

Avaliação de bactérias endofíticas para o controle biológico da mancha foliar de *Exserohilum turcicum* em milho

Assessing of endophytic bacteria for biological control of northern corn leaf blight (*Exserohilum turcicum*)

Humberto Franco Shiomi^{1*}, Itamar Soares de Melo², Marli Teixeira de Almeida Minhoni³

RESUMO: A eficácia de nove isolados de bactérias endofíticas foi avaliada no biocontrole da mancha foliar de *Exserohilum turcicum*, pela microbiolização das sementes e da parte aérea do milho híbrido AS-1548 (72 e 24 horas antes e no mesmo dia da inoculação do patógeno) em condições de casa de vegetação. Verificou-se que *Bacillus subtilis* 0G, *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp. e *Bacillus agaradhaerens* se destacaram dos demais, quando aplicados na parte aérea, em todos os intervalos testados, com um controle na ordem de 42 a 61%. Quando as bactérias foram aplicadas nas sementes, *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp., *Ewingella americana* e *Xanthomonas axonopodis* foram os mais eficientes, com um controle entre 37 e 59%.

PALAVRAS-CHAVE: controle alternativo; queima de turcicum; bactérias antagonicas; *Zea mays*.

ABSTRACT: The efficacy of nine endophytic bacterial strains was evaluated on biocontrol of northern corn leaf blight (*Exserohilum turcicum*), by microbiolization of seeds and aerial parts of maize, hybrid AS-1548 (72 and 24 hours before and at same day of the pathogen inoculation) in greenhouse conditions. It was found that *Bacillus subtilis* 0G, *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp. and *Bacillus agaradhaerens* highlighted from the others, when applied on aerial parts of maize, in all intervals tested, presenting control in order of 42 to 61%. When the bacteria were applied on seeds, *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp., *Ewingella americana* and *Xanthomonas axonopodis* showed more efficiency, presenting control between 37 and 59%.

KEYWORDS: alternative control; *Exserohilum turcicum* leaf spot; antagonic bacteria; *Zea mays*.

¹Professor Adjunto, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) – Sinop (MT), Brasil

²Engenheiro Agrônomo, Embrapa Meio Ambiente (CNPMA) – Jaguariúna (SP), Brasil

³Professora Adjunta, Departamento de Defesa Fitossanitária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Botucatu (SP), Brasil

*Autor correspondente: hfshiomi@yahoo.com.br

Recebido em: 15/07/2013. Aceite em: 04/03/2015

INTRODUÇÃO

A mancha foliar de *Exserohilum*, “northern corn leaf blight” ou queima das folhas do milho, causada pelo fungo *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs (teleomorfo *Setosphaeria turcica*), é uma das mais importantes doenças da cultura do milho. Ela ocorre de forma generalizada em todo o mundo, podendo causar danos superiores a 50%, como resultado de desfolhamento extensivo durante o período de enchimento de grãos (FERNANDES; BALMER, 2002). No Brasil, ocorre em todas as regiões produtoras, principalmente na região Sul e nas chapadas da região Centro-Oeste (PEREIRA, 1995), onde o patógeno encontra condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento, como temperaturas moderadas (18 a 27°C), períodos prolongados de orvalho e dias nublados. O controle é feito, principalmente, por meio do uso de cultivares resistentes e químico com fungicidas específicos (PINTO, 2004).

Devido aos problemas decorrentes da utilização indiscriminada de agrotóxicos, tem-se buscado alternativas eficientes e pouco impactantes no controle de fitopatógenos (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003). Nesse contexto, os micro-organismos endofíticos têm se apresentado como uma alternativa promissora e viável para esse fim, pela ação de vários mecanismos, como antibiose, competição por espaço e nutrientes ou pela indução de resistência sistêmica no hospedeiro (AZEVEDO, 1998; VAN LOON *et al.*, 1998).

Para que haja um controle eficiente de um fitopatógeno por um determinado agente de controle biológico, há a necessidade de se levar em consideração alguns fatores, como, por exemplo, a melhor forma de introduzi-lo no hospedeiro (SILVA *et al.*, 2004) ou mesmo o momento mais adequado para a aplicação do agente de biocontrole na planta hospedeira (SHIOMI *et al.*, 2006).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da proteção conferida por bactérias endofíticas ao agente causal da mancha foliar de *Exserohilum*, aplicadas de diferentes formas: pela semente e pela parte aérea das plantas de milho em diferentes períodos (72 e 24 horas antes e no mesmo dia da inoculação do fitopatógeno).

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram testados nove isolados de bactérias endofíticas, selecionados previamente em testes de antagonismo *in vitro* (SHIOMI *et al.*, 2008), consistindo de seis isolados endofíticos do milho: *Escherichia coli* Escherich GC subgrupo B; *Morganella morganii* (Winslow) Fulton; *Ewingella americana* Grimont; *Xanthomonas axonopodis* Hasse; *Microbacterium imperiale* Steinhaus; *Bacillus agaradhaerens* Nielsen; e dos endofíticos: *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn 0G; *Bacillus*

lentimorbus Dutky e *Streptomyces* sp. Waksman & Henrici, provenientes da coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna (SP).

Para a realização dos testes, foi utilizado um genótipo de milho suscetível à doença, híbrido simples, AS-1548 (Agroeste Sul Sementes S.A.). A semeadura foi feita em vasos com cinco litros de capacidade, contendo uma mistura de latossolo vermelho-amarelo não esterilizado, N-P-K (4-14-8) a 1,0 g.dm⁻³ de solo, calcário calcítico a 1,5 g.dm⁻³ de solo e substrato comercial Multiplant (Terra do Paraíso LTDA.), na proporção 1:3 (v/v), sendo mantidos sob condições de casa de vegetação e irrigação diária.

Preparo da suspensão de micro-organismos: culturas de *E. turcicum* com 15 dias de crescimento em meio batata-dextrose-água (BDA) foram utilizadas para a obtenção de uma suspensão de conídios e padronizadas em 3.10⁶ conídios.mL⁻¹, com o auxílio de hemocitômetro. Os micro-organismos endofíticos foram multiplicados e incubados em meio caldo tripton de soja-água (TSBA) a 25 ± 2°C por 48 horas, para posterior inoculação. As suspensões de células bacterianas foram padronizadas em 10⁹ ufc.mL⁻¹, pelo ajuste de turbidez, na escala de McFarland.

Microbiolização da parte aérea: a aplicação das bactérias endofíticas se deu em 3 períodos diferentes: 72 e 24 horas antes e no mesmo dia da inoculação do patógeno, pela pulverização da parte aérea de plantas jovens (estádio de crescimento de 3 – 4 folhas) com uma suspensão do endofítico antagonista até o ponto de escorrimento. Foi adotado um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições (cinco plantas por repetição). Cada isolado endofítico testado representou um tratamento. A testemunha positiva consistiu da pulverização das plantas apenas com a suspensão do patógeno. A testemunha negativa consistiu da pulverização das plantas apenas com água destilada esterilizada, perfazendo um total de 11 tratamentos.

Microbiolização das sementes: sementes de milho foram imersas em suspensão contendo células do endofítico antagonista por 60 minutos e semeadas nos vasos contendo o substrato. Cada isolado endofítico representou um tratamento em três repetições (cinco plantas jovens por repetição), em um delineamento inteiramente ao acaso. Como testemunha negativa foram utilizadas sementes tratadas com água destilada e esterilizada, inoculadas posteriormente com água, em vez do patógeno; como testemunha positiva, sementes tratadas com água e posteriormente inoculadas com o patógeno, totalizando 11 tratamentos.

Inoculação do patógeno: decorridos 14 dias após a semeadura, no estágio de crescimento de 3 – 4 folhas, realizou-se a inoculação da parte aérea das plantas, pela pulverização de uma suspensão de conídios do patógeno, com o auxílio de um compressor de ar (10 libras.pol⁻² de pressão). Antes e após a inoculação, as plantas foram submetidas a 24 horas de incubação em câmara úmida e no escuro (23 ± 2°C), sendo, em seguida, transferidas para a casa de vegetação (25 ± 3°C), onde

foram mantidas sob irrigação diária, até o momento da avaliação dos sintomas.

Avaliação dos sintomas: avaliou-se a severidade da doença, 14 dias após a inoculação do patógeno (ESTEVES, 1989), pela adoção de uma escala de notas, conforme o descrito por FERNANDES; BALMER (2002):

- nota 1 – plantas limpas ou apresentando pontos cloróticos;
- nota 2 – pequenas lesões clorótico-necróticas de formato circular;
- nota 3 – lesões clorótico-necróticas maiores, podendo coalescer;
- nota 4 – lesões necróticas estreitas;
- nota 5 – lesões necróticas largas, com ou sem murcha e/ou seca das extremidades das folhas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e aos testes F e de Tukey (5%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes em que houve a aplicação da parte aérea das plantas com os agentes de biocontrole, os isolados *B. subtilis* OG, *B. lentimorbus*, *Streptomyces* sp. e *B. agaradhaerens* se destacaram dos demais, em todos os intervalos de aplicação testados, com um controle na ordem de 42 a 61% (Tabela 1). Resultados semelhantes obtidos por SHIOMI *et al.* (2006) mostraram que a eficiência de certas bactérias endofíticas em controlar alguns fitopatógenos pode variar em função do momento de aplicação do agente de biocontrole. Nos testes em que houve a microbiolização das sementes com os antagonistas,

observou-se que os isolados *B. lentimorbus*, *Streptomyces* sp., *Ewingella americana* e *X. axonopodis* foram os mais eficientes, com um controle relativo variando entre 37 e 59% (Tabela 2).

Os endofíticos *B. lentimorbus* e *Streptomyces* sp. foram os únicos que se mostraram eficientes no controle patógeno em todos os ensaios, indicando uma inespecificidade de ação ou mesmo a ocorrência de mais de uma forma de controle,

Tabela 2. Efeito da microbiolização de sementes de milho com endofíticos antagonistas no controle da mancha foliar de *Exserohilum turcicum*.

Isolado	Severidade da doença	Controle relativo (C.R.) (%)
Controle (água)	1,00 d*	–
Controle (<i>Exserohilum turcicum</i>)	3,40 a	0,0
<i>Escherichia coli</i>	2,60 abc	23,5
<i>Morganella morganii</i>	2,27 abcd	33,2
<i>Ewingella americana</i>	1,73 bcd	49,1
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	1,93 bcd	43,2
<i>Microbacterium imperiale</i>	2,73 ab	19,7
<i>Bacillus subtilis</i> OG	2,20 abcd	35,3
<i>Bacillus lentimorbus</i>	1,40 cd	58,8
<i>Streptomyces</i> sp.	2,13 abcd	37,4
<i>Bacillus agaradhaerens</i>	3,00 ab	11,8
CV (%)	49,1	–

*médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, com nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

C.R.(%) = $(SD - SE)/SD \times 100$, sendo:

SD = severidade da doença no tratamento controle com o patógeno.

SE = severidade da doença no tratamento com o isolado endofítico.

Tabela 1. Efeito da microbiolização da parte aérea do milho com endofíticos antagonistas no controle da mancha foliar de *Exserohilum turcicum*.

Isolado	72 horas		24 horas		0 hora	
	Severidade da doença	Controle relativo (C.R.) (%)	Severidade da doença	Controle relativo (C.R.) (%)	Severidade da doença	Controle relativo (C.R.) (%)
Controle (água)	1,00 e*	–	1,00 e	–	1,00 e	–
Controle (<i>E. turcicum</i>)	4,27 a	0,0	3,13 a	0,0	2,93 a	0,0
<i>Escherichia coli</i>	3,20 bc	25,1	2,80 ab	10,5	2,67 abc	8,9
<i>Morganella morganii</i>	4,00 ab	6,3	2,13 bcd	31,9	2,60 abc	11,3
<i>Ewingella americana</i>	4,00 ab	6,3	2,53 abc	19,2	2,87 a	2,0
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	3,60 ab	15,7	2,33 abcd	25,6	2,80 ab	4,4
<i>Microbacterium imperiale</i>	3,13 bc	26,7	2,00 bcd	36,1	2,47 abcd	15,7
<i>Bacillus subtilis</i> OG	3,00 bc	29,7	1,67 cde	46,6	1,73 de	41,0
<i>Bacillus lentimorbus</i>	2,27 cd	46,8	1,47 de	53,0	1,87 cd	36,2
<i>Streptomyces</i> sp.	2,53 cd	40,7	1,80 cde	42,5	1,87 cd	36,2
<i>Bacillus agaradhaerens</i>	1,67 de	60,9	2,00 bcd	36,1	2,00 bcd	31,7
CV (%)	28,8	–	36,9	–	30,4	–

*médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, com nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

C.R.(%) = $(SD - SE)/SD \times 100$, sendo:

SD = severidade da doença no tratamento controle com o patógeno.

SE = severidade da doença no tratamento com o isolado endofítico.

como: antibiose, lise das estruturas do patógeno e competição ou mesmo por indução de resistência sistêmica no hospedeiro, uma vez que atividades de inibição foram observadas em testes específicos, como antagonismo *in vitro* (SHIOMI *et al.*, 2008) e pela aplicação dos agentes de controle biológico nas sementes ou sobre plantas de milho, em diferentes intervalos de tempo.

Dos endofíticos que se destacaram no presente trabalho, é conhecida a ação antagonônica a fitopatógenos de *B. subtilis* 0G, *B. lentimorbus* e *Streptomyces* spp., tanto em testes *in vitro* como em plantas (AMORIM; MELO, 2002; BAUMGARTNER; WARNOCK, 2006; SABARATNAN; TRAQUAIR, 2002; SHIOMI *et al.*, 2006). Alguns trabalhos demonstraram a capacidade de *B. agaradhaerens* em produzir enzimas extracelulares como endoglucanases, relacionadas à degradação da parede celular de fitopatógenos (HIRASAWA *et al.*, 2006). Embora não se tenha observado a ocorrência de *Ewingella americana* como agente de biocontrole de fitopatógenos, há relatos da sua aparente ação micopatogênica e quitinolítica a *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* e a *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus*

ostreatus (CHOWDHURY; HEINEMANN, 2006; REYES *et al.*, 2004). Não foram encontrados relatos da ação de *X. axonopodis* no controle de fitopatógenos.

Dessa forma, neste trabalho, foi possível concluir que as bactérias endofíticas *Bacillus subtilis* 0G, *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp. e *Bacillus agaradhaerens* reduzem a severidade da mancha foliar de *Exserohilum turcicum*, quando pulverizados na parte aérea de plantas de milho; *B. lentimorbus*, *Streptomyces* sp., *Ewingella americana* e *Xanthomonas axonopodis* reduzem a severidade da doença, quando inoculados em sementes de milho; *B. lentimorbus* e *Streptomyces* sp. reduzem a severidade da doença tanto pela microbiolização das sementes como da parte aérea de milho.

Ainda que se tenha evidenciado a ocorrência de isolados bacterianos promissores no biocontrole de fitopatógenos, há a necessidade da realização de mais estudos para a avaliação do seu real potencial de uso para esse fim, como: o seu modo de ação, a sua aplicação em diferentes densidades populacionais, a sua ação conjunta ou mesmo a sua reação a fatores abióticos, como a exposição a agroquímicos.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagonônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.24, n.2, p.565-568, 2002.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Ecologia Microbiana*, Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998, p.117-137.
- BAUMGARTNER, K.; WARNOCK, A. A soil inoculant inhibits *Armillaria mellea* in vitro and improves productivity of grapevines with root disease. *Plant Disease*, v.90, n.4, p.439-444, 2006.
- CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W (eds.). *Métodos alternativos de controle fitossanitário*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279p.
- CHOWDHURY, P.R.; HEINEMANN, J.A. The general secretory pathway of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* BG164R is necessary for cavity disease in white button mushrooms. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.5, p.3558-3565, 2006.
- ESTEVES, M.C.F. *Reações a Exserohilum turcicum (Pass.) Leonard & Suggs em milho (Zea Mays L.) e variabilidade do patógeno*. 1989. 55f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1989.
- FERNANDES, M.C.A.; BALMER, E. Variabilidade de isolados de *Exserohilum turcicum* em cultivares de milho (*Zea mays*). *Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida*, v.22, n.1, p.1-5, 2002.
- HIRASAWA, K.; UCHIMURA, K.; KASHIWA, M.; GRANT, W.; ITO, S.; KOBAYASHI, T.; HORIKOSHI, K. Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.89, n.2, p.211-219, 2006.
- PEREIRA, O.A.P. Análise da situação atual de doenças do milho no Brasil e disponibilidade de germoplasma resistente. *Summa Phytopathologica*, v.21, n.1, p.67-70, 1995.
- PINTO, N.F.J.A. Controle químico de doenças foliares do milho, *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.3, n.1, p.134-138, 2004.
- REYES, J.E.; VENTURINI, M.E.; ORIA, R.; BLANCO, D. Prevalence of *Ewingella americana* in retail fresh cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*) in Zaragoza (Spain). *FEMS Microbiology Ecology*, v.47, n.3, p.291-296, 2004.
- SABARATNAN, S.; TRAQUAIR, J.A. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia solani* damping-off in tomato transplants. *Biological Control*, v.23, n.3, p.245-253, 2002.
- SHIOMI, H.F.; MELO, I.S.; MINHONI, M.T.A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagonônica a fitopatógenos. *Scientia Agraria*, v.9, n.4, p.535-538, 2008.
- SHIOMI, H.F.; SILVA, H.S.A.; MELO, I.S.; NUNES, F.V.; BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agraria*, v.63, n.1, p.32-39, 2006.
- SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; PEREIRA, M.C.B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and enzyme activities. *Biological Control*, v.29, p.288-295, 2004.
- VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v.36, p.453-483, 1998.