus passos. Agradeço a minha família, por todo incentivo e apoio dado em todos os momentos. Agradeço ao Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho, pelas oportunidades de aprendizado e por toda a orientação. Agradeço ao CNPq, pela bolsa concedida servindo de inspiração para realização deste projeto.

Referências

ALTHAUS, R. A., CANTERI, M. G., GIGLIOTI, E.A. **Tecnologia da informação aplicada ao agronegócio e ciências ambientais: sistema para análise e separação de médias pelos métodos de Duncan, Tukey e Scott-Knott**. Anais do X Encontro Anual de Iniciação Científica, Parte 1, Ponta Grossa, p. 280 - 281, 2001.

ANDREOTE, Fernando Dini; CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira. Introdução à biologia do solo. *In*: ANDREOTE, Fernando Dini; CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira. **MICROBIOLOGIA DO SOLO**. [*S. l.*]: ESALQ, 2016

CARVALHO, J. C. B. de. **Uso da restrição hídrica na inoculação de Colletotrichum lindemuthianum em sementes de feijão (Phaseolus vulgaris L.)**. 1999. 98 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CONTINI, Elisio et al. SÉRIE DESAFIOS DO AGRONEGÓCIO BRASILEIRO**. Milho - Caracterização e Desafios Tecnológicos**, [s. l.], 2019. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/195075/1/Milho-caracterizacao.pdf. Acesso em: 22 ago. 2019.

JACCOUD FILHO, David de Souza; JULIATTI, Fernando Cezar. Principais Doenças Fungicas da Cultura do Milho. In: BARROSO , Alberto Leão de Lemos; GARCIA, José Francisco; NETO, Djalma Euzébio Simões (ed.). **Boletim Técnico: Milho: Desafios Fitossanitários e Manejo Sustentável**. [S. l.]: CRIAR, 2012.

REIS, Erlei Melo; CASA, Ricardo Trezzi; BRESOLIN, Andréa C. Reis**. Manual de Diagnose e Controle de Doenças do Milho**. [S. l.]: Graphel, 2004.