

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COMO AGENTES
DE BIOCONTROLE DA MANCHA DE *Exserohilum turcicum* E COMO
PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO (*Zea
mays* L.)**

HUMBERTO FRANCO SHIOMI

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU - SP
Novembro - 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COMO AGENTES
DE BIOCONTROLE DA MANCHA DE *Exserohilum turcicum* E COMO
PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO (*Zea
mays* L.)**

HUMBERTO FRANCO SHIOMI

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marli Teixeira de Almeida Minhoni

Co-Orientador: Prof. Dr. Itamar Soares de Melo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU - SP
Novembro - 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

A474a Shiomí, Humberto Franco, 1970-
Bioprospecção de bactérias endofíticas como agentes de biocontrole da mancha de *Exserohilum turcicum* e como promotoras do crescimento de plantas de milho (*Zea mays* L.) / Humberto Franco Shiomí. - Botucatu : [s.n.], 2007. xv, 57 f. : il. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2007

Orientador: Marli Teixeira de Almeida Minhoni

Co-orientador: Itamar Soares de Melo

Inclui bibliografia

1. Pragas - Controle biológico. 2. Bactérias. 3. Milho. 4. Milho - Doenças e pragas. I. Minhoni, Marli Teixeira de Almeida. II. Melo, Itamar Soares. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

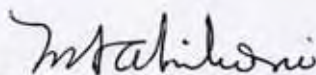
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COMO AGENTES
DE BIOCONTROLE DA MANCHA DE Exserohilum turcicum E COMO
PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DO MILHO (Zea mays L.)"

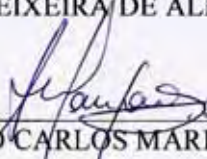
ALUNO: HUMBERTO FRANCO SHIOMI

ORIENTADOR: PROFª DRª MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ITAMAR SOARES DE MELO

Aprovado pela Comissão Examinadora



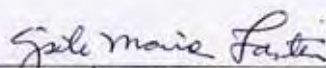
PROFª DRª MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



PROF. DR. HARLLEN SANDRO ALVES SILVA



PROFª DRª GISÈLE MARIA FANTIN



PROF. DR. DANIEL ANDRADE DE SIQUEIRA FRANCO

Data da Realização: 12 de novembro de 2007.

Minha vida, nossas vidas
formam um só diamante.
Aprendi novas palavras
e tornei outras mais belas!

Drummond

À minha mãe, Vanda, minhas irmãs Valéria, Vânia e Vanessa e demais familiares, pelo apoio e confiança,

OFEREÇO

À minha esposa Alessandra, pelo amor e companheirismo em todos os momentos,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão aos meus orientadores, Prof^a. Dr^a. Marli Teixeira de Almeida Minhoni e Prof. Dr. Itamar Soares de Melo, pela paciência e pelo apoio horas mais importantes;

À Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu e ao Departamento de Produção Vegetal (Defesa Fitossanitária), pela oportunidade da realização do curso;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida;

A todos os professores do Departamento de Produção Vegetal (Defesa Fitossanitária) da FCA-UNESP, campus de Botucatu, em especial aos professores: Antonio Carlos Maringoni, Edson Luiz Furtado, Nilton Luiz de Souza (*in memoriam*), Marcelo Agenor Pavan e Renate Krause Sakate, responsáveis por parte importante da minha formação profissional e humana;

À pesquisadora Dr^a. Gisele Maria Fantin, do Instituto Biológico de Campinas, pelas importantes informações e pelo tratamento sempre cordial, no transcorrer da execução do projeto de pesquisa;

Aos meus amigos e companheiros de pós-graduação, em especial ao Harllem Sandro Alves Silva e Daniel Andrade de Siqueira Franco, do Instituto Biológico de Campinas, pelo convívio sempre amistoso e fraternal;

Às empresas Agroeste Sul Sementes S.A. e Semeali LTDA, em especial ao meu amigo Ruy Roberto do Carmo Júnior, pelo fornecimento de sementes de milho e pela amizade desde a época da graduação;

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente: João, Márcia, Roseli, Elke e Alexandre e aos estagiários: Chicão, Chiquinho, Marise, Márcia, Tiago, Duzão, Duzinho, Aldo, Élide, Lucianas Reyes e Ávila, Zayame,

Liliana, Joãozinho, Armando, Sarah, Mariana, Pietro, Marcela, Isabela, André, Marina e Vítor, pela amizade, ajuda, pelo convívio sempre agradável e pelas boas risadas;

Aos amigos da FCA-UNESP, em especial à Márcia, Michelle e Alnusa, pelo apoio e ajuda sempre presente;

Aos funcionários da Embrapa Meio Ambiente, em especial ao Waldemore, Henrique, Brasilino, Barba, Chiquinho e Chacrinha, pela boa vontade e ajuda na realização dos ensaios.

Minha gratidão a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Que eu consiga retribuir tudo o que me foi dado pela Existência!

BIOGRAFIA DO AUTOR

Humberto Franco Shiomi, nascido a 01 de junho de 1970 e natural de Campinas-SP, é formado em Engenharia Agrônômica pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal em 1998. Na Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, campus de Botucatu, obteve o título de Mestre em Agronomia, na Área de Concentração de Proteção de Plantas no ano de 2004, desenvolvendo métodos de controle biológico da ferrugem do cafeeiro. Profissionalmente, trabalhou em ONG'S ligadas à agricultura orgânica e à produção de cogumelos comestíveis, prestando orientação técnica a produtores, ministrando aulas, cursos teórico-práticos e atuando como representante titular, junto ao Colegiado de Agricultura Orgânica no Estado de São Paulo. Atualmente, trabalha como professor colaborador na Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, UNICENTRO – campus de Guarapuava-PR.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
SUMMARY.....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
_____ Capítulo I.....	05
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ANTAGÔNICAS A FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	06
Resumo.....	08
Abstract.....	09
1.1. Introdução.....	10
1.2. Material e Métodos.....	12
1.2.1. Testes de antagonismo <i>in vitro</i>	12
1.2.2. Identificação dos isolados endofíticos selecionados em testes de antagonismo <i>in vitro</i> pela análise do perfil dos ácidos graxos da membrana da parede celular (FAME).....	14
1.2.3. Promoção de crescimento de plantas de milho pela microbiolização das sementes com bactérias endofíticas.....	15
1.3. Resultados e Discussão.....	16
1.4. Referências.....	18
_____ Capítulo II.....	28
EFEITO DO MODO DE APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA SUA EFICÁCIA SOBRE O BIOCONTROLE DA MANCHA DE <i>Exserohilum turcicum</i> EM PLANTAS DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.).....	28
Resumo.....	30
Abstract.....	31
2.1. Introdução.....	32

2.2.	Material e métodos.....	33
2.2.1.	Cultivo e multiplicação de microrganismos.....	33
2.2.2.	Bioensaio em condições de casa de vegetação. I. Controle da mancha foliar de <i>Exserohilum</i> pela aplicação de bactérias endofíticas na parte aérea de plantas de milho em diferentes períodos de inoculação.....	34
2.2.3.	Bioensaio em condições de casa de vegetação. II. Controle da mancha foliar de <i>Exserohilum turcicum</i> pela microbiolização das sementes com isolados endofíticos.....	36
2.3.	Resultados e discussão.....	37
2.4.	Referências.....	41
	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
	APÊNDICE.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1.1. Identificação dos microrganismos endofíticos do milho obtidos por seleção massal, quanto ao perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME).....	24
1.2. Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos por microrganismos endofíticos em testes de antagonismo <i>in vitro</i>	24
1.3. Efeito da microbiolização de sementes de milho com endofíticos antagonistas no controle da mancha foliar de <i>Exserohilum turcicum</i> e em alguns parâmetros fisiológicos das plantas.....	24
2.1. Bactérias endofíticas do milho obtidas por seleção massal, selecionadas para os ensaios de controle da mancha foliar de <i>Exserohilum turcicum</i> , identificadas pela análise do perfil dos ácidos graxos da membrana da parede celular (FAME).....	48
2.2. Efeito da pulverização da parte aérea do milho com endofíticos antagonistas no controle da mancha foliar de <i>Exserohilum turcicum</i>	48
2.3. Efeito da microbiolização de sementes de milho com endofíticos antagonistas no controle da mancha foliar de <i>Exserohilum turcicum</i>	49

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.1.A. Modelo esquemático de antagonismo <i>in vitro</i> utilizado, para a realização de seleção massal de endofíticos do milho.....	26
1.1.B. Modelo esquemático de antagonismo <i>in vitro</i> utilizado, para testes de antagonismo com os isolados endofíticos selecionados.....	26
1.2. Ação antagonística de <i>Bacillus subtilis</i> 0G a <i>Sclerotium rolfsii</i>	26
1.3. Ação antagonística de <i>Bacillus lentimorbus</i> a <i>Rhizoctonia solani</i>	27
1.4. Ação antagonística de <i>Bacillus agaradhaerens</i> (a) e <i>Streptomyces</i> sp. (b) a <i>Exserohilum turcicum</i>	27
2.1. Inoculação de <i>Exserohilum turcicum</i> em plantas de milho 15 dias após a semeadura.....	50
2.2. Microbiolização de plantas de milho com isolado endofítico.....	50
2.3. Lesões foliares de <i>Exserohilum turcicum</i> 15 dias após a inoculação com o patógeno.....	50
2.4. Folha apresentando lesões causadas por <i>Exserohilum turcicum</i>	50

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DA MANCHA DE *Exserohilum turcicum* E COMO PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.). Botucatu, 2007. 57p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: HUMBERTO FRANCO SHIOMI

Orientador: MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

Co-orientador: ITAMAR SOARES DE MELO

RESUMO

Doenças de diversas naturezas e etiologias acometem a cultura do milho. O controle dos fitopatógenos, na maioria das vezes, é realizado através de cultivares resistentes e/ou pulverizações com fungicidas, cuja utilização indiscriminada resulta em uma série de problemas, como a contaminação ambiental, dos alimentos e dos consumidores, no aparecimento de populações resistentes de patógenos e na diminuição de populações de organismos benéficos ou não-alvos. Nesse contexto, os microrganismos endofíticos aparecem como ferramentas de controle biológico de pragas e doenças. Eles compreendem, principalmente, fungos e bactérias que habitam o interior das plantas sem causar, aparentemente, danos aos seus hospedeiros. Sua capacidade de biocontrole pode advir de vários mecanismos, como a produção de substâncias deletérias a fitopatógenos ou competindo por espaço e nutrientes. Indiretamente, induzindo resistência sistêmica no hospedeiro ou pela produção de substâncias promotoras de crescimento. No presente trabalho, 95 isolados endofíticos obtidos do milho e isolados de *Bacillus subtilis* OG; *Bacillus lentimorbus* e

Streptomyces sp. foram testados individualmente *in vitro* e *in vivo*, quanto ao antagonismo a diversos fitopatógenos e no controle da mancha de *Exserohilum turcicum*, em condições de casa-de-vegetação, pela microbiolização das sementes e da parte aérea das plantas, 72 e 24 horas antes e no mesmo dia da inoculação do patógeno. Foi testada, também, a capacidade desses isolados na promoção de crescimento das plantas de milho. Verificou-se que, através dos testes de antagonismo *in vitro*, foi possível se detectar isolados endofíticos eficazes no controle da mancha foliar de *Exserohilum turcicum* em condições de casa-de-vegetação. Dentre as bactérias endofíticas do milho selecionadas, *Bacillus agaradhaerens* foi o isolado que mais se destacou, tanto em testes de antagonismo *in vitro*, como *in vivo*. Os endofíticos *Bacillus subtilis* 0G, *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp. e *Bacillus agaradhaerens* apresentaram boa eficácia no controle da mancha de *Exserohilum*, quando aplicados na parte aérea das plantas de milho, 72 e 24 horas antes e no mesmo dia da inoculação do patógeno. *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp. Os endofíticos *Ewingella americana* e *Morganella morganii* se mostraram eficientes quando aplicados às sementes, resultando em plantas mais desenvolvidas que o tratamento controle.

Palavras chave: controle biológico de doenças, *Exserohilum turcicum*, bactérias endofíticas, *Zea mays*.

BIOPROSPECTING FOR ENDOPHYTIC BACTERIA FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF THE *Exserohilum turcicum* SPOT AND GROWTH PROMOTION OF MAIZE PLANTS (*Zea mays* L.). Botucatu, 2007. 57p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: HUMBERTO FRANCO SHIOMI

Adviser: MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

Co-Adviser: ITAMAR SOARES DE MELO

SUMMARY

Diseases of several natures and etiologies affect the cultivation of maize. The control of plant pathogens, in most cases, is realized by resistant cultivars and/or spraying with fungicides, whose indiscriminate use results in a series of problems such as environmental contamination, food and consumers, the emergence of resistant populations of pathogens and the decrease in populations of beneficial organisms or non-targets. In this context, the endophytes appear as tools for the biological control of pests and diseases. They include, principally, fungi and bacteria that inhabit the inside of plants without cause, apparently, damage to their hosts. His ability to biocontrol may arise from various mechanisms, such as the production of deleterious substances to the plant pathogens or competing for space and nutrients. Indirectly, inducing systemic resistance in the host or by plant-growth promoting. In the present work, 95 maize endophytes strains and a strain of *Bacillus subtilis* 0G; *Bacillus lentimorbus* and *Streptomyces* sp. were individually tested *in vitro* and *in vivo* conditions, on the antagonism to several fungi plant pathogens and in control of the *Exserohilum turcicum* leaf spot under greenhouse conditions, by the seed microbiolization and by spraying the aerial part of the plants, 72 and 24 hours before and on the same day of the inoculation of the pathogen. It was also tested, the ability of these strains to maize growth-promotion. It was found that through the antagonism

tests *in vitro*, it was possible to detect endophytic strains effective in the *Exserohilum turcicum* leaf spot control under greenhouse conditions. Among the selected maize endophytic bacteria, *Bacillus agaradhaerens* was that most stood out in both tests of antagonism *in vitro* and *in vivo*. The endophytes *Bacillus subtilis* OG, *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp. and *Bacillus agaradhaerens* showed good efficacy in the control of *Exserohilum turcicum* leaf spot, when applied at the aerial parts of maize, 72 and 24 hours before and on the same day of the inoculation of the pathogen. *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp., *Ewingella americana* and *Morganella morgani* were effective when applied to the seed, resulting in more developed plants than treatment control.

Keywords: endophytes, maize, *Exserohilum turcicum*, biological control.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do milho ocupa uma posição de destaque no cenário agrícola, como uma das espécies vegetais mais cultivadas e conhecidas no mundo, apresentando uma multiplicidade de aplicações, tanto na alimentação, como servindo de matéria-prima em diversificados complexos agro-industriais (ANDRADE, 1997).

Estima-se que no ano de 2004, a produção global de grãos tenha sido de 2,264 bilhões de toneladas, das quais a cultura do milho foi responsável por 721 milhões, ou 31,8 % do total. No mesmo período, o Brasil ocupou a terceira posição na produção de milho, com uma participação ao redor de 6%, ficando atrás de Estados Unidos e China, responsáveis por cerca de 65% da produção total (SILVA et al., 2006).

Embora tenha havido uma redução de 3,3% na oferta de milho a nível mundial na safra 2006/2007 em relação à 2004/2005, devido à uma queda na rentabilidade da

cultura, o uso industrial do milho tem se mostrado um mercado novo e promissor, apontando para uma tendência de rápida recuperação nos preços e em aumento na área plantada em todo o mundo. Segundo o Food and Agricultural Policy Research Institute (Instituto de Pesquisa de Política Agrícola e Alimentar), o uso de milho nos Estados Unidos para a produção de etanol, deverá saltar de 40 milhões de toneladas em 2005, para 105 milhões em 2015, como parte da política estadunidense de substituição do uso do petróleo por fontes energéticas mais limpas e renováveis. A China, tradicional exportador de milho, está importando o produto pela primeira vez em muitos anos, num volume que poderá se elevar rapidamente, a exemplo do que ocorreu com outras *commodities* (AGRIANUAL, 2007). Esse cenário aponta para a necessidade do aumento do potencial produtivo da cultura nos principais países produtores, entre eles o Brasil, para suprir essa demanda, incluindo o controle dos fatores que causam a queda na produtividade.

Doenças de diversas naturezas acometem a cultura do milho, causando perdas econômicas decorrentes da queda de produtividade e da qualidade das sementes. A maioria dos patógenos é controlada por meio de aplicações sistemáticas de defensivos agrícolas, cuja utilização indiscriminada acarreta uma série de problemas, como a contaminação do ambiente, dos alimentos e dos consumidores, o aparecimento de populações resistentes de patógenos e diminuição de populações de organismos benéficos ou não-alvos (BETTIOL, 1991; NORDLUND, 1996; SILVA et al., 2004).

Como alternativa ao uso de agroquímicos, o controle biológico de fitopatógenos tem se apresentado como uma forma promissora e viável, por meio do uso de microrganismos como agentes protetores de plantas cultivadas (MELO; VALARINI, 1995; PUNJA, 1997; BEVIVINO et al., 2000; KUNOH, 2002).

Nesse contexto, os microrganismos endofíticos têm sido objeto de interesse crescente como ferramentas para o controle biológico de pragas e doenças de plantas nos diferentes agroecossistemas e para outras propriedades importantes, como a produção de hormônios vegetais e outros compostos secundários, tais como enzimas e fármacos de interesse biotecnológico (AZEVEDO et al., 2000; STROBEL, 2006). Eles compreendem, principalmente, fungos e bactérias que habitam o interior das plantas sem causar, aparentemente, danos aos seus hospedeiros (PETRINI, 1991; HALLMANN et al., 1997). Esta característica de se desenvolver no interior dos tecidos do hospedeiro pode favorecer a ação dos microrganismos endofíticos e representa uma vantagem em relação ao controle biológico clássico, pois potencializa os seus efeitos sobre a planta hospedeira e reduz as conseqüências das variações populacionais, decorrentes da interação com outros microrganismos e com o meio, que podem inviabilizar a formulação de um produto comercial (SHARMA; NOWAK, 1998).

A capacidade de biocontrole dos microrganismos endofíticos pode advir de vários mecanismos, como a produção de substâncias deletérias aos fitopatógenos (M'PIGA et al., 1997) e/ou competindo por espaço e nutrientes. Indiretamente, induzindo resistência sistêmica no hospedeiro (BUCHENAUER, 1998; VAN LOON et al., 1998; VAN VEES et al., 1999) e/ou pela produção de substâncias promotoras de crescimento (HALLMANN et al., 1997; BENT; CHANWAY, 1998; NARISAWA et al., 1998; VARMA et al., 1999).

Os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas podem se apresentar na forma de produção de substâncias ou metabólitos análogos a hormônios vegetais, como giberelinas, auxinas e citocininas (BUCHENAUER, 1998;

CATTELAN; HARTEL, 2000; GUTIERREZ-MAÑERO et al., 2001), ou no estímulo da produção desses hormônios por parte do vegetal, onde essas substâncias agem sobre a alongação e diferenciação celular, na emissão e aumento da permeabilidade de raízes (GLICK; BASHAN, 1997), no florescimento e no amadurecimento de frutos (LAZAROVITS; NOWAK, 1997) e através da solubilização e disponibilização de fósforo e nitrogênio para as plantas (GLICK; BASHAN, 1997). Indiretamente, através da produção de substâncias antimicrobianas, por competição por nutrientes e espaço com microrganismos fitopatogênicos e pela indução de resistência sistêmica no hospedeiro, onde a planta deixa de direcionar a utilização de energia para combater agentes causadores de doenças, para desenvolver melhor o seu potencial produtivo.

A mancha foliar de *Exserohilum*, “*northern leaf blight*” ou queima das folhas do milho, causada pelo fungo *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs, (teleomorfo *Setosphaeria turcica* (Luttrell) Leonard & Suggs), é considerada uma das doenças mais importantes que acometem a cultura do milho (PINTO, 1997).

A doença está presente de forma generalizada em todo o mundo (CARSON; VAN DYKE, 1994), onde os principais danos são decorrentes de um desfolhamento excessivo durante o período de enchimento de grãos, resultando em perdas de 50% ou mais em cultivares suscetíveis (FERNANDES; BALMER, 2002). No Brasil, a doença representa um problema fitossanitário em todas as regiões produtoras, principalmente na região Sul e nas chapadas da região Centro-Oeste (PEREIRA, 1995), onde o patógeno encontra as condições ambientais propícias para o seu desenvolvimento e o seu controle têm sido realizado, principalmente, pelo uso de fungicidas e variedades resistentes.

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivos: 1) realizar uma pré-seleção de isolados endofíticos do milho antagonicos a fitopatógenos desafiante em testes de antagonismo *in vitro*; 2) identificar os isolados mais promissores através da análise do perfil dos ácidos graxos da membrana da parede celular; 3) confirmar a proteção verificada nos testes de antagonismo *in vitro*, em testes em vasos sob condições de casa-de-vegetação, pela inoculação dos endofíticos via sementes e via parte aérea das plantas de milho; 4) verificar a eficácia do modo de aplicação dos endofíticos pré-selecionados em dar proteção às plantas de milho frente a *Exserohilum turcicum*; 5) verificar a capacidade dos isolados endofíticos selecionados em dar proteção a *E. turcicum*, pela microbiolização da parte aérea 72 e 24 horas antes e concomitantemente à inoculação de *E. turcicum*, sob condições de casa-de-vegetação e 6) verificar a capacidade dos endofíticos do milho selecionados na promoção de crescimento de plantas de milho em testes em vasos e sob condições de casa-de-vegetação.

- 1 **PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO POR BACTÉRIAS**
- 2 **ENDOFÍTICAS ANTAGÔNICAS A FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**
- 3
- 4 ***MAIZE GROWTH PROMOTION BY ENDOPHYTIC BACTERIA ANTAGONIC***
- 5 ***TO PLANT PATHOGENIC FUNGI***

6 Humberto Franco SHIOMI¹

7 Itamar Soares de MELO²

8 Marli Teixeira de Almeida MINHONI³

9

10 ¹ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Agronomia, Professor Colaborador do Departamento de
11 Agronomia da UNICENTRO, CP 3010, 85015-430, Guarapuava-PR; E-mail:
12 hfshiomi@yahoo.com.br . Autor para correspondência.

13 ² Engenheiro agrônomo, Doutor em Agronomia, Pesquisador da CNPMA/EMBRAPA, CP 69,
14 13820-000, Jaguariúna-SP, E-mail: Itamar@cnpma.embrapa.br

15 ³ Professora Doutora do Departamento de Defesa Fitossanitária da FCA/UNESP, CP 237,
16 18603-970, Botucatu-SP, E-mail: marliminhoni@fca.unesp.br

RESUMO

17

18

19 SHIOMI, H.F.; MELO, I.S.; MINHONI, M.T.A. **Promoção do crescimento de plantas de**
20 **milho por bactérias endofíticas antagônicas a fungos fitopatogênicos. Scientia**
21 **Agraria, 2007.**

22

23 Com o objetivo de se obter uma seleção de agentes de biocontrole de fitopatógenos
24 rápida e eficiente, muitos métodos de pré-seleção tem sido utilizados, visando reduzir o
25 tempo e custo dispendido em testes de campo. No presente trabalho foi realizada uma
26 seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fungos fitopatogênicos em testes *in*
27 *vitro* e a verificação da capacidade dos isolados selecionados, em promover o crescimento
28 de plantas de milho. De um total de 95 isolados de bactérias endofíticas do milho, seis foram
29 selecionados quanto à inibição a *Pythium aphanidermatum* e identificados através da análise
30 do perfil dos ácidos graxos da membrana da parede celular, em espectrofotômetro gasoso. A
31 essa seleção, foram incluídos um isolado de *Bacillus subtilis* 0G, *Bacillus lentimorbus* e
32 *Streptomyces* sp. e testados quanto ao antagonismo a *Rhizoctonia solani*, *Fusarium*
33 *moniliforme*, *Sclerotium rolfisii* e *Exserohilum turcicum*. Posteriormente, os nove isolados
34 foram testados quanto à promoção do crescimento de plantas de milho. Para isso, sementes
35 foram bacterizadas com uma suspensão de 10^9 ufc mL⁻¹ e semeadas em vasos, sob
36 condições de casa-de-vegetação. Trinta dias após a semeadura, avaliou-se: a altura, peso
37 da matéria-seca e número de folhas das plantas. Verificou-se que os endofíticos *B. subtilis*
38 0G, *B. lentimorbus* e *Streptomyces* sp., apresentaram ação antagônica superior aos demais,
39 com taxas de inibição entre 49% e 54%. Dentre os endofíticos do milho, *Bacillus*
40 *agaradhaerens* foi o que mais se destacou, com taxas de inibição variando entre 44% e 50%
41 e indicando uma inespecificidade de ação. Quanto à promoção do crescimento, *Ewingella*

42 *americana* e *Morganella morganii* se destacaram dos demais endofíticos, com plantas
43 significativamente mais altas que a testemunha (11,06% e 14,01%, respectivamente). Para
44 os outros parâmetros avaliados não foram observadas diferenças significativas entre os
45 tratamentos. Pode-se especular que esses endofíticos possam estar agindo por antibiose, no
46 qual a planta deixaria de direcionar energia para o controle de patógenos, pela proteção
47 oferecida por esses agentes, e, assim, podendo desenvolver melhor o seu potencial
48 produtivo; ou pela produção de substâncias análogas a hormônios vegetais ou induzindo o
49 hospedeiro a produzir hormônios vegetais, como auxinas, giberelinas ou citocininas. Este
50 estudo, embora preliminar, permite vislumbrar o potencial de uso dos isolados endofíticos na
51 supressão de doenças em diferentes sistemas patógeno-hospedeiro em testes
52 subsequentes, pelo tratamento de sementes ou de plantas sob condições de casa-de-
53 vegetação e a campo.

54 **Palavras-chave:** promoção de crescimento, milho, endofíticos, controle biológico

56 ABSTRACT

57
58 SHIOMI, H.F.; MELO, I.S.; MINHONI, M.T.A. **Maize growth promotion by endophytic**
59 **bacteria antagonic to plant pathogenic fungi. Scientia Agraria, 2007.**

60
61 In order to obtain a selection of biocontrol agents of plant pathogens fast and efficient,
62 several methods of pre-selection has been used, to reduce the time and cost expended in the
63 field tests. In the present work was performed a selection of endophytic bacteria with
64 antagonic action to plant pathogen fungi in *in vitro* tests and verification of the ability of the
65 individual strains selected, to the growth promote maize plants. Out of a total of 95 isolates of
66 endophytic bacteria of maize, six were selected on the inhibition to *Pythium aphanidermatum*

67 and identified through analysis of the profile of the fatty acids of the membrane of the cell
68 wall. In this selection, were included one isolate of *Bacillus subtilis* 0G, *Bacillus lentimorbus*
69 and *Streptomyces* sp. to verify the antagonism to *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*,
70 *Sclerotium rolfsii* and *Exserohilum turcicum*. Later, the nine isolates were tested as growth
71 promoters of maize plants. Therefore, seeds were inoculated with a suspension of 10^9 cfu
72 mL⁻¹ and sown in pots, under greenhouse conditions. Thirty days after sowing, was
73 evaluated: the height, weight of dry matter and number of leaves of the plants. It was found
74 that *B. subtilis* 0G, *B. lentimorbus* and *Streptomyces* sp. showed more antagonistic action to the
75 other, with inhibition rates ranging between 49% and 54%. Among the maize endophytes,
76 *Bacillus agaradhaerens* was what stood out most, with rates of inhibition ranging between
77 44% and 50%, indicating a unespecificity action. As for the growth promotion, *Ewingella*
78 *americana* and *Morganella morganii* was highlighted the others, with plants significantly
79 higher than the control treatment (11.06% and 14.01% respectively). For other parameters
80 evaluated no significant differences were observed among treatments. We can speculate that
81 these endophytes may be acting by antibiosis, in which the plant would not target energy for
82 the control of pathogens, the protection offered by these agents, and thus can better develop
83 its productive potential, or for the production of similar substances in plant hormones or
84 inducing the host plant to produce hormones, as auxins, gibberelins or cytokinins. This study,
85 though preliminary, to discern the potential for use of endophytes strains to the control of
86 plant diseases in different host-pathogen systems in subsequent tests, by the treatment of
87 seeds or plants under greenhouse and field conditions.

88 **Key-words:** growth-promotion, maize, endophytes, biological control

89

90

91

1.1. INTRODUÇÃO

92

93 Recentemente, o interesse pela utilização de microrganismos endofíticos como
94 ferramentas de biocontrole de fitopatógenos nos diferentes agroecossistemas tem
95 aumentado em importância, devido à necessidade de se buscar alternativas viáveis ao uso
96 de agroquímicos e dos problemas decorrentes de sua utilização indiscriminada, como a
97 contaminação ambiental, dos alimentos e dos consumidores, o aparecimento de populações
98 resistentes de patógenos e diminuição de populações de organismos benéficos ou não-alvos
99 (BETTIOL, 1991; NORDLUND, 1996; SILVA et al., 2004).

100 Eles compreendem, principalmente, fungos e bactérias que habitam o interior das
101 plantas sem causar, aparentemente, danos aos seus hospedeiros (PETRINI, 1991;
102 HALLMANN et al., 1997). A sua capacidade de biocontrole pode advir de vários
103 mecanismos, como a produção de substâncias deletérias aos fitopatógenos (M'PIGA et al.,
104 1997) ou competindo por espaço e nutrientes. Indiretamente, induzindo resistência sistêmica
105 no hospedeiro (BUCHENAUER, 1998; VAN LOON et al., 1998; VAN VEES et al., 1999) ou
106 pela produção de substâncias promotoras de crescimento (HALLMANN et al., 1997; BENT e
107 CHANWAY, 1998; NARISAWA et al., 1998; VARMA et al., 1999).

108 Os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas podem se
109 apresentar na forma de produção de substâncias ou metabólitos análogos a hormônios
110 vegetais, como giberelinas, auxinas e citocininas (BUCHENAUER, 1998; CATTELAN e
111 HARTEL, 2000; GUTIERREZ-MAÑERO et al., 2001), ou no estímulo da produção desses
112 hormônios por parte do vegetal, onde essas substâncias agem sobre a elongação e
113 diferenciação celular, na emissão e aumento da permeabilidade de raízes (GLICK e
114 BASHAN, 1997), no florescimento e no amadurecimento de frutos (LAZAROVITS e NOWAK,
115 1997). Também, através da solubilização e disponibilização de fósforo e nitrogênio para as
116 plantas (GLICK e BASHAN, 1997). Indiretamente, através da produção de substâncias

117 antimicrobianas, por competição por nutrientes e espaço com microrganismos que possam
118 ser fitopatogênicos e pela indução de resistência sistêmica no hospedeiro, a planta deixa de
119 direcionar a utilização de energia para combater agentes causadores de doenças,
120 desenvolvendo melhor o seu potencial produtivo.

121 Com o objetivo de se obter agentes de controle biológico potencialmente eficientes, um
122 grande número de microrganismos têm sido pré-selecionados em testes de antagonismo *in*
123 *vitro*, devido às dificuldades apresentadas pelos métodos de seleção realizados a campo,
124 como o custo, mão-de-obra, tempo e espaço necessários serem elevados (XIUJUN et al.,
125 1996).

126 Os testes de antagonismo *in vitro* têm a capacidade de detectar os principais
127 mecanismos de ação utilizados por agentes de controle biológico sobre fitopatógenos, como
128 antibiose, competição por nutrientes e parasitismo (MARIANO, 1993). Essa técnica,
129 normalmente é realizada sobre placas com ágar, mensurando-se o halo de inibição entre as
130 colônias, que varia de acordo com a eficiência do metabólito produzido pelo agente de
131 controle biológico (QUEIRÓZ, 2003).

132 Assim, o presente trabalho teve por objetivo realizar uma seleção de bactérias
133 endofíticas, com potencial de uso como agentes de biocontrole, através de testes de
134 antagonismo *in vitro*, frente a fungos fitopatogênicos desafiantes; a identificação dos isolados
135 mais promissores, através da análise do perfil dos ácidos graxos da membrana da parede
136 celular em cromatógrafo a gás e a capacidade dos isolados selecionados em promover o
137 crescimento de plantas de milho.

138

139

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

140

1.2.1. Testes de antagonismo *in vitro*

141 Todos os isolados de microrganismos utilizados no presente projeto foram retirados da
142 coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA - Meio
143 Ambiente, em Jaguariúna-SP.

144 Noventa e cinco isolados de bactérias endofíticas, coletados das raízes e da parte
145 aérea de cultivos de milho das cidades paulistas de Holambra, Lins, Ouroeste e Salto
146 Grande, conservados em óleo mineral a 20 ± 2 °C, foram multiplicados em meio TSBA a 25
147 ± 2 °C e incubados 48 horas e submetidos a uma seleção massal, realizada através de
148 testes de antagonismo *in vitro*, frente ao fitopatógeno *Pythium aphanidermatum*. Para isso,
149 foram colocados 4 isolados endofíticos diferentes por placa contendo meio BDA (Figura 1A).
150 Estes foram dispostos na forma de uma estria, eqüidistantes e nas extremidades das placas.
151 No centro, foi colocado um disco de 0,5 cm de diâmetro, contendo a cultura do patógeno.
152 Uma placa contendo um disco de 0,5 cm com propágulos de *P. aphanidermatum*, sem a
153 presença de qualquer isolado endofítico serviu de tratamento controle. O período de tempo
154 necessário para que o micélio do patógeno tomasse toda a superfície da placa contendo o
155 meio de cultura, serviu de parâmetro para indicar o momento de avaliar a inibição, a qual foi
156 realizada através de análise visual e em apenas uma repetição por isolado.

157 Após essa pré-seleção, os isolados mais promissores foram testados quanto à ação
158 antagônica a *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Exserohilum*
159 *turcicum*. Um isolado das bactérias *Bacillus subtilis* 0G e *Bacillus lentimorbus* e da
160 actinobactéria *Streptomyces* sp., selecionados em estudos anteriores quanto ao seu
161 potencial como agentes de controle biológico de fitopatógenos, também foram incluídos nos
162 estudos.

163 Culturas dos fitopatógenos, conservadas em frascos de vidro com água esterilizada e a
164 20 °C, foram transferidas assepticamente e incubadas a 25 ± 2 °C em meio BDA, para
165 posterior utilização nos ensaios experimentais. Discos de meio de cultura de 0,5 cm de

166 diâmetro foram retirados da borda da colônia ativa, contendo os isolados de fungos
167 fitopatogênicos e colocados em placas de Petri contendo meio BDA. Num ponto equidistante
168 da placa, com o auxílio de uma alça de platina, foi feita uma estria contendo propágulos do
169 isolado endofítico a ser testado (Figura 1B). O tratamento controle consistiu da colocação,
170 sobre a placa de Petri, de apenas um disco de meio de cultura contendo culturas do
171 fitopatógeno.

172 O período de tempo necessário para que o micélio do fitopatógeno, sem a presença do
173 isolado endofítico se desenvolvesse sobre todo o meio de cultura foi estabelecido como o
174 momento de avaliação do halo de inibição, nos tratamentos contendo o isolado endofítico a
175 ser testado, os quais foram incubados a 24 ± 2 °C e num delineamento experimental
176 inteiramente casualizado com 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de
177 variância e teste de Tukey (5%).

178

179 **1.2.2. Identificação dos isolados endofíticos selecionados em testes de** 180 **antagonismo *in vitro* pela análise do perfil dos ácidos graxos da membrana da parede** 181 **celular (FAME)**

182 Os isolados endofíticos selecionados nos testes de antagonismo 'in vitro' foram
183 identificados, conforme o descrito por COSTA (2005). Inicialmente, os isolados foram
184 multiplicados em meio TSBA (Merck) por 48 horas a 25 ± 2 °C para adaptação ao meio de
185 cultura. Após, foram transferidos pelo método das estrias cruzadas, para o meio TSBA
186 (BBL), onde foram incubados por 24 horas a 25 ± 2 °C. Com uma alça de metal, foram
187 coletadas 4 alçadas cheias de células bacterianas do terceiro quadrante riscado na placa e
188 transferidas para tubos Kimax (13mm x 100 mm), de uso específico para cromatografia. Um
189 tubo contendo apenas os reagentes utilizados no processo serviu como 'padrão zero' ou
190 'branco' da análise e foi submetido à leitura no cromatógrafo, para aferição da qualidade da

191 extração das amostras pelos reagentes durante o processo analítico. Com uma pipeta
192 calibrada foi adicionado $1,0 \pm 0,1$ mL do reagente de saponificação sobre os tubos contendo
193 as células bacterianas. Estes foram lacrados com uma tampa de teflon, agitados por 5-10
194 segundos em agitador do tipo 'Vórtex' e colocados em banho de água fervente por 5
195 minutos, sendo transferidos, em seguida, para banho de água à temperatura ambiente. Após
196 o resfriamento, foram novamente agitados por 5-10 segundos e colocados de volta ao banho
197 de água fervente por mais 25 minutos, seguido de banho em água à temperatura ambiente
198 até o seu esfriamento. Aos tubos esfriados foram colocados $2,0 \pm 0,1$ mL do reagente de
199 metilação com uma pipeta calibrada. Após, estes foram agitados por 5-10 segundos em
200 agitador do tipo 'Vórtex' e aquecidos a 80 ± 1 °C por 10 minutos. Em seguida os tubos foram
201 colocados em banho de água à temperatura ambiente para esfriamento. Com uma pipeta
202 calibrada foi adicionado aos tubos $1,25 \pm 0,1$ mL do reagente de extração, os quais foram
203 centrifugados em rotator clínico (Fisher M246) por 10 minutos. Após, descartou-se a fase
204 aquosa (inferior) com o auxílio de pipetas de Pasteur, de vidro e haste longa. Após,
205 procedeu-se à lavagem da fase orgânica das amostras que permaneceram nos tubos, pela
206 adição de $3,0 \pm 0,1$ mL do reagente de lavagem e agitação em rotator clínico por 5 minutos.
207 Após, cerca de dois terços da fase orgânica da amostra foram retirados com pipetas de vidro
208 e transferidas para tubos 'vial', específicos para leitura no aparelho de cromatografia gasoso
209 (Agilent 6580)

210

211 **1.2.3. Promoção de crescimento de plantas de milho pela microbiolização das** 212 **sementes com bactérias endofíticas**

213 Sementes de milho, híbrido comercial AS-1548 (Agroeste Sul Sementes S.A) tratadas
214 quimicamente, tiveram os fungicidas removidos previamente, segundo os procedimentos
215 descritos por BACON et al. (1994). As sementes foram imersas em água de torneira e

216 colocadas em agitador magnético por 5 minutos. Em seguida foram imersas em solução de
217 álcool etílico a 70% por 3 minutos e lavadas imediatamente em água de torneira por 5 vezes.
218 Por último, nova imersão das sementes foi feita em solução de hipoclorito de sódio por 3
219 minutos em agitador magnético, seguido de lavagem em água destilada por 5 vezes.

220 Culturas de microrganismos antagonistas foram cultivadas em meio TSBA por 48 horas
221 a 25 ± 2 °C e suas respectivas suspensões de células bacterianas preparadas com o ajuste
222 de turbidez pela escala de Mc Farland, estimando-se a concentração de bactérias e
223 actinobactérias a 10^9 ufc mL⁻¹ (MANTOVANELLO e MELO, 1994). As sementes de milho
224 foram inoculadas, através de imersão em suspensão, contendo células do antagonista por
225 60 minutos e sob agitação.

226 As sementes de milho microbiolizadas com os isolados endofíticos selecionados, foram
227 colocadas para germinar em vasos de 5 litros de capacidade, contendo latossolo vermelho-
228 amarelo não esterilizado, adicionado de 1,0 g. dm⁻³ de solo de N-P-K (4-14-8) e 1,5 g. dm⁻³
229 de solo calcário calcítico e do substrato comercial Multiplant (Terra do Paraíso LTDA) na
230 proporção 1:3 (v/v) e transferidas para casa de vegetação a 25 ± 5 °C e sob irrigação diária.
231 Cada parcela experimental consistiu de um vaso com 5 plântulas em 3 repetições, num
232 delineamento em blocos ao acaso, onde cada isolado endofítico representou um tratamento.
233 Sementes tratadas com água destilada esterilizada constituíram o tratamento controle.

234 Decorridos 30 dias após a semeadura, realizou-se a avaliação da altura das plantas,
235 número de folhas e peso da matéria-seca da parte aérea, com o objetivo de se verificar a
236 capacidade dos isolados endofíticos em promover o crescimento de plantas de milho. Os
237 dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey (5%).

238

239

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

240 De uma forma geral, todos os isolados selecionados quanto ao antagonismo a *Pythium*
241 *aphanidermatum* (Tabela 1.1) apresentaram ação antagônica aos patógenos desafiante nos
242 testes subseqüentes (Tabela 1.2). Embora *Streptomyces* sp. não tenha inibido o crescimento
243 micelial de *Sclerotium rolfsii*, verificou-se que este isolado e as rizobactérias endofíticas
244 *Bacillus subtilis* 0G e *B. lentimorbus*, apresentaram atividade antagônica superior aos
245 demais, indicando uma inespecificidade de ação, permitindo vislumbrar a possibilidade de
246 sua utilização em diferentes sistemas patógeno-hospedeiro. Resultados semelhantes foram
247 obtidos por MELO e VALARINI (1995), que observaram uma forte ação antagonística de *B.*
248 *subtilis* OG contra alguns patógenos de raízes de feijoeiro, como *Fusarium solani*, *Sclerotinia*
249 *sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, em testes *in vitro*. Em testes *in vivo* o isolado apresentou
250 um controle de 100% sobre a podridão radicular em plantas de pepino, causada por *F.*
251 *solani*. Da mesma forma, AMORIM e MELO (2002) observaram a inibição do crescimento
252 micelial de *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* pela ação de *B. subtilis* 0G e *B. subtilis*
253 RC2, na ordem de 52% em testes *in vitro*. Em plântulas de citros, *B. subtilis* 0G e *B. subtilis*
254 RC2 conferiram uma proteção de 100% e 85,7%, respectivamente. Acredita-se que os
255 mecanismos de ação dessas rizobactérias em controlar os fitopatógenos esteja relacionada
256 à produção de compostos tóxicos (antibiose) e de sideróforos (competição por ferro)
257 (AMORIM e MELO, 2002). Os endofíticos *B. lentimorbus* e *B. subtilis* tem sido relatados no
258 controle de doenças de plantas em alguns trabalhos como os realizados por
259 MONTEALEGRE et al. (2003), que observaram a ocorrência da inibição do crescimento
260 micelial de *Rhizoctonia solani* em culturas pareadas e por antibióticos extraídos desses
261 agentes de biocontrole. SHIOMI et al. (2006) verificaram a supressão da ferrugem do
262 cafeeiro, em testes de germinação de uredíniosporos, discos de folhas, folhas destacadas e
263 em plântulas de café por *B. lentimorbus*. Muitas linhagens de *Streptomyces* ou seus
264 produtos são conhecidos por suprimir o crescimento de fitopatógenos, tanto em testes sob

265 condições de laboratório, como de campo (LIU et al., 1995; YOU et al., 1996; TREJO-
266 ESTRADA et al., 1998; SABARATNAN e TRAQUAIR, 2002).

267 Dentre os endofíticos do milho, o isolado 12R2d/a, identificado como *Bacillus*
268 *agaradhaerens* (Tabela 1.1), proveniente do sistema radicular, apresentou as maiores taxas
269 de inibição aos patógenos desafiantes, em relação aos isolados endofíticos da parte aérea.
270 Este isolado, dentre todos os endofíticos do milho pré-selecionados, foi o único que inibiu o
271 crescimento de *S. rolfsii*, a exemplo de *B. subtilis* e *B. lentimorbus*. Alguns trabalhos
272 demonstram a capacidade de *B. agaradhaerens* em produzir enzimas extracelulares como
273 endoglucanases (HIRASAWA et al., 2006, MELANDER et al., 2006), relacionadas à
274 degradação da parede celular de fitopatógenos como *Phytophthora cinnamomi* (EL-
275 TARABILY et al., 1996) e *Phytophthora fragariae* (VALOIS et al., 1996).

276 Com relação à promoção do crescimento, *Ewingella americana* e *Morganella morganii*
277 se destacaram dos demais isolados, resultando em plantas significativamente mais altas que
278 a testemunha (11,06% e 14,01%, respectivamente) (Tabela 1.3). Para os outros parâmetros
279 avaliados, número de folhas e peso seco da matéria-seca da parte aérea das plantas, não foi
280 observada diferença significativa entre os tratamentos. Pode-se especular a possibilidade da
281 ocorrência de mais de uma forma de ação por parte de *E. americana* e *M. morganii*, como a
282 antibiose, na qual a planta deixaria de direcionar energia para o controle de patógenos,
283 devido à proteção oferecida pelos agentes de controle biológico em questão, podendo
284 desenvolver melhor o seu potencial produtivo; ou mesmo pela produção de substâncias
285 análogas a hormônios vegetais. Também, poderiam induzir o hospedeiro a produzir
286 hormônios vegetais, como auxinas, giberelinas ou citocininas, que poderiam auxiliar na
287 ocorrência de plantas mais altas. Embora não se tenha observado a ocorrência de *Ewingella*
288 *americana* como agente de biocontrole de fitopatógenos, há relatos da sua aparente ação
289 antagônica a *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola*, em basidiomas de *Agaricus bisporus*

290 (CHOWDHURY e HEINEMANN, 2006) e de sua ação micopatogênica sobre o basidioma de
291 *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* (INGLIS e PEBERDY, 1997;
292 INGLIS et al., 2000; REYES et al., 2004). INGLIS e PEBERDY (1997) observaram a
293 produção, por *E. americana*, de endoquitinases com ação quitinolítica sobre o basidioma de
294 *A. bisporus*, o que poderia explicar a forma com que o agente de biocontrole tenha agido na
295 promoção de crescimento do milho no presente trabalho, no qual, através do controle de
296 possíveis fitopatógenos em condições de cultivo, a planta poderia dirigir a sua energia no
297 próprio desenvolvimento. não foram encontrados relatos da ação de *X. axonopodis* no
298 controle de fitopatógenos ou na promoção de crescimento vegetal.

299

300

1.4. REFERÊNCIAS

301 AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora*
302 *parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista**
303 **Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.565-568, 2002.

304 BACON, C.W.; HINTON, D.M.; RICHARDSON, M.D. A corn seedling assay for resistance to
305 *Fusarium moniliforme*. **Plant Disease**, v.78, p.302-305, 1994.

306 BENT, E.; CHANWAY, C.P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole
307 pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of**
308 **Microbiology**. v.44, p.980-988, 1998.

309 BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W.
310 (Ed.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1991. 388p.

311 BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant**
312 **Disease and Protection**, v.105, n.4, p.329-348, 1998.

- 313 CATTELLAN, A.J.; HARTEL, P.G. Traits associated with plant growth-promoting
314 rhizobacteria (PGPR). In: **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de
315 Ciência do Solo, 2000. p.213-234.
- 316 CHOWDHURY, P.R.; HEINEMANN, J.A. The general secretory pathway of *Burkholderia*
317 *gladioli* pv. *agaricola* BG164R is necessary for cavity disease in white button mushrooms.
318 **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.5, p.3558-3565, 2006.
- 319 COSTA, F.G. **Potencial Biotecnológico de Actinomicetos Endofíticos do Milho**. 2005.
320 84f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- 321 EL-TARABILY, K.A.; SYKES, M.L.; KUTBÖKE, I.D.; HARDY, G.; BARBOSA, A.M.; DEKKER,
322 R.F.H. Synergistic effects of a cellulase-producing *Micromonospora carbonacea* and an
323 antibiotic-producing *Streptomyces violascens* on the suppression of *phytophthora cinnamomi*
324 root rot of *Banksia grandis*. **Canadian Journal of Botany**, v.74, p.618-624, 1996.
- 325 GLICK, B.R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to
326 enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v.15, n.2, p.353-378,
327 1997.
- 328 GUTIERREZ-MAÑERO, F.J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J.;
329 TADEO, F.R.; TALON, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumillus* and
330 *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberelins.
331 **Physiologia Plantarum**. V.11, p.206-211, 2001.
- 332 HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOPPER, J.W. Bacterial
333 endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.
- 334 HIRASAWA, K.; UCHIMURA, K.; KASHIWA, M.; GRANT, W.; ITO, S.; KOBAYASHI, T.;
335 HORIKOSHI, K. Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus*
336 *agaradhaerens*. **Antonie van Leeuwenhoek**. V.89, n.2, p.211-219, 2006.

- 337 INGLIS, P.W.; PEBERDY, J.F. Production and purification of a chitinase from *Ewingella*
338 *americana*, a recently described pathogen of the mushroom, *Agaricus bisporus*. **FEMS**
339 **Microbiology Letters**, v.157, n.1, p.189-194, 1997.
- 340 INGLIS, P.W.; PEBERDY, J.F.; SOCKETT, R.E. Cloning of a chitinase gene from *Ewingella*
341 *americana*, a pathogen of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. **Genetics and**
342 **Molecular Biology**, v.23, n.3, p.685-688, 2000.
- 343 LAZAROVITZ, G.; NOWAK, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and
344 establishment. **HortScience**, v.32, n.2, p.188-192, 1997.
- 345 LIU, D.; ANDERSON, N.A.; KINKEL, L.L. Biological control of potato scab in the field with
346 antagonistic *Streptomyces scabies*. **Phytopathology**, v.85, p.827-831, 1995.
- 347 MANTOVANELLO, C.M.; MELO, I.S. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras de
348 crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**,
349 v.20, n.2, p.123-126, 1994.
- 350 MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos
351 de plantas. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p.369-409, 1993.
- 352 MELANDER, C.; ADDEN, R.; BRINKMALM, G.; GORTON, L.; MISCHNICK, P. New
353 approaches to the analysis of enzymatically hydrolyzed methyl cellulose. Part 2. Comparison
354 of various enzyme preparations. **Biomacromolecules**, v.7, n.5, p.1410-1421, 2006.
- 355 MELO, I.S.; VALARINI, P.J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani*
356 (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum*). **Scientia Agrícola**, v.52, n.2, p.326-330, 1995.
- 357 MONTEALEGRE, J.R.; REYES, R.; PÉREZ, L.M.; HERRERA, R.; SILVA, P.; BESOAIN, X.
358 Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in
359 tomato. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.6, n.2, p.116-127, 2003.
- 360 M'PIGA; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T.C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to
361 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic

- 362 bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant**
363 **Pathology**, v.50, p.301-320, 1997.
- 364 NARISAWA, K.; TOKUMATSU, S.; HASHIBA, T. Suppression of clubroot formation in
365 chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. **Plant**
366 **Pathology**, v.47, p.206-210, 1998.
- 367 NORDLUND, D.A. Biological control, integrated pest management and conceptual models.
368 **Biocontrol News and Information**, v.17, n.2, p.35N-44N, 1996.
- 369 PETRINI, O . Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. **Microbial**
370 **ecology of leaves**. New York: Spring Verlag, 1991. p.179-197.
- 371 QUEIROZ, B.P.V. **Isolamento e seleção de rizobactérias para promoção de crescimento**
372 **e controle de *Phytophthora parasítica* em citros**. 2003. 120f. Tese (Doutorado) –
373 Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.
- 374 REYES, J.E.; VENTURINI, M.E.; ORIA, R.; BLANCO, D. Prevalence of *Ewingella americana*
375 in retail fresh cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* and *Pleurotus*
376 *ostreatus*) in Zaragoza (Spain). **FEMS Microbiology Ecology**, v.47, n.3, p.291-296, 2004.
- 377 SABARATNAN, S.; TRAQUAIR, J.A. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the
378 suppression of *Rhizoctonia solani* damping-off in tomato transplants. **Biological Control**,
379 v.23, n.3, p.245-253, 2002.
- 380 SHIOMI, H.F.; SILVA, H.S.A.; MELO, I.S.; NUNES, F.V.; BETTIOL, W. Bioprospecting
381 endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, v.63, n.1,
382 p.32-39, 2006.
- 383 SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; PEREIRA,
384 M.C.B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants:
385 non-specific protection and enzyme activities. **Biological Control**, v.29, p.288-295, 2004.

- 386 TREJO-ESTRADA, S.R.; PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, D.L. Antibiotics and enzymes
387 produced by the biological agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. **Journal of**
388 **Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.81-90, 1998.
- 389 VALOIS, D.; FAYAD, K.; BARBASUBIYE, T.; GARON, M.; DÉRY, C.; BRZEZINSKI, R.;
390 BEAULIEU, C. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*,
391 the causal agent of raspberry root rot. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62,
392 p.1630-1635, 1996.
- 393 VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by
394 rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453-483, 1998.
- 395 VAN VEES, S.C.M.; LUIJEBDIJK, M.; SMOORENBURG, I.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE,
396 C.J.M. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not
397 associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates
398 the expression of jasmonate-inducing gene *atvsp* upon challenge. **Plant-Molecular Biology**,
399 v.41, p.537-549, 1999.
- 400 VARMA, A.; VERMA, S.; SUDA, S.N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*,
401 a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental**
402 **Microbiology**, v.65, p.2741-2744, 1999.
- 403 YOU, M.P.; SIVASITHAMPARAM, K.; KURTBOKE, D.I. Actinomycetes in organic mulch used
404 in avocado plantations and their ability to suppress *Phytophthora cinnamomi*. **Biology and**
405 **Fertility of Soils**, v.22, p.237-242, 1996.
- 406 XIUJUN, Z.; SHIXIANG, W.; YI, Z.; QI, Z. Screening biocontrol agents for *Pythium*-induced
407 disease by germinating carrot seeds in Petri dish – a rapid and effective method. In:
408 WENHUA, T.; COOK, J.R.; ROVIRA, A. **Advances in Biological Control of Plant**
409 **Diseases**. Beijing: China Agricultural University Press, 1996. p.140-144.

410 Tabela 1.1. Identificação dos microrganismos endofíticos do milho obtidos por seleção
 411 massal, quanto ao perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME).

Código	Identificação	Índice de similaridade ¹	Matriz de isolamento
P10F2	<i>Escherichia coli</i> GC subgrupo B	0,574	Folha
P10F4	<i>Morganella morganii</i>	0,650	Folha
P10F5	<i>Ewingella americana</i>	0,539	Folha
14F4a	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	0,529	Folha
16F2g	<i>Microbacterium imperiale</i>	0,806	Folha
12R2 d/a	<i>Bacillus agaradhaerens</i>	0,892	Raiz

412 ¹ parâmetro de semelhança entre a amostra e a biblioteca do programa MIDI – Sherlock
 413 Microbial Identification System

414

415 Tabela 1.2. Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos por microrganismos endofíticos
 416 em testes de antagonismo *in vitro*.

Tratamento	<i>R. solani</i>		<i>S. rolfsii</i>		<i>F. moniliforme</i>		<i>E. turcicum</i>	
	R.C. ¹ (cm)	I.R. ² (%)	R.C. (cm)	I.R. (%)	R.C. (cm)	I.R. (%)	R.C. (cm)	I.R. (%)
Controle	6,33a*	0,00	6,63a*	0,00	6,50a*	0,00	7,22a*	0,00
P10F2	4,27b	32,54	5,73b	13,57	4,33c	33,38	3,20c	44,32
P10F4	4,47b	29,38	6,00ab	9,50	3,93cd	39,54	3,80c	47,57
P10F5	4,20b	33,65	5,90ab	11,01	4,07c	37,38	4,32bc	40,17
14F4a	5,93a	6,32	6,00ab	9,50	6,07ab	6,61	4,97b	31,16
16F2g	6,13a	3,16	6,30 ^a	4,98	5,37b	17,38	5,05b	30,06
<i>B. subtilis</i> 0G	3,23c	48,97	3,80c	42,68	3,00e	53,84	3,85bc	46,68
<i>B. lentimorbus</i>	3,23c	48,97	3,70c	44,19	3,23de	50,31	3,55c	50,83
<i>Streptomyces</i> sp.	4,33b	32,00	6,13ab	4,52	3,53cd	45,69	4,05bc	43,91
12R2 d/a	3,56c	43,76	4,40b	33,63	3,10e	52,31	3,65c	49,45
CV (%)	4,54		4,87		6,64		11,05	

417 * Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade
 418 pelo teste de Tukey.

419 ¹ Raio médio da colônia

420 ² Inibição relativa, onde:

421

422 I.R.(%) = $\frac{(RC-RX)}{RC} \times 100$, sendo:

423

424 RC = raio da colônia do patógeno no tratamento controle

425 RX = raio da colônia do patógeno pareada com o isolado endofítico

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436 Tabela 1.3. Efeito da microbiolização de sementes de milho com endofíticos antagonistas no
 437 controle da mancha foliar de *Exserohilum turcicum* e em alguns parâmetros fisiológicos das
 438 plantas.

Isolado	Altura das plantas (cm)	Nº de folhas	Peso seco da parte aérea (g)
Controle (água)	79,53 b*	5,06 abc	12,08 a
<i>Escherichia coli</i> GC subgrupo B	86,00 ab	4,80 bc	13,09 a
<i>Morganella morganii</i>	90,67 a	4,93 abc	13,55 a
<i>Ewingella americana</i>	88,33 a	5,60 a	12,98 a
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	82,47 ab	5,07 abc	12,77 a
<i>Microbacterium imperiale</i>	85,47 ab	5,27 abc	13,48 a
<i>Bacillus subtilis</i> 0G	86,00 ab	5,40 ab	13,23 a
<i>Bacillus lentimorbus</i>	87,80 ab	5,60 a	14,37 a
<i>Streptomyces</i> sp.	86,53 ab	5,13 abc	11,41 a
<i>Bacillus agaradhaerens</i>	85,20 ab	4,67 c	14,18 a
CV (%)	8,51	11,09	13,18

439 * Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade
 440 pelo teste de Tukey.

441

442

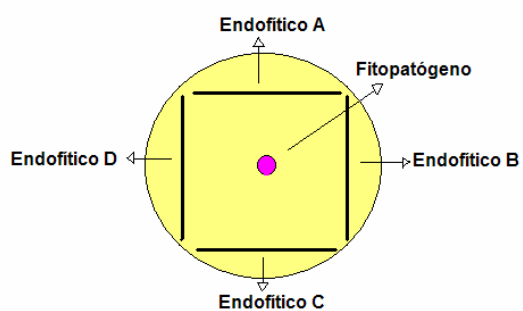


Figura 1.1.A. Modelo esquemático de antagonismo *in vitro* utilizado, para a realização de seleção massal de endofíticos do milho.

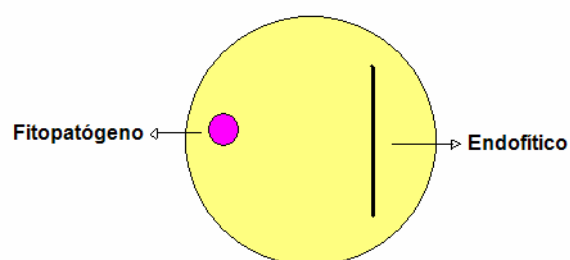
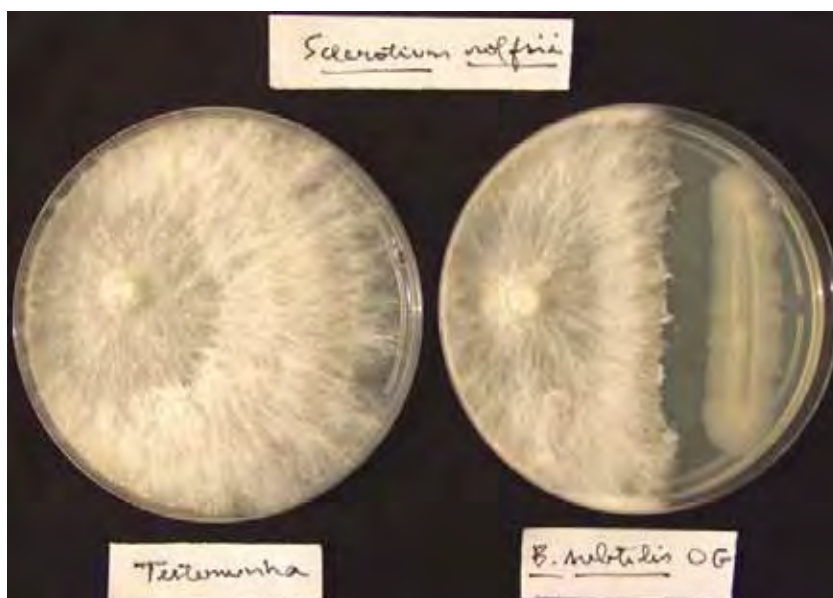


Figura 1.1.B. Modelo esquemático de antagonismo *in vitro* utilizado, para testes de antagonismo com os isolados endofíticos selecionados.

443

444



445

446

447

Figura 1.2. Ação antagônica de *Bacillus subtilis* 0G a *Sclerotium rolfsii*.

448

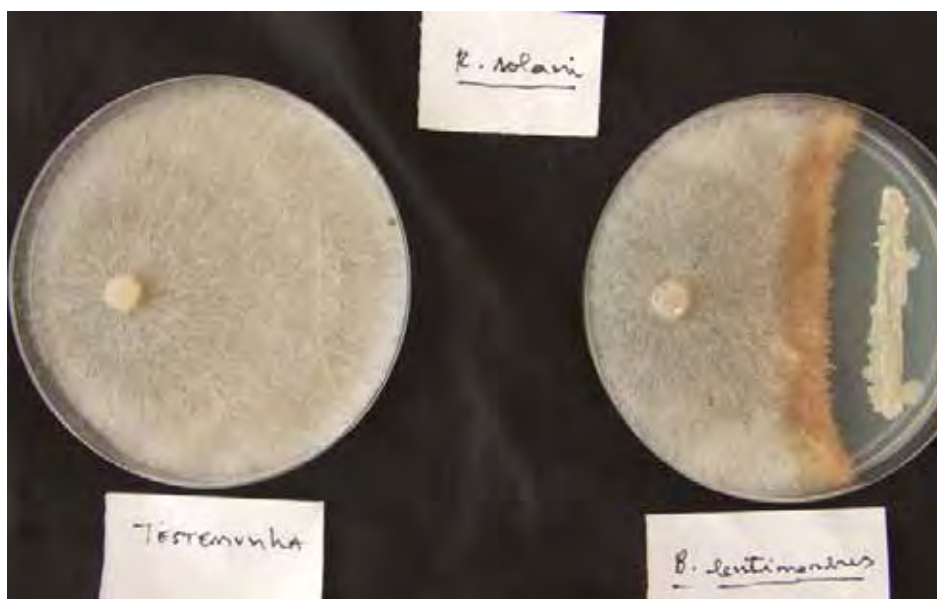
449
450
451
452

Figura 1.3. Ação antagônica de *Bacillus lentimorbus* a *Rhizoctonia solani*.

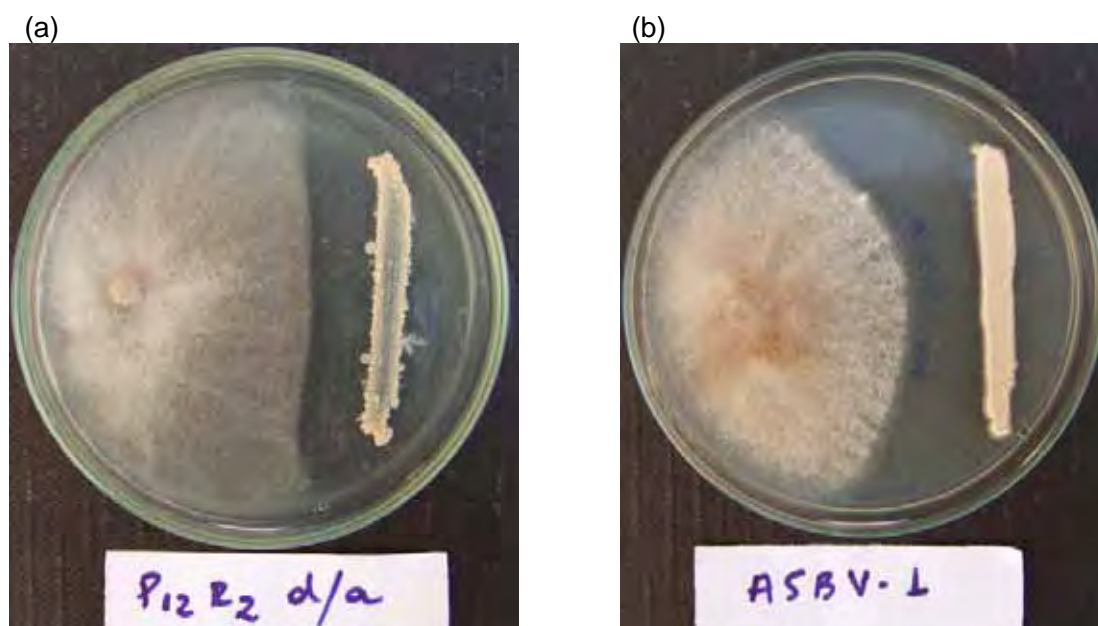
453
454
455

Figura 1.4. Ação antagônica de *Bacillus agaradhaerens* (a) e *Streptomyces* sp. (b) a *Exserohilum turcicum*.

1 **EFEITO DO MODO DE APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA SUA EFICÁCIA**
2 **SOBRE O BIOCONTROLE DA MANCHA DE *Exserohilum turcicum* EM PLANTAS DE**
3 **MILHO (*Zea mays* L.)**

4

5 ***EFFECT OF APPLICATION MODE OF ENDOPHYTIC BACTERIA ON THEIR***
6 ***EFFECTIVENESS IN BIOLOGICAL CONTROL *Exserohilum turcicum* leaf spot***

7 Humberto Franco SHIOMI¹

8 Itamar Soares de MELO²

9 Marli Teixeira de Almeida MINHONI³

10

11 ¹ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Agronomia, Professor Colaborador do Departamento de
12 Agronomia da UNICENTRO, CP 3010, 85015-430, Guarapuava-PR; E-mail:
13 hfshiomi@yahoo.com.br . Autor para correspondência.

14 ² Engenheiro agrônomo, Doutor em Agronomia, Pesquisador da CNPMA/EMBRAPA, CP 69,
15 13820-000, Jaguariúna-SP, E-mail: Itamar@cnpma.embrapa.br

16 ³ Professora Doutora do Departamento de Defesa Fitossanitária da FCA/UNESP, CP 237,
17 18603-970, Botucatu-SP, E-mail: marliminhoni@fca.unesp.br

18

RESUMO

19

20

21 SHIOMI, H.F.; MELO, I.S.; MINHONI, M.T.A. **Efeito do modo de aplicação de bactérias**
22 **endofíticas na sua eficácia sobre o biocontrole da mancha de *Exserohilum turcicum***
23 **em plantas de milho (*Zea mays* L.). *Scientia Agraria*, 2007.**

24

25 O presente trabalho teve por objetivo avaliar o modo de aplicação de nove isolados de
26 bactérias endofíticas selecionados quanto ao antagonismo a fungos fitopatogênicos, na sua
27 eficácia no biocontrole da mancha foliar de *Exserohilum turcicum*. Os endofíticos foram
28 submetidos a dois modos de inoculação em milho: através da microbiolização das sementes
29 e pela pulverização da parte aérea das plantas em diferentes períodos (72 e 24 horas antes
30 e no mesmo dia da inoculação do patógeno) em cultivos sob condições de casa-de-
31 vegetação. Nos testes em que houve a pulverização da parte aérea das plantas de milho
32 com os isolados endofíticos, verificou-se que os isolados *Bacillus subtilis* 0G, *Bacillus*
33 *lentimorbus* *Streptomyces* sp. e *Bacillus agaradhaerens* se destacaram dos demais,
34 reduzindo a severidade da doença em todos os intervalos de aplicação testados, na ordem
35 de 16 a 39%. Dentre os endofíticos do milho, *Bacillus agaradhaerens* foi o mais eficiente.
36 Nos testes em que houve a microbiolização das sementes, os isolados *B. lentimorbus*,
37 *Streptomyces* sp., *Ewingella americana* e *Xanthomonas axonopodis* foram os mais
38 eficientes, com um controle relativo variando entre 23% e 35%. Pode-se especular a
39 possibilidade de estar ocorrendo mais de um modo de ação por parte dos endofíticos
40 antagonistas, uma vez que atividades de inibição foram observadas em testes específicos,
41 como antagonismo *in vitro* e pela aplicação dos agentes de controle biológico nas sementes
42 de milho ou na parte aérea das plantas, no qual é possível que o controle se dê através da
43 indução de resistência sistêmica no hospedeiro.

44 **Palavras-chave:** *Exserohilum turcicum*, controle biológico, endofíticos, milho

45

46

ABSTRACT

47

48 SHIOMI, H.F.; MELO, I.S.; MINHONI, M.T.A. **EFFECT OF APPLICATION MODE OF**
49 **ENDOPHYTIC BACTERIA ON THEIR EFFECTIVENESS IN BIOLOGICAL CONTROL**
50 ***Exserohilum turcicum* leaf spot, Scientia Agraria, 2007.**

51

52 The present study aimed assess the mode of application of nine strains of endophytic
53 bacteria selected by the antagonism action to plant pathogenic fungi on their effectiveness in
54 the biological control of *Exserohilum turcicum* leaf spot. The endophytes were subjected to
55 two modes of inoculation in corn: through the seed microbiolization and the aerial spraying of
56 maize plants in different times (72 and 24 hours before and in the same day of the pathogen
57 inoculation) in crops under greenhouse conditions. In tests in which there was a spraying of
58 the aerial part of maize plants with the endophytes, it was found that the isolated *Bacillus*
59 *subtilis* 0G, *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp. and *Bacillus agaradhaerens* be
60 highlighted from the others, reducing the severity of the disease in all intervals of application
61 tested in the order of 16 to 39%. Among the maize endophytes, *B. agaradhaerens* was the
62 most efficient. In tests in which there was a seed microbiolization, the strain *B. lentimorbus*,
63 *Streptomyces* sp., *Ewingella americana* and *Xanthomonas axonopodis* were the most
64 efficient, with a control on ranging between 23% and 35%. We can speculate the possibility to
65 be occurring more than one mode of action by endophytes biocontrol agents, because
66 inhibition activities were observed in specific tests, such as *in vitro* antagonism and the
67 application of biological control agents in corn seeds and in the aerial part of maize plants, in
68 that the control is possible to give through the systemic resistance induction in the host.

69 **Key-words:** *Exserohilum turcicum*, biological control, endophytics, maize

70

71

2.1. INTRODUÇÃO

72 A cultura do milho ocupa uma posição de destaque como uma das espécies vegetais
73 mais cultivadas e conhecidas no mundo, apresentando uma multiplicidade de aplicações,
74 tanto na alimentação, como servindo de matéria-prima em diversificados complexos agro-
75 industriais (ANDRADE, 1997).

76 Esta espécie vegetal é acometida por vários agentes causadores de doenças, das mais
77 variadas naturezas, cujo controle, na maioria das vezes, é realizado através de variedades
78 resistentes e por aplicações sistemáticas de agroquímicos. Entre os principais fitopatógenos,
79 destaca-se o fungo *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs, (teleomorfo
80 *Setosphaeria turcica*), causador da mancha foliar de *Exserohilum*, “northern leaf blight” ou
81 queima das folhas do milho (PINTO, 1997).

82 A doença ocorre de forma generalizada em todo o mundo (CARSON e VAN DYKE,
83 1994), causando perdas econômicas superiores a 50%, decorrentes de um desfolhamento
84 excessivo durante o período de enchimento de grãos (FERNANDES e BALMER, 2002). No
85 Brasil, a doença ocorre em todas as regiões produtoras, principalmente na região Sul e nas
86 chapadas da região Centro-Oeste (PEREIRA, 1995), onde o patógeno encontra as
87 condições ambientais propícias para o seu desenvolvimento.

88 O uso indiscriminado de agroquímicos e os problemas decorrentes de sua utilização,
89 assim como a pressão da sociedade por alimentos mais saudáveis e pela preservação dos
90 ecossistemas, têm aumentado a busca por ferramentas alternativas ao uso de biocidas, que
91 sejam eficientes no controle de fitopatógenos nos mais variados agroecossistemas
92 (BETTIOL, 1991; NORDLUND, 1996; SILVA et al., 2004).

93 Nesse contexto, os microrganismos têm se apresentado como uma alternativa
94 promissora e viável no biocontrole de fitopatógenos nos mais variados patossistemas (LIMA
95 et al., 1994; NARISAWA et al., 1998) e na promoção de crescimento vegetal (CHEN et al.,
96 1996; NARISAWA et al., 1998; SILVA et al., 2004).

97 A supressão de doenças pode estar relacionada a diversos mecanismos, como a
98 antibiose (STURZ et al., 1998) e competição por nutrientes (MARI et al., 1996).
99 Indiretamente, pela produção de substâncias promotoras de crescimento (HALLMANN et al.,
100 1997; BENT e CHANWAY, 1998; NARISAWA et al., 1998; VARMA et al., 1999) ou através
101 de indução de resistência sistêmica no hospedeiro (BUCHENAUER, 1998; VAN LOON et al.,
102 1998; VAN VEES et al., 1999)

103 Para que haja um controle eficiente de um fitopatógeno por um determinado agente de
104 controle biológico, há a necessidade de se levar em consideração alguns fatores, como, por
105 exemplo, a melhor forma introduzi-lo no hospedeiro. Muitos têm sido inoculados através da
106 microbiolização das sementes (SILVA et al., 2004), ou mesmo no sistema radicular das
107 plantas (MASSOMO et al., 2004). Outros pela pulverização da parte aérea das plantas com
108 propágulos do agente de biocontrole (BETTIOL et al., 1994; SHIOMI et al., 2006).

109 Assim, o presente trabalho tem por objetivo verificar o efeito do modo de aplicação de
110 isolados endofíticos do milho, na supressão de *Exserohilum turcicum*, em testes sob
111 condições de casa-de-vegetação, através da microbiolização das sementes e da parte aérea
112 de plantas de milho, com agentes de biocontrole, selecionados previamente quanto ao
113 antagonismo *in vitro* a diversos fitopatógenos.

114

115

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

116

2.2.1. Cultivo e multiplicação de microrganismos

117 Todos os isolados de microrganismos utilizados no presente trabalho foram obtidos da
118 coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA - Meio
119 Ambiente, em Jaguariúna-SP.

120 Nesse estudo foram incluídos um isolado dos endofíticos *Bacillus subtilis* 0G, *Bacillus*
121 *lentimorbus* e *Streptomyces* sp. e seis isolados de bactérias endofíticas do milho (Tabela
122 2.1.), pré-selecionados quanto à atividade antagônica a *Pythium aphanidermatum*,
123 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotium rolfsii* e *Exserohilum turcicum* em
124 testes *in vitro*. Os isolados, conservados em óleo mineral a 20 ± 2 °C, foram multiplicados em
125 meio TSBA a 25 ± 2 °C e incubados por 48 horas.

126

127 **2.2.2. Bioensaio em condições de casa de vegetação. I. Controle da mancha foliar** 128 **de *Exserohilum* pela aplicação de bactérias endofíticas na parte aérea de plantas de** 129 **milho em diferentes períodos de inoculação**

130 Para a realização dos testes, foi utilizado um genótipo de milho suscetível ao patógeno,
131 híbrido comercial AS-1548 (Agroeste Sul Sementes S.A.). Sementes de milho tratadas
132 quimicamente foram colocadas para germinar em vasos com capacidade para 5 litros,
133 contendo uma mistura de latossolo vermelho-amarelo não esterilizado, adicionado de 1,0 g.
134 dm^{-3} de solo de N-P-K (4-14-8) e 1,5 g. dm^{-3} de solo calcário calcítico e do substrato
135 comercial Multiplant (Terra do Paraíso LTDA), na proporção 1:3 (v/v). Os vasos foram
136 mantidos sob condições de casa de vegetação e irrigação diária à 25 ± 5 °C. O delineamento
137 experimental adotado foi o de blocos casualizados em 4 repetições (cada vaso consistiu de
138 uma repetição, com 5 plântulas por vaso). Cada isolado endofítico testado (num total de 9)
139 representou um tratamento. Como tratamentos controle, a testemunha positiva consistiu da
140 pulverização das plantas apenas com a suspensão do patógeno. A testemunha negativa
141 consistiu da pulverização das plantas apenas com água destilada esterilizada, perfazendo

142 um total de 11 tratamentos em 4 repetições. Foi testada a aplicação das bactérias
143 endofíticas em três períodos diferentes: 72 e 24 horas antes e no mesmo dia da inoculação
144 do patógeno, no qual as plantas foram submetidas a 24 horas de incubação em câmara
145 úmida e na ausência de luz, para abertura dos estômatos e melhor penetração dos
146 endofíticos.

147 A culturas de *E. turcicum* com 7 dias incubação em placas de Petri, foram adicionadas,
148 sob condições assépticas, 20 mL de água destilada esterilizada, adicionada de Tween 80, na
149 proporção de uma gota por 800 mL de água. Em seguida, com o auxílio de uma escova de
150 cerdas macias, realizou-se o desprendimento superficial das colônias. O material removido
151 foi filtrado (dupla camada de gaze esterilizada) e acondicionado em Becker, para a obtenção
152 de uma suspensão de conídios, livre de meio de cultura ou micélio. A concentração de
153 esporos foi padronizada a 3.10^4 conídios.mL⁻¹, obtida pela contagem de conídios obtida pela
154 média de dez leituras, com o auxílio de hemocitômetro (THAKUR et al., 1989).

155 Decorridos 14 dias após a semeadura, no estágio de crescimento de 3-4 folhas,
156 realizou-se a inoculação da parte aérea das plântulas, pela pulverização de uma suspensão
157 de conídios do patógeno, com o auxílio de um compressor de ar (10 libras.pol² de pressão).
158 Antes e após a inoculação, as plântulas foram submetidas a 24 horas de incubação em
159 câmara úmida, no escuro e a 23 ± 2 °C, sendo, em seguida, transferidas para casa de
160 vegetação, onde foram mantidas sob irrigação diária, até a realização da avaliação dos
161 sintomas.

162 Para a avaliação dos sintomas, foram atribuídas notas à severidade dos sintomas, 14
163 dias após a inoculação do patógeno sobre as plântulas (ESTEVES, 1989; KAMIKOGA et al.,
164 1991) e adotada uma escala de notas, conforme o descrito por FERNANDES e BALMER
165 (2002): 1 – plantas limpas ou apresentando pontos cloróticos; 2 – pequenas lesões clorótico-
166 necróticas de formato circular; 3 – lesões clorótico-necróticas maiores, podendo coalescer; 4

167 – lesões necróticas estreitas e 5 – lesões necróticas largas, com ou sem murcha e/ou seca
168 das extremidades das folhas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância,
169 teste F e teste de Tukey (5%).

170

171 **2.2.3. Bioensaio em condições de casa de vegetação. II. Controle da mancha**
172 **foliar de *Exserohilum* pela microbiolização das sementes com isolados endofíticos.**

173 Sementes de milho de baixa tolerância ao patógeno, híbrido comercial AS-1548
174 (Agroeste Sul Sementes S.A) tratadas quimicamente, tiveram os fungicidas removidos
175 previamente, segundo os procedimentos descritos por BACON et al. (1994). As sementes
176 foram imersas em água de torneira e colocadas em agitador magnético por 5 minutos. Em
177 seguida foram imersas em solução de álcool etílico a 70% por 3 minutos e lavadas
178 imediatamente em água de torneira por 5 vezes. Por último, nova imersão das sementes foi
179 feita em solução de hipoclorito de sódio por 3 minutos em agitador magnético, seguido de
180 lavagem em água destilada por 5 vezes.

181 Culturas de microrganismos antagonistas, selecionados previamente nos testes de
182 antagonismo *in vitro*, foram cultivados em meio TSBA por 48 horas a 25 ± 2 °C e suas
183 respectivas suspensões de células bacterianas preparadas com o ajuste de turbidez pela
184 escala de Mc Farland, na concentração de aproximadamente 10^9 ufc mL⁻¹
185 (MANTOVANELLO e MELO, 1994). As sementes de milho foram inoculadas, através de
186 imersão em suspensão, contendo células do antagonista por 60 minutos e sob agitação.

187 As sementes de milho microbiolizadas com os isolados endofíticos selecionados, foram
188 colocadas para germinar em vasos de 5 litros de capacidade, contendo latossolo vermelho-
189 amarelo não esterilizado, adicionado de $1,0 \text{ g. dm}^{-3}$ de solo de N-P-K (4-14-8) e $1,5 \text{ g. dm}^{-3}$
190 de solo calcário calcítico e do substrato comercial Multiplant (Terra do Paraíso LTDA) na
191 proporção 1:3 (v/v) e transferidas para casa de vegetação a 25 ± 5 °C e sob irrigação diária.

192 Cada parcela experimental consistiu de um vaso com 5 plântulas em 3 repetições, num
193 delineamento inteiramente ao acaso, onde cada isolado endofítico representou um
194 tratamento. Plântulas tratadas com água destilada esterilizada constituíram o tratamento
195 controle.

196 Decorridos 14 dias após o plantio, no estágio de crescimento de 3-4 folhas, realizou-se
197 a inoculação da parte aérea das plântulas com o auxílio de um compressor de ar (10
198 libras.pol⁻² de pressão), pela pulverização de uma suspensão de conídios do patógeno,
199 padronizado a 3.10^4 conídios.mL⁻¹, com o auxílio de hemocitômetro. Antes e após a
200 inoculação, as plântulas foram submetidas a 24 horas de incubação em câmara úmida, no
201 escuro e a 23 ± 2 °C, sendo, em seguida, transferidas para casa de vegetação, sob irrigação
202 diária, onde foram mantidas até a realização da avaliação dos sintomas.

203 Para a avaliação dos sintomas, foram atribuídas notas à severidade dos sintomas 14
204 dias após a inoculação do patógeno nas plântulas e adotada uma escala de notas, conforme
205 o descrito por FERNANDES e BALMER (2002): 1 – plantas limpas ou apresentando pontos
206 cloróticos; 2 – pequenas lesões clorótico-necróticas de formato circular; 3 – lesões clorótico-
207 necróticas maiores, podendo coalescer; 4 – lesões necróticas estreitas e 5 – lesões
208 necróticas largas, com ou sem murcha e/ou seca das extremidades das folhas. Os dados
209 obtidos foram submetidos à análise de variância, teste F e teste de Tukey (5%).

210

211

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

212 Nos testes em plantas sob condições de casa-de-vegetação, os isolados *B. subtilis* OG,
213 *B. lentimorbus* *Streptomyces* sp. e *B. agadhaerens* se destacaram dos demais isolados,
214 reduzindo a severidade da doença em todos os intervalos de aplicação testados, variando
215 entre 16 e 39% (Tabela 2.2.), quando aplicados 72 e 24 horas e no mesmo dia da inoculação
216 do patógeno. Resultados semelhantes obtidos por SHIOMI et al. (2006), BETTIOL et al.
217 (1994) e BETTIOL e VÁRZEA (1992), mostram que a eficiência de certas bactérias

218 endofíticas em controlar alguns fitopatógenos pode variar com o momento de aplicação do
219 agente de biocontrole. Esses autores observaram a redução na porcentagem de área de
220 folhas lesionadas por *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem do cafeeiro, quando
221 isolados endofíticos foram aplicados 72 e 24 horas antes e concomitantemente à aplicação
222 de uma suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix* em testes em discos de folhas, folhas
223 destacadas e em plantas de cafeeiro. O fato de os agentes de controle biológico estarem
224 mostrando atividade contra os patógenos desafiantes em períodos que antecedem ou ao
225 mesmo tempo da aplicação do fitopatógeno sugere que os antagonistas possam estar
226 agindo por antibiose, lise das estruturas do patógeno, competição ou indução de resistência
227 sistêmica no hospedeiro. Pode-se especular, também, a possibilidade de estar ocorrendo
228 mais de um modo de ação por parte dos endofíticos antagonistas, uma vez que atividades
229 de inibição foram observadas em testes específicos, como antagonismo *in vitro* e aplicação
230 dos agentes de controle biológico sobre plantas de milho em diferentes intervalos de tempo.

231 Nos testes em que houve a microbiolização das sementes com os isolados endofíticos,
232 observou-se que os isolados *B. lentimorbus*, *Streptomyces* sp., *Ewingella americana* e
233 *Xanthomonas axonopodis* foram os mais efetivos na redução da severidade da doença, com
234 um controle relativo variando entre 23% e 35% (Tabela 2.3.). Pode-se especular a
235 possibilidade de estar ocorrendo mais de um modo de ação por parte dos endofíticos
236 antagonistas, uma vez que atividades de inibição foram observadas em testes específicos,
237 como antagonismo *in vitro* e pela aplicação dos agentes de controle biológico nas sementes
238 de milho, cujo controle é possível que se dê através da indução de resistência sistêmica no
239 hospedeiro.

240 Uma forte ação antagonística de *B. subtilis* 0G foi reportada por MELO e VALARINI
241 (1995), contra alguns patógenos de raízes de feijoeiro, como *Fusarium solani*, *Sclerotinia*
242 *sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, em testes *in vitro*. Em testes *in vivo* o isolado apresentou

243 um controle de 100% sobre a podridão radicular em plantas de pepino, causada por *F.*
244 *solani*. Da mesma forma, AMORIM e MELO (2002) observaram a inibição do crescimento
245 micelial de *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* pela ação de *B. subtilis* 0G e *B. subtilis*
246 RC2, na ordem de 52% em testes *in vitro*. Em plântulas de citros, *B. subtilis* 0G e *B. subtilis*
247 RC2 conferiram uma proteção de 100% e 85,7%, respectivamente. Acredita-se que os
248 mecanismos de ação dessas rizobactérias em controlar os fitopatógenos esteja relacionada
249 à produção de compostos tóxicos (antibiose) e de sideróforos (competição por ferro)
250 (AMORIM e MELO, 2002).

251 KIM et al. (2002) relataram que *B. lentimorbus* produz as substâncias antifúngicas alfa
252 e beta-glicosidases, com ação inibitória a *Botrytis cinerea*. SAFDI et al. (2001) reportaram
253 que esta bactéria é capaz de liberar substâncias voláteis que auxiliam na inibição de
254 *Fusarium sambucicum* em tubérculos de batatas. Resultados semelhantes foram obtidos por
255 MASSOMO et al. (2004) que verificaram a ocorrência do controle da podridão negra na parte
256 aérea de plantas de repolho (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) por *B. lentimorbus*,
257 especialmente quando o agente de biocontrole foi inoculado através das raízes das plantas.
258 *B. lentimorbus* tem sido relatado em vários trabalhos controlando efetivamente fitopatógenos,
259 como os realizados por SHIOMI et al. (2006), que observaram a supressão da ferrugem do
260 cafeeiro, em testes de germinação de uredíniosporos, discos de folhas, folhas destacadas e
261 em plântulas de café por bactérias endofíticas do cafeeiro, entre elas, *B. lentimorbus*.
262 MONTEALEGRE et al. (2003) observaram a ocorrência da inibição do crescimento micelial
263 de *Rhizoctonia solani* por antibióticos extraídos desse agente de biocontrole.
264 BAUMGARTNER e WARNOCK (2006) observaram significativa inibição do crescimento de
265 colônias de *Armillaria mellea* por *B. lentimorbus*, que, em plantas inoculadas com o
266 patógeno, conferiu um benefício terapêutico às plantas, melhorando a sua produtividade em
267 níveis comparáveis às plantas saudáveis.

268 Embora não se tenha observado a ocorrência de *Ewingella americana* como agente de
269 biocontrole de fitopatógenos, há relatos da sua aparente ação antagônica a *Burkholderia*
270 *gladioli* pv. *agaricicola*, em basidiomas de *Agaricus bisporus* (CHOWDHURY e HEINEMANN,
271 2006) e de sua ação micopatogênica sobre o basidioma de *Agaricus bisporus*, *Lentinula*
272 *edodes* e *Pleorotus ostreatus* (INGLIS e PEBERDY, 1997; INGLIS et al., 2000; REYES et al.,
273 2004). INGLIS e PEBERDY (1997) observaram a produção, por *E. americana*, de
274 endoquitinases com ação quitinolítica sobre o basidioma de *A. bisporus*, o que poderia
275 explicar a forma com que o agente de biocontrole tenha agido na promoção de crescimento
276 do milho no presente trabalho, no qual, através do controle de possíveis fitopatógenos em
277 condições de cultivo, a planta poderia dirigir a sua energia no próprio desenvolvimento. não
278 foram encontrados relatos da ação de *X. axonopodis* no controle de fitopatógenos ou na
279 promoção de crescimento vegetal.

280 Muitas linhagens de *Streptomyces* ou seus produtos são conhecidos por suprimir o
281 crescimento de fitopatógenos, tanto em testes sob condições de laboratório, como de campo
282 (LIU et al., 1995; YOU et al., 1996; KUNOH, 2002; SABARATNAN e TRAQUAIR, 2002).
283 TREJO-ESTRADA et al. (1998) observaram a produção de compostos com atividade
284 antifúngica de *Streptomyces violaceusniger* a uma série de fungos e a alguns oomicetos,
285 como *Pythium* e *Phytophthora* spp., entre elas, as enzimas hidrolíticas quitinase e beta-1,3
286 glucanase.

287 Alguns trabalhos demonstram a capacidade de *B. agaradhaerens* em produzir enzimas
288 extracelulares como endoglucanases (HIRASAWA et al., 2006, MELANDER et al., 2006),
289 relacionadas à degradação da parede celular de fitopatógenos como *Phytophthora*
290 *cinnamomi* (EL-TARABILY et al., 1996) e *Phytophthora fragariae* (VALOIS et al., 1996).

291 Apesar de terem sido testados um número relativamente pequeno de microrganismos
292 endofíticos, resultados promissores foram obtidos, com relação à seleção de agentes

293 eficientes no biocontrole de *Exserohilum turcicum*. Há a necessidade de serem realizados
294 mais estudos para se avaliar o real potencial destes endofíticos no controle de fitopatógenos,
295 seu modo de ação, aplicação de diferentes densidades populacionais ou mesmo de sua
296 ação conjunta e a melhor forma de introduzi-los no hospedeiro, assim como a sua reação a
297 fatores abióticos, como a exposição a agroquímicos, por exemplo.

298 Os resultados apresentados mostram que os endofíticos *B. lentimorbus* e *Streptomyces*
299 sp. foram os únicos isolados que se mostraram eficientes no controle de diversos fungos
300 fitopatogênicos, inclusive *Exserohilum turcicum* em todos os ensaios, tanto *in vitro*, de onde
301 os isolados testados foram selecionados, como pela microbiolização das sementes ou da
302 parte aérea de milho, indicando uma inespecificidade de ação ou mesmo a ocorrência de
303 mais de uma forma de controle do fitopatógeno. Apesar de terem sido testados um número
304 relativamente pequeno de microrganismos endofíticos, resultados promissores foram
305 obtidos, com relação à seleção de agentes eficientes no biocontrole de *E. turcicum*. Há a
306 necessidade de serem realizados mais estudos para se avaliar o real potencial destes
307 endofíticos como agentes de controle biológico e como promotores de crescimento vegetal,
308 seu modo de ação, aplicação de diferentes densidades populacionais e a melhor forma de
309 introduzi-los no hospedeiro, assim como a sua reação a fatores abióticos, como a exposição
310 a agroquímicos, por exemplo.

311

312

2.4. REFERÊNCIAS

313 AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora*
314 *parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista**
315 **Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.565-568, 2002.

316 ANDRADE, L.N.T. **Nutrição de carbono e nitrogênio, sob diferentes períodos de**
317 **incubação e regimes de luz, em três espécies de *Helminthosporium* patogênicas ao**

- 318 **milho (*Zea mays* L.)**. 1997. 92f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
319 Pernambuco, Recife, 1997.
- 320 BACON, C.W.; HINTON, D.M.; RICHARDSON, M.D. A corn seedling assay for resistance to
321 *Fusarium moniliforme*. **Plant Disease**, v.78, p.302-305, 1994.
- 322 BAUMGARTNER, K.; WARNOCK, A. A soil inoculant inhibits *Armillaria mellea* in vitro and
323 improves productivity of grapevines with root disease. **Plant Disease**, v.90, n.4, p.439-444,
324 2006.
- 325 BENT, E.; CHANWAY, C.P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole
326 pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of**
327 **Microbiology**. v.44, p.980-988, 1998.
- 328 BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W.
329 (Ed.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1991. 388p.
- 330 BETTIOL, W.; SAITO, M.L.; BRANDÃO, M.S.B. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos
331 à base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, v.20, p.119-122, 1994.
- 332 BETTIOL, W.; VARZEA, V.M.P. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro
333 com *Bacillus subtilis* em condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.91-95, 1992.
- 334 BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant**
335 **Disease and Protection**, v.105, n.4, p.329-348, 1998.
- 336 CARSON, M.L.; VAN DYKE, C.G. Effect of light and temperature on expression of partial
337 resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. **Plant Disease**, v.78, p.519-522, 1994.
- 338 CHEN, Y.; MEI, R.; LU, S.; LIU, L.; KLOEPPER, J.W. The use of yield increasing bacteria
339 (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: UTKHEDE, R.S.;
- 340 CHOWDHURY, P.R.; HEINEMANN, J.A. The general secretory pathway of *Burkholderia*
341 *gladioli* pv. *agaricicola* BG164R is necessary for cavity disease in white button mushrooms.
342 **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.5, p.3558-3565, 2006.

- 343 EL-TARABILY, K.A.; SYKES, M.L.; KUTBÖKE, I.D.; HARDY, G.; BARBOSA, A.M.; DEKKER,
344 R.F.H. Synergistic effects of a cellulase-producing *Micromonospora carbonacea* and an
345 antibiotic-producing *Streptomyces violascens* on the suppression of *phytophthora cinnamomi*
346 root rot of *Banksia grandis*. **Canadian Journal of Botany**, v.74, p.618-624, 1996.
- 347 ESTEVES, M.C.F. **Reações a *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs em milho**
348 **(*Zea Mays* L.) e variabilidade do patógeno**. 1989. 55f. Dissertação (Mestrado) – Escola
349 Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1989.
- 350 FERNANDES, M.C.A.; BALMER, E. Variabilidade de isolados de *Exserohilum turcicum* em
351 cultivares de milho (*Zea mays*). **Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida**, v.22,
352 n.1., p.01-05, 2002.
- 353 HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOPPER, J.W. Bacterial
354 endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.
- 355 HIRASAWA, K.; UCHIMURA, K.; KASHIWA, M.; GRANT, W.; ITO, S.; KOBAYASHI, T.;
356 HORIKOSHI, K. Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus*
357 *agaradhaerens*. **Antonie van Leeuwenhoek**. V.89, n.2, p.211-219, 2006.
- 358 INGLIS, P.W.; PEBERDY, J.F. Production and purification of a chitinase from *Ewingella*
359 *americana*, a recently described pathogen of the mushroom, *Agaricus bisporus*. **FEMS**
360 **Microbiology Letters**, v.157, n.1, p.189-194, 1997.
- 361 INGLIS, P.W.; PEBERDY, J.F.; SOCKETT, R.E. Cloning of a chitinase gene from *Ewingella*
362 *americana*, a pathogen of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. **Genetics and**
363 **Molecular Biology**, v.23, n.3, p.685-688, 2000.
- 364 KAMIKOGA, A.T.M.; SALGADO, C.L.; BALMER, E. Reações de diferentes populações de milho
365 de pipoca (*Zea mays*) a *Helminthosporium turcicum*. **Summa Phytopathologica**, v.17(2),
366 p.100-104, 1991.

- 367 KIM, K.J.A.; YANG, Y.J.; KIM, J. Production of alpha-glucosidade inhibitor by beta-
368 glucosidade inhibitor producing *Bacillus lentimorbus* B-6. **Journal of Microbiology and**
369 **Biotechnology**. v.12, p.895-900, 2002.
- 370 KUNOH, H. Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents. **Journal of General Plant**
371 **Pathology**, v.68, p.249-252, 2002.
- 372 LIMA, G.; IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; SALERNO, M. Attempts in the biological control of citrus
373 mal secco (*Phoma tracheiphila*) using endophytic bacteria. **Difesa Delle Piante**, Bologna, v.17,
374 n.1-2, p.43-49, 1994.
- 375 LIU, D.; ANDERSON, N.A.; KINKEL, L.L. Biological control of potato sacab in the field with
376 antagonistic *Streptomyces scabies*. **Phytopathology**, v.85, p.827-831, 1995.
- 377 MANTOVANELLO, C.M.; MELO, I.S. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras de
378 crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**,
379 v.20, n.2, p.123-126, 1994.
- 380 MARI, M.; GUIZZARDI, M.; PRATELLA, G.C. Biological control of gray mold in pears by
381 antagonistic bacteria. **Biological Control**, v.7, p.30-37,1996.
- 382 MASSOMO, S.M.S.; MORTENSEN, C.N.; MABAGALA, R.B.; NEWMAN, M.A.;
383 HOCKENHULL, H. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)
384 of cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. **Journal of Phytopathology**, v.152, n.2, p.98-
385 105, 2004.
- 386 MELANDER, C.; ADDEN, R.; BRINKMALM, G.; GORTON, L.; MISCHNICK, P. New
387 approaches to the analysis of enzymatically hydrolyzed methyl cellulose. Part 2. Comparison
388 of various enzyme preparations. **Biomacromolecules**, v.7, n.5, p.1410-1421, 2006.
- 389 MELO, I.S.; VALARINI, P.J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.)
390 Sacc. em pepino (*Cucumis sativum*). **Scientia Agrícola**, v.52, n.2, p.326-330, 1995.

- 391 MONTEALEGRE, J.R.; REYES, R.; PÉREZ, L.M.; HERRERA, R.; SILVA, P.; BESOAIN, X.
392 Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in
393 tomato. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.6, n.2, p.116-127, 2003.
- 394 NARISAWA, K.; TOKUMATSU, S.; HASHIBA, T. Suppression of clubroot formation in
395 chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. **Plant**
396 **Pathology**, v.47, p.206-210, 1998.
- 397 NORDLUND, D.A. Biological control, integrated pest management and conceptual models.
398 **Biocontrol News and Information**, v.17, n.2, p.35N-44N, 1996.
- 399 PEREIRA, O.A.P. Análise da situação atual de doenças do milho no Brasil e disponibilidade
400 de germoplasma resistente. **Summa Phytopathologica**, v.21, n.1, p.67-70, 1995.
- 401 PINTO, N.F.J.A Efeito de fungicidas no controle de doenças foliares do milho. **Summa**
402 **Phytopathologica**, v.23, n.3-4, p.271-274, 1997.
- 403 REYES, J.E.; VENTURINI, M.E.; ORIA, R.; BLANCO, D. Prevalence of *Ewingella americana*
404 in retail fresh cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* and *Pleurotus*
405 *ostreatus*) in Zaragoza (Spain). **FEMS Microbiology Ecology**, v.47, n.3, p.291-296, 2004.
- 406 SABARATNAN, S.; TRAQUAIR, J.A. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the
407 suppression of *Rhizoctonia solani* damping-off in tomato transplants. **Biological Control**,
408 v.23, n.3, p.245-253, 2002.
- 409 SADFI, N.; CHERIF, M.; FLISS, I.; BOUDABBOUS, A.; ANTOUN, H. Evaluation of bacterial
410 isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry
411 rot of potato tubers. **Journal of Plant Pathology**, v.83, p.101-118, 2001.
- 412 SHIOMI, H.F.; SILVA, H.S.A.; MELO, I.S.; NUNES, F.V.; BETTIOL, W. Bioprospecting
413 endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, v.63, n.1,
414 p.32-39, 2006.

- 415 SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; PEREIRA,
416 M.C.B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants:
417 non-specific protection and enzyme activities. **Biological Control**, v.29, p.288-295, 2004.
- 418 STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G. Association of bacterial endophyte
419 populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian**
420 **Journal of Microbiology**, v.44, p.162-167, 1998.
- 421 THAKUR, R.P.; LEONARD, K.J.; LEATH, S. Effects of temperature and light on virulence of
422 *Exserohilum turcicum* on corn. **Phytopathology**, v.79, p.631-635, 1989.
- 423 TREJO-ESTRADA, S.R.; PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, D.L. Antibiotics and enzymes
424 produced by the biological agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. **Journal of**
425 **Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.81-90, 1998.
- 426 VALOIS, D.; FAYAD, K.; BARBASUBIYE, T.; GARON, M.; DÉRY, C.; BRZEZINSKI, R.;
427 BEAULIEU, C. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*,
428 the causal agent of raspberry root rot. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62,
429 p.1630-1635, 1996.
- 430 VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by
431 rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453-483, 1998.
- 432 VAN VEES, S.C.M.; LUIJEBDIJK, M.; SMOORENBURG, I.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE,
433 C.J.M. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not
434 associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates
435 the expression of jasmonate-inducing gene *atvsp* upon challenge. **Plant-Molecular Biology**,
436 v.41, p.537-549, 1999.
- 437 VARMA, A.; VERMA, S.; SUDA, S.N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*,
438 a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental**
439 **Microbiology**, v.65, p.2741-2744, 1999.

440 YOU, M.P.; SIVASITHAMPARAM, K.; KURTBOKE, D.I. Actinomycetes in organic mulch used
441 in avocado plantations and their ability to suppress *Phytophthora cinnamomi*. **Biology and**
442 **Fertility of Soils**, v.22, p.237-242, 1996.

443 Tabela 2.1. Bactérias endofíticas do milho obtidas por seleção massal, selecionadas para os
 444 ensaios de controle da mancha foliar de *Exserohilum turcicum*, identificadas pela análise do
 445 perfil dos ácidos graxos da membrana da parede celular (FAME).

Código	Identificação	Índice de similaridade *	Matriz de isolamento
P10F2	<i>Escherichia coli</i> GC subgrupo B	0,574	Folha
P10F4	<i>Morganella morganii</i>	0,650	Folha
P10F5	<i>Ewingella americana</i>	0,539	Folha
14F4a	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	0,529	Folha
16F2g	<i>Microbacterium imperiale</i>	0,806	Folha
12R2 d/a	<i>Bacillus agaradhaerens</i>	0,892	Raiz

446 * parâmetro de semelhança entre a amostra e a biblioteca do programa MIDI – Sherlock
 447 Microbial Identification System

448
 449 Tabela 2.2. Efeito da microbiolização da parte aérea do milho com endofíticos antagonistas
 450 no controle da mancha foliar de *Exserohilum turcicum*^a.

Isolado	- 72 horas		-24 horas		0 horas	
	Severidade da doença	Controle relativo (C.R.) ¹ (%)	Severidade da doença	Controle relativo (C.R.) ¹ (%)	Severidade da doença	Controle relativo (C.R.) (%)
Controle (água)	1,00 e*	-	1,00 f		1,00 e	-
Controle (<i>E. turcicum</i>)	2,06 a	0,0	1,75 a	0,0	1,69 a	0,0
<i>E. coli</i>	1,78 ab	13,59	1,64 ab	6,29	1,62 ab	4,14
<i>M. morganii</i>	1,97 ab	4,37	1,43 bcde	18,29	1,60 abc	5,32
<i>E. americana</i>	1,98 ab	3,88	1,57 abc	10,29	1,68 ab	0,59
<i>X. axonopodis</i>	1,88 ab	8,74	1,51 abcd	13,71	1,66 ab	1,78
<i>M. imperiale</i>	1,75 abc	15,05	1,37 bcde	21,71	1,56 abcd	7,70
<i>B. subtilis</i> 0G	1,71 bc	16,99	1,25 def	28,57	1,30 d	23,08
<i>B. lentimorbus</i>	1,48 cd	28,15	1,19 ef	32,00	1,34 cd	20,71
<i>Streptomyces</i> sp.	1,56 cd	24,27	1,31 cdef	25,14	1,34 cd	20,71
<i>B. agaradhaerens</i>	1,26 de	38,83	1,40 bcde	20,00	1,42 bcd	15,98
CV (%)	15,66	-	18,87		15,14	-

451 ^a Dados transformados em $y = \sqrt{x}$

452 * Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade
 453 pelo teste de Tukey.

454
 455 ¹ C.R.(%) = $\frac{(SD - SE)}{SD} \times 100$, sendo:

456 SD

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

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

459

460

461

462

463 Tabela 2.3. Efeito da microbiolização do milho com endofíticos antagonistas no controle da
 464 mancha foliar de *Exserohilum turcicum*^a.

Isolado	Microbiolização das sementes	
	Severidade da doença	Controle relativo (C.R.) ¹ (%)
Controle (água)	1,00 d*	-
Controle (<i>E. turcicum</i>)	1,82 a	0,00
<i>E. coli</i>	1,58 abc	13,19
<i>M. morgani</i>	1,54 ab	15,38
<i>E. americana</i>	1,28 bcd	29,67
<i>X. axonopodis</i>	1,37 bcd	24,73
<i>M. imperiale</i>	1,61 ab	11,54
<i>B. subtilis</i> 0G	1,43 abc	21,43
<i>B. lentimorbus</i>	1,19 cd	34,62
<i>Streptomyces</i> sp.	1,40 bcd	23,08
<i>B. agaradhaerens</i>	1,65 ab	9,34
CV (%)	23,77	-

465 ^a Dados transformados em $y = \sqrt{x}$

466 * Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade
 467 pelo teste de Tukey.

468

469 ¹ C.R.(%) = $\frac{(SD - SE)}{SD} \times 100$, sendo:

470

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

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

473

474



Fig. 2.1. Inoculação de *E. turcicum* em plantas de milho 15 dias após a semeadura.



Fig. 2.2. Microbiolização de sementes de milho com isolado endofítico.



Fig. 2.3. Microbiolização da parte aérea de plantas de milho com isolados endofíticos.



Fig. 2.4. Folha apresentando lesões causadas por *E. turcicum*.

475

CONCLUSÕES

- As bactérias endofíticas *Bacillus subtilis* OG, *Bacillus lentimorbus* *Streptomyces* sp. e *Bacillus agaradhaerens* são eficientes no controle a mancha foliar de *Exserohilum turcicum*, quando pulverizados na parte aérea de plantas de milho.;
- As bactérias endofíticas *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp., *Ewingella americana* e *Xanthomonas axonopodis* são eficientes no controle a mancha foliar de *Exserohilum turcicum*, quando inoculados através das sementes de milho;
- *Ewingella americana* e *Morganella morganii* promovem o desenvolvimento de plantas de milho, quando aplicados às sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrianual 2007: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: Argos Comunicação, 2007. 516 p.

ANDRADE, L.N.T. **Nutrição de carbono e nitrogênio, sob diferentes períodos de incubação e regimes de luz, em três espécies de *Helminthosporium* patogênicas ao milho (*Zea mays* L.).** 1997. 92f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1997.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR, W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, p.57-94.

BENT, E.; CHANWAY, C.P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.980-988, 1998.

BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1991. 388p.

BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p.225-231, 2000.

BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.105, n.4, p.329-348, 1998.

CARSON, M.L.; VAN DYKE, C.G. Effect of light and temperature on expression of partial resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. **Plant Disease**, v.78, p.519-522, 1994.

CATTELLAN, A.J.; HARTEL, P.G. Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. p.213-234.

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.01-05, 2002.

GLICK, B.R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v.15, n.2, p.353-378, 1997.

GUTIERREZ-MAÑERO, F.J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.R.; TALON, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and

Bacillus licheniformis produce high amounts of physiologically active gibberelins. **Physiologia Plantarum**, V.11, p.206-211, 2001.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

KUNOH, H. Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents. **Journal of General Plant Pathology**, v.68, p.249-252, 2002.

LAZAROVITZ, G.; NOWAK, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **HortScience**, v.32, n.2, p.188-192, 1997.

MELO, I.S.; VALARINI, P.J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum*). **Scientia Agrícola**, v.52, n.2, p.326-330, 1995.

M'PIGA; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T.C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.50, p.301-320, 1997.

NARISAWA, K.; TOKUMATSU, S.; HASHIBA, T. Suppression of clubroot formation in chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. **Plant Pathology**, v.47, p.206-210, 1998.

NORDLUND, D.A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information**, v.17, n.2, p.35N-44N, 1996.

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.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Spring Verlag, 1991. p.179-197.

PINTO, N.F.J.A Efeito de fungicidas no controle de doenças foliares do milho. **Summa Phytopathologica**, v.23, n.3-4, p.271-274, 1997.

PUNJA, Z.K. Comparative efficacy of bacteria, fungi and yeasts as biological control agents for diseases of vegetable crops. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.19, p.315-323, 1997.

SHARMA, V.K.; NOWAK, J. Enhancement of *Verticillium* wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.528-536, 1998.

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.

SILVA, P.R.F.; SANGOI, L.; ARGENTA, G.; STRIEDER, M.L. **Arranjo de Plantas e Sua Importância na Definição da Produtividade do Milho**. Porto Alegre: Evangraf, 2006. 64p.

STROBEL, G. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p.240-244, 2006.

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.

VAN VEES, S.C.M.; LUIJEBDIJK, M.; SMOORENBURG, I.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.J.M. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but

stimulates the expression of jasmonate-inducing gene *atvsp* upon challenge. **Plant-Molecular Biology**, v.41, p.537-549, 1999.

VARMA, A.; VERMA, S.; SUDA, S.N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2741-2744, 1999.

APÊNDICE**Meio BDA (batata-dextrose-ágar)**

Caldo de batata.....	200 mL
Dextrose.....	20 g
Ágar.....	16 g
Água.....	1000 mL

Meio ACA (amido-caseína-ágar)

Amido.....	10 g
Caseína.....	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl.....	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,01 g
Ágar.....	16 g
Água.....	1000 mL

Meio TSBA

TSB.....	30 g
Ágar.....	15 g
Água.....	1000 mL