



GISELE DE FÁTIMA DIAS DINIZ

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES PARA O
BIOCONTROLE DE *Fusarium verticillioides* NA CULTURA DO MILHO**

**SETE LAGOAS
2018**

GISELE DE FÁTIMA DIAS DINIZ

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES PARA O
BIOCONTROLE DE *Fusarium verticillioides* NA CULTURA DO MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel
Coorientadora: Prof. Dra. Christiane Abreu O. Paiva
Coorientador: Prof. Dr. Ubiraci G. de Paula Lana

**SETE LAGOAS
2018**

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D585s Diniz, Gisele de Fátima Dias.
 Seleção e caracterização de agentes para o
 biocontrole de *Fusarium verticillioides* na cultura
 do milho / Gisele de Fátima Dias Diniz ; orientador
 Ivanildo Evódio Marriel; coorientador Oliveira,
 Christiane Abreu; Lana, Ubiraci Gomes de Paula . --
 Sete Lagoas, 2018.
 69 p.

 Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
 Ciências Agrárias) -- Universidade Federal de São
 João del-Rei, 2018.

 1. Microrganismos antagonistas. 2. Fitopatógeno.
 3. Antimicrobianos. 4. Controle biológico. 5.
 Fusariose. I. Marriel, Ivanildo Evódio, orient. II.
 Lana, Ubiraci Gomes de Paula , Oliveira, Christiane
 Abreu; , co-orient. III. Título.

GISELE DE FÁTIMA DIAS DINIZ

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES PARA O
BIOCONTROLE DE *Fusarium verticillioides* NA CULTURA DO MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel
Coorientadora: Prof. Dra. Christiane Abreu O. Paiva
Coorientador: Prof. Dr. Ubiraci G. de Paula Lana

Sete Lagoas, 26 de fevereiro de 2018.

Banca examinadora:

Dr. Frederick Mendes Aguiar - Embrapa Milho e Sorgo

Dr. Luciano Viana Cota - Embrapa Milho e Sorgo

Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel
Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e coorientadores pela confiança e pelos conhecimentos transmitidos durante à execução desse trabalho. Obrigada a todos por essa oportunidade.

À Christiane Paiva pelo aprendizado, compreensão, pelo carinho em todos os momentos e pelo privilégio de tê-la como coorientadora.

Ao Ivanildo Marriel pelos ensinamentos, pela paciência e pelo exemplo de humildade e sabedoria.

Ao Ubiraci Lana por ter me acolhido tão bem, pelo acompanhamento, pela atenção e pelas contribuições que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus pais pelos valores a mim ensinados, pelos cuidados e amor em todos os momentos.

À Universidade Federal de São João del-Rei pela concessão da bolsa e a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica durante a graduação e mestrado.

À banca examinadora Dr. Luciano Viana Cota e ao Dr. Frederick Mendes Aguiar por aceitarem o convite e por cederem uma parte de seu tempo na contribuição do meu trabalho.

À Embrapa Milho e Sorgo por me conceder o suporte necessário para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia dos Solos, em especial Kethleyn, Mikaely e João pela ajuda nos trabalhos. À Vitória e Eveline pelo auxílio e pela amizade durante todo esse tempo.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo: Laís, Felipe, Clóvis e Bruna pelo auxílio nesse trabalho. Ao Dr. Luciano, Dr. Fred e Dra. Dagma pela disponibilidade e vontade de ajudar.

À equipe do Núcleo de Biologia Aplicada, em especial ao Rafael, pela grande ajuda.

Aos técnicos de campo Reinaldo e Dênio pela ajuda no trabalho de casa de vegetação.

Ao Rafael e Dra. Valéria do Laboratório de Micotoxinas da Embrapa Milho e Sorgo.

À Maise pela amizade construída durante a graduação e que permaneceu durante o mestrado. Obrigada pela parceria nos estudos, pela ajuda e acima de tudo por torcer por mim em todos os momentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para o meu crescimento profissional e pessoal.

Muito obrigada.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Inibição do crescimento de *Fusarium verticillioides* por dois isolados com estratégias distintas no teste de confronto direto. (A) Inibição formando uma área limpa ao redor dos isolados, isolado IM14. (B) Interrupção do crescimento sem a formação de halo...23
- Figura 2** - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium verticillioides* por microrganismos coletados em diferentes regiões brasileiras.....24
- Figura 3** - Árvore filogenética construída a partir de sequências parciais do gene *16S rRNA* dos isolados selecionados e comparadas com sequências tipo (T) depositadas no GenBank. O método utilizado para a construção do dendograma foi baseada em Neighbor Joining, utilizando o modelo evolutivo Tamura 3 parameter com 1000 replicações de bootstraps, através do programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011).....28
- Figura 4** - Hifas de *Fusarium verticillioides* em crescimento sem o contato com os filtrados. (A, B), hifas com anormalidades na presença dos filtrados após 24 h de incubação (C, D, E), esporo não germinado de *F. verticillioides* em contato com o filtrado de *Pseudomonas aeruginosa* (F).36
- Figura 5** - Formação de halo indicativo da produção da enzima celulase pelos isolados em meio carboximetilcelulose corado com vermelho congo.37
- Figura 6** - Formação de halo indicativo da produção da enzima pectinase pelos isolados em meio corado com lugol.37
- Figura 7** - Formação de halo indicativo da produção da enzima protease pelos isolados em meio contendo leite desnatado.....38
- Figura 8** - Formação de halo indicativo da produção da enzima lipase pelos isolados em meio contendo óleo de oliva.38
- Figura 9** - Incidência de *Fusarium verticillioides* nas sementes de milho que foram desinfectadas e não foram inoculadas com a suspensão de esporos (A), nas sementes que foram inoculadas com o fitopatógeno e não receberam tratamento (B) e nas sementes que receberam o tratamento com *Pseudomonas aeruginosa* (C).42
- Figura 10** - Efeito do tratamento de sementes com os isolados na podridão-do-colmo causada por *Fusarium verticillioides*. (A) Controle não inoculado (B) Controle + *F. verticillioides* (C) *Achromobacter* + *F. verticillioides* (D) *Pseudomonas* + *F. verticillioides* (E) *Bacillus* sp. + *F. verticillioides* (F) *Bacillus* sp. + *F. verticillioides*.45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados na amplificação e sequenciamento do gene <i>16S rRNA</i> dos isolados bacterianos selecionados.	14
Tabela 2 - Microrganismos endofíticos e epifíticos isolados de estigmas de milho coletados em quatro regiões do Brasil.	21
Tabela 3 - Agrupamentos dos isolados em relação à zona de inibição do crescimento de <i>Fusarium verticillioides</i> em teste de confronto direto com base no teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).	22
Tabela 4 - Isolados, local de coleta, tipo (estilo de vida), atividade antagonista (ZI) e identificação molecular de 42 isolados que apresentaram inibição $\geq 48,7\%$ do crescimento de <i>Fusarium verticillioides</i>	25
Tabela 5 - Inibição de <i>Fusarium verticillioides</i> pelos metabólitos produzidos pelos isolados antagonistas medida pelo peso final da biomassa.	32
Tabela 6 - Porcentagem de germinação e de inibição da germinação de esporangios de <i>Fusarium verticillioides</i> que tiveram contato com o filtrado dos isolados.	34
Tabela 7 - Índice enzimático (IE) de celulase, pectinase, protease e lipase obtido pelos isolados selecionados no teste de antagonismo contra <i>Fusarium verticillioides</i>	39
Tabela 8 - Avaliação da capacidade dos isolados em inibir o crescimento de <i>Fusarium verticillioides</i> nas sementes em relação ao controle contendo sementes inoculadas somente com <i>Fusarium verticillioides</i>	42
Tabela 9 - Efeito do tratamento de sementes com quatro isolados bacterianos na redução da severidade da podridão-do-colmo 45 dias após a inoculação de <i>Fusarium verticillioides</i> em condições de casa de vegetação.	45

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 A cultura do milho	3
2.2 Infecções e doenças no milho	3
2.3 <i>Fusarium verticillioides</i>	5
2.4 Micotoxinas	7
2.5 Controle biológico	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Isolamento dos microrganismos	11
3.2 Avaliação do antagonismo em meio sólido	12
3.3 Identificação molecular dos isolados	13
3.3.1 Extração de DNA.....	13
3.3.2 Amplificação do gene <i>16S rRNA</i>	13
3.3.3 Amplificação da região ITS.....	14
3.3.4 Sequenciamento de DNA	14
3.3.5 Análise das sequências e construção da árvore filogenética	15
3.4 Avaliação da produção de metabólitos pelos isolados.....	16
3.5 Efeito dos metabólitos na germinação de conídios e desenvolvimento de hifas	16
3.6 Caracterização enzimática dos isolados.....	17
3.6.1 Produção de celulase	17
3.6.2 Produção de pectinase	17
3.6.3 Produção de protease	17
3.6.4 Produção de lipase	18
3.6.5 Índice enzimático.....	18
3.7 Avaliação da redução da incidência do patógeno em sementes de milho	18
3.8 Avaliação do tratamento de sementes com as bactérias antagonistas na redução da podridão-do-colmo.....	19
3.9 Análises estatística	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20

4.1 Isolamento dos microrganismos de estigmas de milho	20
4.2 Avaliação da inibição de <i>F. verticillioides</i> em meio sólido.....	21
4.3 Identificação molecular dos isolados selecionados.....	24
4.4. Análise filogenética	28
4.5 Produção de metabólitos antifúngicos pelos isolados.....	30
4.6 Efeito dos metabólitos na germinação de conídios e desenvolvimento de hifas	33
4.7 Caracterização enzimática dos isolados.....	36
4.7.1 Produção de celulase	36
4.7.2 Produção de pectinase	37
4.7.3 Produção de protease	37
4.7.4 Produção de lipase	38
4.8 Incidência de <i>F. verticillioides</i> nas sementes tratadas com os isolados.....	41
4.9 Efeito do tratamento de sementes com os isolados na redução da podridão-do-colmo..	44
5 CONCLUSÕES.....	47
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES PARA O BIOCONTROLE DE *Fusarium verticillioides* NA CULTURA DO MILHO

RESUMO - O fungo *Fusarium verticillioides* é considerado um dos principais patógenos da cultura do milho em todo o mundo, promovendo grandes perdas econômicas. É o principal agente causal de doenças como a podridão-do-colmo e de espigas, reduzindo a qualidade dos grãos, além de produzir fumonisinas, que representam grandes riscos à saúde humana e animal. Apesar de o controle químico, via tratamento de sementes, ser o método mais empregado para o controle de *F. verticillioides*, a utilização de fungicidas pode causar contaminação ambiental e alimentar. Além disso, outras medidas de manejo utilizadas não têm sido muito efetivas. Dessa forma, alternativas mais sustentáveis e eficientes, como o controle biológico, podem ser empregadas para minimizar os problemas causados pelos atuais métodos. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar microrganismos coletados em diferentes localidades quanto ao potencial antagonista a *F. verticillioides*. Os microrganismos foram isolados de estigmas de milho provenientes de quatro regiões: Sete Lagoas-MG, Sidrolândia-MS, Sertaneja-PR e Goiânia-GO. A atividade antagonista de 190 microrganismos isolados e de 24 microrganismos retirados da coleção da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF) foi avaliada pelo método de confronto direto entre as culturas em meio sólido. Posteriormente, quarenta e dois isolados mais eficientes no controle do fitopatógeno e que apresentaram potencial de inibição $\geq 48,7\%$ foram identificados molecularmente com base no sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* e da região ITS. O sequenciamento do DNA mostrou que os isolados bacterianos pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* e *Serratia*, predominando o gênero *Bacillus*. Já os fungos são pertencentes aos gêneros *Penicilium*, *Candida* e *Aspergillus*. Quatorze microrganismos mais eficientes foram testados quanto à capacidade de produzir enzimas extracelulares (celulase, pectinase, protease e lipase) e metabólitos antifúngicos com efeito no crescimento micelial e na germinação de conídios de *F. verticillioides*. Além disso, foram avaliados quanto à capacidade de reduzir a incidência do fitopatógeno em sementes de milho, em caixas gerbox. Quatro bactérias isoladas foram selecionadas para o tratamento de sementes visando a redução da podridão-do-colmo causada por *F. verticillioides* em plantas de milho cultivadas em casa de vegetação. Os resultados mostraram que treze isolados que apresentaram os maiores valores de inibição do crescimento do fitopatógeno foram também eficientes na produção de metabólitos antifúngicos que reduziram a biomassa do fitopatógeno em meio líquido. Os metabólitos produzidos também apresentaram efeitos na redução da germinação de conídios e afetaram o desenvolvimento normal das hifas do fitopatógeno. Dos isolados mais eficientes, 78% produziram pelo menos uma das quatro enzimas hidrolíticas avaliadas. A inoculação das sementes de milho em caixas gerbox com a bactéria IPR45, identificada como *Pseudomonas aeruginosa*, mostrou-se altamente eficiente na redução da incidência de *F. verticillioides*. Em casa de vegetação, o tratamento das sementes de milho com os isolados *Achromobacter* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. foi eficiente na redução da podridão-do-colmo, indicando que esses isolados apresentam potencial para uso como agentes de biocontrole. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que o isolamento e a caracterização de microrganismos de estigma de milho constituem alternativa promissora para identificação de agentes microbianos eficientes para o biocontrole de *F. verticillioides*.

Palavras-chave: Microrganismos antagonistas. Fitopatógeno. Antimicrobianos. Controle biológico. Fusariose. Podridão-do-colmo.

SELECTION AND CHARACTERIZATION OF AGENTS FOR THE BIOCONTROL OF *Fusarium verticillioides* IN MAIZE

ABSTRACT - The fungus *Fusarium verticillioides* is considered one of the main pathogens of the maize crop in the world, promoting great economical losses. It is the main causal agent of diseases such as stem rot and spikes, reducing grain quality, and producing fumonisins, which pose great risks to human and animal health. Although the chemical control, through seed treatment, is the most used method for the control of *F. verticillioides*, the use of fungicides can cause environmental and food contamination. In addition, other management measures used have not been very effective. Thus, more sustainable and efficient alternatives, such as biological control, can be employed to minimize the problems caused by current methods. The objective of this work was to isolate and characterize microorganisms collected in different localities regarding the potential antagonist to *F. verticillioides*. The microorganisms were isolated from maize stigmas from four Brazilian regions: Sete Lagoas-MG, Sidrolândia-MS, Sertaneja-PR and Goiânia-GO. The antagonistic activity of 190 isolated microorganisms and 24 microorganisms from the collection of Embrapa Milho e Sorgo (CMMF) was evaluated by direct comparison between cultures in solid medium. Subsequently, forty-two isolates that were more efficient in phytopathogen control and had inhibition potential $\geq 48.7\%$ were molecularly identified based on the partial sequencing of the *16S rRNA* gene and the ITS region. DNA sequencing showed that the bacterial isolates belong to the genera *Bacillus*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* and *Serratia*, predominating the genus *Bacillus*. The fungi, however, belong to the genera *Penicillium*, *Candida* and *Aspergillus*. Fourteen microorganisms that are more efficient were tested for their ability to produce extracellular enzymes (cellulase, pectinase, protease and lipase) and antifungal metabolites with effect on mycelial growth and conidial germination of *F. verticillioides*. In addition, they were evaluated for the ability to reduce the incidence of phytopathogen in maize seeds, in gerbox boxes. Four isolated bacteria were selected for seed treatment to reduce leaf rot caused by *F. verticillioides* in maize plants grown in greenhouse. The results showed that thirteen isolates that presented the highest values of inhibition of phytopathogen growth were also efficient in the production of antifungal metabolites that reduced the phytopathogen biomass in liquid medium. The metabolites produced also had effects in the reduction of conidial germination and affected the normal development of phytopathogen hyphae. Of the more efficient isolates, 78% produced at least one of the four hydrolytic enzymes evaluated. The inoculation of maize seeds in gerbox boxes with the bacterium IPR45, identified as *Pseudomonas aeruginosa*, proved to be highly efficient in reducing the incidence of *F. verticillioides*. In greenhouse, the treatment of maize seeds with the isolates *Achromobacter* sp., *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. was efficient in the reduction of stem rot, indicating that these isolates present potential for use as biocontrol agents. The results obtained in this study showed that the isolation and characterization of maize stigma microorganisms are a promising alternative for the identification of efficient microbial agents for the biocontrol of *F. verticillioides*.

Keywords: Antagonist microorganisms. Phytopathogen. Antimicrobials. Biological control. Fusariosis. Stem rot.

1 INTRODUÇÃO

O milho é o cereal mais cultivado no mundo, sendo utilizado na alimentação humana, para a fabricação de ração ou como matéria-prima para a indústria. A maior parte da produção mundial de milho é destinada à alimentação animal, incluindo o Brasil, onde cerca de 60 a 80% do total produzido é destinado à indústria de ração. Apesar de somente uma pequena parte do milho produzido ser destinado para o consumo humano, esse cereal representa grande importância em regiões de baixa renda, por ser a principal fonte de energia e de nutrientes para a população (Duarte, 2000).

A cultura do milho pode ser afetada por diferentes fatores, entre eles a fertilidade do solo, a época de semeadura, o potencial produtivo do híbrido, a competição por plantas daninhas e o ataque de pragas e doenças (Rocha, 2010). Entre os principais fatores que afetam a qualidade das sementes de milho, os microrganismos são considerados os mais importantes, pois causam redução no vigor, na germinação e aceleram o processo de deterioração durante o armazenamento (Fantazzini, 2014).

A contaminação dos grãos de milho por diferentes espécies de fungos tanto na pré-colheita quanto na etapa de armazenamento pode resultar na diminuição da produtividade e qualidade dos grãos. Dentre os fungos causadores de doenças mais encontrados no milho estão espécies do gênero *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Makun et al., 2010), que podem infectar os grãos antes ou após a colheita e são denominados de fungos de campo ou de armazenamento, respectivamente (Pinto, 2005). Fungos desses gêneros além de causarem danos como descolorações dos grãos, reduções nos conteúdos de carboidratos, de proteínas e de açúcares totais, podem produzir substâncias químicas tóxicas denominadas micotoxinas (Freire et al., 2007).

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg (sinônimo, *Fusarium moniliforme*, Sheldon) é considerado um dos principais patógenos que infectam o milho em todo o mundo, acarretando grandes perdas econômicas (Desjardins, 2006). Essa espécie pode causar sintomas em quase todas as partes da planta, como a podridão-do-colmo, da espiga, da semente e raiz (Hernández-Rodríguez et al., 2008). Além disso, *F. verticillioides* é potencialmente produtor de fumonisinas, que são micotoxinas prejudiciais para seres humanos e animais que consomem os grãos contaminados (Bacon e Nelson, 1994).

Os fungos fitopatogênicos geralmente são controlados com uso de agroquímicos. No entanto, o uso excessivo e inadequado desses formulados pode aumentar os riscos de contaminação do meio ambiente, dos alimentos e causar a intoxicação dos agricultores. Além

disso, os agroquímicos podem promover o aumento da resistência dos fitopatógenos e eliminar microrganismos responsáveis pela degradação da matéria orgânica e aqueles utilizados em programas de biocontrole (Spadotto et al., 2004). Outras medidas que podem ser empregadas para o controle de *F. verticillioides* na cultura do milho incluem a utilização de cultivares de milho resistentes ou práticas culturais, no entanto, essas medidas não apresentam resultados tão efetivos (Munkvold e Desjardins, 1997).

Métodos alternativos de controle mais eficientes que reduzem os efeitos negativos do uso dos defensivos e aumentem a produção e a qualidade dos alimentos vêm sendo estudados (Campanhola e Bettiol, 2003). Dentre esses métodos, a utilização de microrganismos com potencial de controle contra patógenos tem sido cada vez mais reconhecida como uma alternativa promissora por ser uma técnica viável, segura ao meio ambiente e de baixo custo quando comparado com métodos convencionais de tratamento (Charan et al., 2011). O controle biológico utilizando microrganismos com potencial antagonista pode ser uma alternativa eficiente para inibir o desenvolvimento de fitopatógenos em diferentes culturas (Alves et al., 2013).

Dentre os principais microrganismos utilizados como agentes de controle biológico se destacam *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp., entre outros. Diversos trabalhos têm mostrado o potencial de bactérias e fungos no controle de diferentes patógenos causadores de doenças em plantas. Esses microrganismos apresentam características próprias que lhes oferecem vantagens como agentes de controle biológico. Por exemplo, espécies do gênero *Bacillus* são conhecidas pela sua capacidade de produzir metabólitos secundários com atividade antagônica sobre fungos e bactérias patogênicas (Saharan e Nehra, 2011).

Entretanto, ao contrário do controle químico, o controle biológico não apresenta resultados imediatos, além disso, a utilização desse método de controle isoladamente pode não ser suficiente para evitar que perdas na produção aconteçam. A integração de diferentes métodos de controle pode proporcionar um efeito aditivo em que cada medida de controle reforce as demais (Michereff e Barros, 2001). Neste caso, com a obtenção de isolados mais eficientes do que os que já existem no mercado, estes poderão ser associados a outros métodos de controle químico ou cultural, consolidando a prática do manejo integrado. Neste trabalho, buscou-se isolar microrganismos em estigmas de milho cultivados em diferentes locais, visando obter maior diversidade e eficiência para o controle de *F. verticillioides*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais de maior importância na alimentação humana e animal em razão das suas qualidades nutricionais. É cultivado na maioria dos países em razão da sua ampla utilização na produção de alimentos ou na composição de rações animais. A maior parte da sua produção é destinada à alimentação animal em países desenvolvidos. Em relação ao consumo humano, somente uma pequena parte do que é produzido, cerca de 15%, é destinada para esse fim, tanto na forma direta quanto indireta (Paes, 2006).

No Brasil, a maior parte do milho produzido é destinada à produção de ração. Cerca de 20 a 40% da produção mostra-se dividida entre o consumo humano e matéria-prima para a indústria. O crescimento da produção de milho no Brasil vem acompanhando o aumento da demanda da indústria de ração animal, principalmente de aves e suínos (Duarte et al., 2009).

O Brasil ocupa uma posição de destaque no agronegócio mundial, como o terceiro maior produtor de milho (CONAB, 2017), ficando atrás apenas de países como os Estados Unidos e a China. Em 2017, segundo estimativas do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2017), o Brasil produziu 98 milhões de toneladas de milho, enquanto os Estados Unidos, o maior produtor mundial, teve uma produção média de 384 milhões de toneladas, seguido pela China, com uma produção de 219 milhões de toneladas.

A cultura do milho vem alcançando ganhos fantásticos de produtividade nos últimos anos, por causa de altos investimentos e novas técnicas de manejo. Com uma taxa de crescimento da produção de 3% e de área cultivada de 0,4% ao ano, o milho tem evoluído com uma cultura comercial nas últimas décadas (Amstalden, 2013). A adoção de tecnologia na cultura do milho no Brasil foi responsável pelos aumentos significativos de produtividade nesses últimos anos, sendo cultivado em praticamente todo território nacional sob diferentes condições de umidade e temperatura (Mattoso e Filho, 2007).

2.2 Infecções e doenças no milho

Apesar de ser o terceiro maior produtor de milho do mundo, o Brasil apresenta umas das produtividades mais baixas entre os exportadores mundiais. Segundo estimativas, a produtividade de milho no Brasil na safra de 2016/2017 foi de 5.500 kg/ha contra 10.900 kg/ha dos Estados Unidos, o maior produtor (CONAB, 2017). Essa condição se deve muitas vezes ao aumento da ocorrência de doenças, que tem gerado preocupações por parte dos

produtores e técnicos, em razão dos danos que causam à cultura (Lanza et al., 2012). Segundo Oerke (2006), as doenças provocadas por patógenos no milho representam uma perda de produtividade que varia de 8 a 13%.

Embora os fatores bióticos, como os microrganismos e os insetos, sejam os principais responsáveis pela manifestação de doenças no milho, outros fatores como o clima úmido, a alta densidade de plantas, os desequilíbrios nutricionais e a monocultura podem frequentemente favorecer a ocorrência de infecções na cultura. Alguns fatores envolvidos no aumento da produtividade do milho no Brasil foram também responsáveis pelo aumento da incidência e da severidade das doenças nessa cultura. Modificações no sistema de produção, como a ampliação das épocas de cultivo, a adoção da técnica de plantio direto sem rotação de culturas, a ampliação do uso de sistemas de irrigação, a utilização de cultivares susceptíveis resultaram no aumento da ocorrência de doenças na cultura do milho (Cota et al., 2013).

O milho é uma cultura suscetível ao ataque de fungos, que hoje representa a segunda maior causa de deterioração dos grãos, perdendo apenas para o ataque de insetos. As doenças causadas por fungos são relatadas como uma grande preocupação para a agricultura mundial, para a economia global e para saúde pública. Os fungos estão envolvidos em um grande número de doenças de plantas que causam diminuição dos rendimentos e perdas da qualidade nas culturas (Nguyen et al., 2017).

A contaminação por fungos pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva, sendo influenciada por fatores relacionados com as condições climáticas, colheita e armazenamento. O aparecimento de fungos no milho pode causar diminuição no rendimento, descoloração dos grãos, perda de valor nutricional e da qualidade, diminuição da germinação, perda de matéria seca e produção de micotoxinas (Pomeranz, 1982).

Os microrganismos que infectam os grãos são divididos em dois grupos: fungos de campo, que infectam o produto ainda no campo; e fungos de armazenamento, que podem infectar o milho antes ou durante o armazenamento (Christensen e Sauer, 1982). A distinção entre esses dois grupos não é baseada na classificação taxonômica, mas sim pelas condições ambientais que favorecem o seu crescimento e desenvolvimento (Pezzini et al., 2005).

Para se desenvolver, os fungos de campo necessitam de um teor de umidade mais elevado nos grãos (>20%), com prevalência dos gêneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Helminthosporium*, *Nigrospora*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma*. Esses fungos infectam os grãos durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita. Normalmente não se desenvolvem durante o armazenamento, exceto se houver alto teor de umidade nos grãos

(Marcia e Lazzari, 1998). Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* demandam menor quantidade de água nos grãos (13-13,5%) (Lins et al., 2014). São encontrados em grande número onde os grãos são armazenados, manuseados e processados. No entanto, só causam danos se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do produto (Marcia e Lazzari, 1998).

2.3 *Fusarium verticillioides*

Em diversos países, o fungo *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sinônimo, *Fusarium moniliforme*, Sheldon) é considerado um dos principais patógenos do milho, podendo ser encontrado tanto em regiões de clima temperado e tropical úmido a subtropical (Figueira et al., 2003). A espécie *F. verticillioides* pode causar doenças em todas as fases de desenvolvimento da planta (Wordell Filho, 2010), sendo responsável por ocasionar perdas em sementes, morte de plântulas, podridão-do-colmo, raiz e espigas e danos em grãos armazenados (Munkvold et al., 1997). Além disso, *F. verticillioides* produz fumonisinas, principalmente fumonisina B1, que podem ocasionar diversos problemas para a saúde dos seres humanos e animais (Bacon e Nelson, 1994; Chu e Li, 1994).

No Brasil, diversos trabalhos de levantamento da micoflora em grãos de milho apontaram *F. verticillioides* como o principal patógeno associado à podridão da espiga em várias regiões (Ribeiro et al., 2005). Em um trabalho de Lanza et al. (2014) foi analisada a frequência de espécies de *Fusarium* associadas com grãos de milho e o potencial desses microrganismos na produção de fumonisinas. Os resultados mostraram que a espécie predominante foi *F. verticillioides*, sendo encontrada em 99% das amostras obtidas de quinze das principais regiões produtoras de milho do Brasil. Em relação à produção de fumonisinas, todos os cinquenta isolados testados apresentaram capacidade de produzir essa micotoxina com grande variabilidade de produção entre os isolados. Ono et al. (1999), estudando a micoflora de 150 amostras de milho nas regiões Centro-Sul, Centro-Oeste e Norte do Estado do Paraná, demonstraram a predominância de invasão de *Fusarium* spp. (98,7 a 100% das amostras), sendo a espécie dominante *F. verticillioides* (85,9%). Da mesma forma, Almeida et al. (2000), analisando a ocorrência de fungos em 66 amostras de grãos de milho recém-colhido nas regiões de Assis, Capão Bonito e Ribeirão Preto, no Estado de São Paulo, observaram que o fungo mais frequentemente encontrado foi *F. verticillioides*, com predominância de 60,6% em relação ao total de isolados.

Fusarium verticillioides pode infectar a planta de diversas formas, através da contaminação das sementes, por ferimentos na planta adulta ou através do cabelo do milho (Munkvold et al., 1997), sendo esta última a forma mais eficiente de contaminação, causando o rompimento da semente e maior severidade na podridão da espiga (Warfield e Davis, 1996). Em um trabalho de Munkvold et al. (1997), que analisou as vias de invasão de *F. verticillioides*, foi demonstrada transmissão de 100% para a geração subsequente quando foi utilizada a via de invasão pelo estigma do milho.

Na associação com o milho, *F. verticillioides* é um exemplo de microrganismo endofítico facultativo, existindo tanto na forma biotrófica, quando utiliza o hospedeiro para sua sobrevivência, quanto na forma saprofítica, onde sobrevive e obtém nutrientes de restos vegetais em decomposição no solo, sendo essa a principal fonte de inóculo (Pinto, 2005; Samsudin e Magan, 2015). Durante a fase endofítica, *F. verticillioides* é transmitido verticalmente pela planta, iniciando a infecção de forma assintomática e sistêmica. A infecção se inicia quando o fungo presente nos restos vegetais de colheitas anteriores penetra na planta, se desenvolve, atinge o colmo e posteriormente a espiga e grãos (Munkvold et al., 1997; Oren et al., 2003).

Outra via de infecção é por meio de macro e microconídeos que podem ser dispersos pelo ar, por gotículas de chuva ou por insetos, atingindo diretamente o tecido vegetal e quando fixados, o fungo germina na planta, causando a infecção, principalmente durante o estágio de maturação fisiológica dos grãos (Vincelli e Parker, 2008).

Ambas as vias de infecção de *F. verticillioides* na planta são importantes, no entanto, é necessário destacar que a infecção horizontal é o modo como esse fungo se espalha de forma contagiosa e que pode ser reduzida através da aplicação de alguns fungicidas. Ao contrário disso, na fase endofítica o fungo é transmitido verticalmente e a transmissão não pode ser controlada pela aplicação de fungicidas nas sementes (Bacon et al., 2011).

A podridão por *F. verticillioides* se inicia após a polinização e se agrava à medida que a planta atinge a maturação. Os sintomas nas plantas de milho incluem alteração da coloração externa da base do colmo, com as plantas infectadas apresentando a medula de cor branco-rosada a rosa-salmão. Em casos mais severos de infecção, pode ocorrer esporulação do patógeno na parte externa do tecido afetado, sendo possível observar uma massa de esporos de cor rosa-salmão. O apodrecimento pode afetar as raízes, levar à quebra do colmo e à maturação prematura (Reis et al., 2004). Nos grãos infectados é possível observar um crescimento micelial esbranquiçado ou cor de salmão característico de *F. verticillioides*.

2.4 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por algumas espécies de fungos. Essas moléculas são resistentes ao calor representando alto risco quando estão associadas aos alimentos. Normalmente são encontradas como contaminantes em muitas plantas, particularmente nos cereais, mas também podem estar presentes em frutas, sementes e em forragens (Terzi et al., 2014).

A contaminação de alimentos e rações por micotoxinas representa um problema de saúde pública em todo o mundo, além de constituir um considerável obstáculo à economia de muitos países em razão de barreiras fitossanitárias impostas pelos países consumidores, onde há rígido controle dos limites de tolerância (Halász et al., 2009). Os prejuízos econômicos causados pelas micotoxinas afetam toda a cadeia de produção, desde a produção primária, passando pelos processadores e comerciantes de alimentos. Segundo a Organização Mundial para Alimentação e Agricultura (FAO), entre 5 e 10% do total de alimentos perdidos no mundo deve-se à contaminação por fungos e micotoxinas.

A frequente ocorrência de fungos toxigênicos, aliada ao clima tropical do país favorece a síntese dessas micotoxinas em milho e em seus derivados (Midio e Martins, 2000). A contaminação dos grãos por micotoxinas pode ocorrer tanto no campo, quando as condições são favoráveis ao desenvolvimento dos fungos, quanto em situações de armazenamento. O alto teor de umidade nos grãos conservados (18-23%) favorece a proliferação dos microrganismos e pode aumentar consideravelmente os teores de micotoxinas (Figueira et al., 2003).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar por via direta ou indireta. Na via direta, os fungos toxigênicos primeiramente contaminam o alimento ou a ração e posteriormente sintetizam a micotoxina. Por outro lado, na contaminação indireta, as micotoxinas previamente produzidas pelos fungos toxigênicos permanecerão no produto final mesmo após o fungo ter sido eliminado durante o processamento (Freire et al., 2007).

Numerosas micotoxinas produzidas por espécies de *Fusarium* foram descritas como causadoras de doenças em plantas e animais (Antonissen et al., 2014). As fumonisinas são um grupo de micotoxinas mais perigosas produzidas pelas espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum* e que normalmente são detectadas em altos níveis em cereais colhidos e armazenados (Turner, P. et al., 1999; Cendoya et al., 2014). As fumonisinas encontradas em cereais são as fumonisinas B, incluindo fumonisina B1 (FB1), fumonisina B2 (FB2) e

fumonisina B3 (FB3), sendo a fumonisina FB1 a mais abundante, representando entre 70-80% das fumonisinas totais (Rheeder et al., 2002).

Estudos têm demonstrado a relação do consumo de rações contaminadas com fumonisinas com efeitos tóxicos agudos para certos animais, especialmente cavalos e suínos, e com propriedades cancerígenas em ratos (Duvick, 2001). Além disso, tem sido demonstrada a relação do consumo de grãos contaminados com doenças em humanos, como o câncer esofágico (Sydenham et al., 1990).

É importante ressaltar que a contaminação dos grãos de milho com micotoxinas produzidas por fungos fitopatogênicos nem sempre está diretamente relacionada ao aparecimento de sintomas da doença (Lanza et al., 2017). Diferentes formas de interação entre o fitopatógeno e o milho podem ser observadas. Na primeira delas, que ocorre mais frequentemente, *Fusarium* produz altas concentrações de fumonisinas, sendo possível observar sintomas como o apodrecimento da espiga e grãos ardidos. Na segunda forma, ocorre a produção de micotoxinas nos grãos infectados, porém, sem o aparecimento visível de qualquer sintoma da doença. Já na última delas, os grãos encontram-se bastante danificados pelo fitopatógeno, no entanto, as fumonisinas não estão presentes ou podem ser encontradas em baixas concentrações (Munkvold e Desjardins, 1997).

2.5 Controle biológico

Os fungos fitopatogênicos, geralmente, são controlados com uso de agroquímicos. No entanto, o uso excessivo e inadequado pode trazer inúmeros riscos tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana (Xu e Kim, 2014). Além disso, podem promover o aumento da resistência dos fitopatógenos e eliminar microrganismos que são essenciais ao ambiente, por exemplo, os que degradam matéria orgânica e aqueles que são utilizados em programas de biocontrole (Spadotto et al., 2004).

As medidas de controle utilizadas contra *F. verticillioides* incluem ainda o uso de cultivares de milho resistentes e adoção de práticas culturais como a rotação de culturas e práticas de plantio afim de reduzir o potencial de inóculo. No entanto, essas medidas não têm mostrado resultados muito efetivos (Munkvold e Desjardins, 1997). Diante disso, como estratégia para reduzir os efeitos negativos do uso dos defensivos e aumentar a eficiência de controle, métodos alternativos, como o controle biológico, vêm sendo estudados (Campanhola e Bettiol, 2003).

O controle biológico é definido como a utilização de organismos específicos, os quais interferem com organismos patogênicos e pragas causadoras de doenças em plantas, sendo uma ferramenta natural e uma alternativa ecológica para superar os problemas causados por métodos químicos para a proteção de plantas (Saito et al., 2009). A utilização de microrganismos com potencial antagonista contra patógenos tem se apresentado como uma alternativa promissora por ser uma técnica simples, segura ao meio ambiente e de baixo custo quando comparada com os métodos convencionais de tratamento (Silva et al., 2003; Brito et al., 2013).

Para que um microrganismo seja considerado eficiente no controle de fitopatógenos é importante que ele tenha a capacidade de multiplicar-se rapidamente e colonizar a planta. Além disso, é essencial que o antagonista tenha capacidade de competir por recursos no ambiente em que se encontra, muitas vezes em condições limitadas de nutrientes e com variações de temperatura e umidade (Stacey e Keen, 1996). O controle de doenças por agentes microbianos é o resultado das interações entre o agente de controle biológico, a comunidade microbiana local, o patógeno alvo e a planta hospedeira. Essas interações são diretamente influenciadas pelo ambiente físico-químico no qual o agente de controle biológico é introduzido (Thomashow e Weller, 1996).

Esses organismos podem impedir o crescimento de fungos fitopatogênicos através de diferentes modos de ação e de forma ativa ou passiva. Na forma ativa, a inibição pode ocorrer de três maneiras distintas: (1) o antagonista produz e libera para o meio substâncias tóxicas, como antibióticos e enzimas extracelulares, que impedem o crescimento do fitopatógeno; (2) através do contato entre os dois microrganismos (a hifa do fungo antagonizado sofre plasmólise quando entra em contato com o antagonista); (3) ou através do micoparasitismo, quando um microrganismos ataca o outro e obtém nutrientes das células vivas, com pouco ou nenhum dano aparente para o hospedeiro ou quando ataca e destrói as células matando o hospedeiro. Na forma passiva, a inibição ocorre pela competição entre os dois microrganismos por espaço e nutrientes que são essenciais para o desenvolvimento de ambos, nesse caso a vantagem competitiva será daquele que estiver em maior número ou por apresentar maior taxa de crescimento (Deacon, 1980).

Dentre os mecanismos de controle usados pelos antagonistas, a produção de compostos que possuem propriedades antifúngicas, como as enzimas hidrolíticas e os antibióticos, são os mais bem estudados (Haas e Keel, 2003). Diferentes enzimas secretadas pelos antagonistas desempenham um papel importante no biocontrole. Os microrganismos que agem sobre os fitopatógenos produzem enzimas hidrolíticas, incluindo quitinases,

celulases, glucanases, proteases e lipases, que degradam e lisam componentes da parede celular dos fungos afetando o seu crescimento e em alguns casos levando-os à morte (Mabood et al., 2014). Enzimas hidrolíticas afetam o crescimento fúngico por sua ação lítica na parede celular, pontas de hifas e tubos germinativos (Kim et al., 2003), causam o inchaço das hifas que leva ao enrolamento ou rompimento dessas estruturas (Someya et al., 2000).

A produção de antibióticos por microrganismos envolvidos no controle biológico tem sido vista como outro importante mecanismo de contribuição para a redução dos sintomas das doenças. A produção desses compostos faz parte do metabolismo secundário dos microrganismos, ou seja, não são essenciais para o seu crescimento, mas podem ter implicações na sua sobrevivência e competitividade. Os antibióticos são toxinas que podem, em baixas concentrações, matar ou reduzir o crescimento de outros microrganismos. Alguns antagonistas são capazes de produzir diferentes classes de antibióticos que podem suprimir um ou mais patógenos, aumentando assim a capacidade de controle biológico (Arseneault e Fillion, 2017).

Diferentemente do método químico, o controle biológico não apresenta resultados tão imediatos, além disso, a adoção desse método como única forma de controle pode muitas vezes levar apenas ao controle parcial da doença. Dessa forma, a utilização do controle biológico deve ser associada a outros métodos de controle, consolidando a prática do manejo integrado. A utilização de diferentes métodos de controle de forma integrada constitui uma alternativa com maiores chances de sucesso do que a utilização de um único método (Ghini, 1991).

Os bioformulados podem ser utilizados em conjunto com os defensivos, e sua aplicação em campo pode ser feita através da microbiolização das sementes, infestação do solo e pulverização de espigas ou sobre os grãos armazenados. Assim, o isolamento dos microrganismos antagonistas a partir do ambiente onde estes organismos serão utilizados é um dos pontos principais para a efetividade do controle biológico, uma vez que esses isolados são mais adaptados a sobreviver e competir nesses ambientes (Imamura et al., 2000). Diante disso, o objetivo desse trabalho foi selecionar e caracterizar microrganismos de estigma de milho de quatro regiões com potencial para o biocontrole do *Fusarium verticillioides*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento dos microrganismos

Os microrganismos foram isolados de cabelos de milho de lavouras plantadas nas cidades de Sete Lagoas-MG, Sidrolândia-MS, Goiânia-GO e Sertaneja-PR na safra de 2016. Foram coletadas espigas verdes e secas de plantas aleatórias. Também foram incluídos 24 microrganismos endofíticos de folha e seiva de milho que foram isolados de Sete Lagoas-MG e são pertencentes à Coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF). Para os testes de antagonismo, foi utilizado o isolado CML 2743 de *F. verticillioides* obtido do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas-MG.

Para o isolamento dos microrganismos foram utilizados cabelos localizados tanto na parte externa quanto interna das espigas. Os cabelos de milho foram cortados e transferidos diretamente para placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA). Em metade das placas foi adicionada uma solução de estreptomicina e ciclohexamida (20mg/L) para inibir o crescimento de bactérias e fungos, respectivamente.

Para o isolamento dos microrganismos epifíticos, foi realizada uma diluição seriada a partir da mistura de 10 g das amostras e 90 mL de solução salina autoclavada [NaCl 0,9% (m/v)]. Após agitação durante 30 minutos a 200 rpm foi realizada uma diluição seriada até 10^{-6} . De cada uma das diluições de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foi retirada uma alíquota de 100 μ L que foi espalhada em placas de Petri, em triplicata, contendo meio de cultivo BDA. Em metade das placas foi adicionada uma solução de estreptomicina e ciclohexamida (20mg/L) para selecionar fungos e bactérias respectivamente.

Para o isolamento de microrganismos endofíticos do cabelo de milho foi feita uma desinfestação inicial e posteriormente a maceração das amostras. Para desinfestação foi utilizada a metodologia de Bulgari et al. (2009), que consiste em adicionar à amostra 30 mL de solução de etanol 70% (v/v) por 3 min. Em seguida, foi realizada a lavagem com água deionizada para retirada do excesso de etanol. Posteriormente, foram adicionados 30 mL de hipoclorito de sódio a 2% (v/v) por 5 min e em seguida lavou-se com água deionizada. Novamente foram adicionados 30 mL da solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos e logo após foi repetida a lavagem com água deionizada. Por fim, a amostra foi lavada quatro vezes com água deionizada autoclavada, sendo a última água plaqueada para confirmação da eficiência da desinfecção. Em seguida, foi feita uma diluição seriada com as amostras maceradas conforme descrito anteriormente.

Todas as amostras em meio de cultura foram incubadas em temperatura ambiente por sete dias, e o crescimento foi avaliado a cada dois dias. Após o período de incubação, foram selecionados para os testes de antagonismo os microrganismos distintos macro-morfologicamente. Esta distinção foi realizada com base no formato e aspecto da colônia, tamanho, cor, tipo de borda e taxa de crescimento.

Os microrganismos selecionados foram retirados da placa inicial e transferidos para novas placas contendo o mesmo meio de cultura. Após a obtenção das culturas puras, os isolados foram armazenados em frascos contendo óleo mineral e armazenados a temperatura ambiente. Os isolados também foram preservados em microtubos contendo glicerol a 20% (v/v) e armazenados a -4 °C (bactérias) e a 8 °C (fungos).

3.2 Avaliação do antagonismo em meio sólido

Para a avaliação do antagonismo *in vitro* contra *F. verticillioides* foram utilizados cento e noventa microrganismos isolados do estigma do milho e vinte e quatro microrganismos retirados da Coleção da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF), que foram anteriormente isolados de seiva e da folha do milho. Foi realizado um teste de confronto direto das culturas em meio sólido de acordo com a metodologia adaptada de Sagahón et al. (2011). Inicialmente, um disco de 5 mm da borda da cultura pura do patógeno, crescido por sete dias em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), foi transferido para o centro de uma placa de Petri (90 mm de diâmetro) contendo o mesmo meio. Em quatro pontos equidistantes entre si e do centro foi adicionado um disco de micélio de cada isolado fúngico crescido por sete dias a 28 °C ou 10 µL de suspensão bacteriana na concentração aproximada de 10⁸ UFC/mL, crescida por 24 h a 28 °C. O teste foi realizado em triplicata e o controle foi composto de placas contendo apenas o fitopatógeno. A medição do raio da colônia do fitopatógeno foi realizada na presença e ausência dos microrganismos antagonistas quando toda a superfície do meio foi colonizada pelo patógeno no tratamento testemunha, cerca de sete dias após a incubação a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz. A zona de inibição (ZI) dos isolados foi calculada pela fórmula abaixo:

$$ZI(\%) = \frac{(N1 - N2) \times 100}{N1}$$

Sendo: |ZI| = Zona de inibição; N1= raio do micélio encontrado na ausência do antagonista; N2= raio do micélio na presença do antagonista (Campanile et al., 2007).

3.3 Identificação molecular dos isolados

3.3.1 Extração de DNA

A partir do ensaio anterior foram selecionados os isolados que apresentaram maior atividade antagonista, avaliada através do raio e da zona de inibição. Esses isolados foram identificados por meio do sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* (bactérias) e região ITS (fungos).

Para a extração de DNA dos isolados bacterianos, culturas puras foram crescidas em meio líquido Luria Bertani a 28 °C por 24 h sob agitação a 150 rpm. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 16.000 rpm e o sobrenadante descartado. A extração de DNA genômico foi realizada com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Para a extração de DNA dos isolados fúngicos, micélios crescidos em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) a 28 °C por 7 dias foram removidos do meio de cultura e macerados em almofariz com nitrogênio líquido. O material pulverizado foi recolhido em microtubo de 2 mL e a extração de DNA genômico foi realizada por meio do kit UltraClean™ Microbial DNA Isolation (MOBIO, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE 1X (10 mM Tris, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA; pH 8,0), corado com solução de GelRed (Biotium, EUA). As amostras foram visualizadas em transiluminador sob luz UV e fotografadas no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, EUA). A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro ND-1000 UV/VIS (NanoDrop Technologies, EUA) e as amostras diluídas para a concentração de 20 ng/μL.

3.3.2 Amplificação do gene *16S rRNA*

Para bactérias, as reações de PCR foram preparadas com os primers 8F e 1492R (Tabela 1). A amplificação do DNA foi realizada com um volume final de reação de 20 μl, contendo 2 μL de DNA (20 ng/μL); 2 μL tampão de reação 10 X (Invitrogen); 1,0 μL de trifosfato de desoxinucleótídeos (dNTP) 2,5 mM cada; 4 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO) 20% (v/v); 0,8 μL de cada primer (10 μM); 0,2 μL de Taq DNA Polimerase 5 U/ μL⁻¹ (Invitrogen), 0,6 μL de MgCl₂ 50mM e 8,6 μL de água ultrapura. A amplificação foi feita em termociclador Veriti (Applied Biosystems, EUA) com uma desnaturação inicial a 95 °C por 2

minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 59 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final de 10 min a 72 °C. O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) por uma hora a 100 V em tampão TAE 1X. O gel foi corado com solução de Gel Red (Biotium, EUA), visualizado sob luz UV e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, EUA).

Tabela 1 - Primers utilizados na amplificação e sequenciamento do gene *16S rRNA* dos isolados bacterianos selecionados.

Primer	Sequência (5'-3')	Referência
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Turner, S. et al., 1999
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	Turner, S. et al., 1999
515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	Turner, S. et al., 1999
902R	GTCAATTCITTTGAGTTTYARYC	Hodkinson e Lutzoni, 2009

3.3.3 Amplificação da região ITS

Para a identificação dos fungos foram utilizados os primers ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5F (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') de acordo com White et al. (1990). As reações de amplificação foram elaboradas com um volume final de 20 µL, contendo 1 µL de DNA (20 ng/µL); 2 µL do tampão de reação 10 X; 1,0 µL de trifosfato de desoxinucleótídeos (dNTP) 2,5 mM cada; 1 µL de cada primer (10 µM), 0,8 µL de MgCl₂ 50mM; 0,2 µL de Taq polimerase 5 U/ µL⁻¹ e 13 µL de água ultrapura. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cyclers (Applied Biosystems, EUA) com programação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 30 segundos e 1 minuto a 72 °C, seguido de um passo final de 72 °C por 10 minutos. Após o término da reação, o produto de PCR foi observado como descrito para as bactérias.

3.3.4 Sequenciamento de DNA

Para a purificação dos fragmentos de DNA amplificados, foram adicionados 4 µL da enzima Exo-Sap (GE HealthCare, USA) em 15 µL produto da reação de PCR. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e 80 °C por 15 minutos.

As reações de sequenciamento foram elaboradas com 4 µL do produto de PCR purificado, 1 µL de primers 1492R, 8F, 902R ou 515F (Tabela 1), 0,5 µL Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, EUA), 1,75 µL do tampão de reação (Applied Biosystems, EUA) e 2,75 µL de água ultrapura. Em seguida, as placas foram incubadas em termociclador nas seguintes condições: 96 °C por 1 minuto, 96 °C por 2 segundos, 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes.

Após o término da reação, foram adicionados 60 µL de etanol absoluto mais 5 µL de EDTA (125 mM). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e incubadas no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi então descartado e em cada amostra foram adicionados 100 µL de etanol 70% (v/v). Novamente as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o etanol foi descartado e as amostras foram centrifugadas invertidas até 300 rpm com baixa aceleração e desaceleração. Posteriormente, foram colocadas em estufa a 65 °C por 3 minutos ou até a completa secagem. Por fim, foram adicionados em cada amostra 10 µL de formamida HI-DI (Applied Biosystems, EUA), seguido de desnaturação em termociclador a 95 °C por 5 minutos.

As amostras foram analisadas no sequenciador de DNA modelo ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem, EUA) e as sequências obtidas foram alinhadas com utilizando o programa Sequencher 4.1.4 (Genes Codes Corporation).

3.3.5 Análise das sequências e construção da árvore filogenética

Os isolados foram identificados por comparação de sequências no banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) usando o programa BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). A árvore filogenética foi construída utilizando as sequências da região 16S rDNA dos isolados e sequências de “isolados tipo” provenientes de coleções de culturas internacionais. Foi utilizado o método Neighbor Joining, utilizando o modelo evolutivo Tamura 3 parameter com 1.000 replicações de bootstraps, através do programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

3.4 Avaliação da produção de metabólitos pelos isolados

Quatorze isolados que apresentaram os maiores valores de inibição no teste de confrontação direta foram selecionados para a avaliação da produção de metabólitos antifúngicos.

Inicialmente, os isolados foram crescidos em placas de Petri contendo meio BDA até obtenção de uma cultura pura e em seguida foram adicionados discos de 5 mm da borda do micélio ou das colônias em Erlenmeyers contendo 50 mL de meio líquido TSB (Tripticaseína de soja). A incubação foi realizada a 28 °C sob agitação de 90 rpm por três dias. Após esse período, o sobrenadante foi coletado por centrifugação a 6.000 rpm durante 10 minutos e filtrado em membranas de 0,22 µm para a obtenção do filtrado. O filtrado de cada antagonista foi transferido para Erlenmeyers de 250 mL onde foram adicionados três discos de 5 mm da borda do micélio de *F. verticillioides* e solução do antibiótico tetraciclina + estreptomicina (20 mg/L). Erlenmeyers contendo apenas meio TSB, discos do fitopatógeno e antibiótico foram utilizados como controle. Durante dez dias os Erlenmeyers foram incubados a 28 °C de forma estacionária, permitindo o crescimento da massa micelial. Posteriormente, as biomassas foram filtradas utilizando-se gaze, secas a 60 °C até peso constante e em seguida pesadas.

3.5 Efeito dos metabólitos na germinação de conídios e desenvolvimento de hifas

Para a obtenção do filtrado de cada antagonista foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 3.4. Para preparação da suspensão de conídios, o fungo CML2743 foi crescido em meio BDA por sete dias a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz. Após esse tempo foram adicionados 3 mL de água estéril em cada placa e a colônia foi raspada com o auxílio de uma lâmina estéril. A suspensão de conídios foi obtida e a concentração foi ajustada para 7×10^4 conídios/mL utilizando uma câmara de Neubauer. Em tubos cônicos de 15 mL foram adicionados 1 mL do filtrado e 1 mL da suspensão de conídios. Nas testemunhas, o sobrenadante foi substituído pelo mesmo volume de água estéril e pelo meio de cultura utilizado para o crescimento dos isolados. A incubação foi realizada a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz. Após 24 horas, foi avaliado em microscópio óptico o efeito do filtrado de cada antagonista sobre a germinação e desenvolvimento das hifas. Foram contados 100 conídios em cada tratamento e os que apresentaram projeção da hifa foram considerados como germinados. As porcentagens de inibição foram calculadas em comparação com o controle.

3.6 Caracterização enzimática dos isolados

Para a avaliação da produção e índice enzimático, todos os isolados bacterianos foram crescidos em meio TSB por 72 horas e a concentração ajustada para aproximadamente 10^8 UFC/mL, antes da inoculação no meio de cultura específico para cada enzima.

3.6.1 Produção de celulase

Os isolados foram cultivados em meio de cultura mínimo M9 (10 g/L de carboximetilcelulose, 5 g/L de extrato de levedura, 12,8 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L de NaCl, 1 g/L de NH_4Cl , 5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15 g/L de ágar). Após 48 h de crescimento microbiano, foram adicionados 10 mL do corante Vermelho Congo (1g/L), deixando-se agir por 15 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de NaCl 5M. A detecção da produção da enzima celulase foi observada após 10-15 minutos com a formação de uma zona amarelada ou alaranjada no entorno das colônias segundo a metodologia de Teather e Wood (1982).

3.6.2 Produção de pectinase

Para a avaliação da atividade da pectinase os isolados foram crescidos em meio mínimo M9 como descrito acima. No entanto, na composição do meio de cultura a fonte de carbono carboximetilcelulose foi substituída por pectina cítrica na mesma quantidade. O pH foi ajustado para 8,0. Após o período de incubação e o crescimento dos isolados como descrito para a celulase, foram adicionados 10 mL lugol, sendo as placas lavadas em seguida com água deionizada. A presença de um halo incolor em torno das colônias foi considerada produção de pectinase, conforme metodologia descrita por Silva (2015).

3.6.3 Produção de protease

Para a avaliação da atividade proteolítica dos isolados foi utilizado o meio de cultura composto de 5g/L de triptona, 2,5 g/L de extrato de levedura, 2,5 g/L de NaCl, 1 g/L de glicose e 16 g/L de ágar. Após a esterilização do meio de cultura, foram adicionados 100 mL de leite desnatado fervido. Após 48 h, a atividade enzimática dos isolados foi determinada observando a formação de um halo incolor em torno das colônias após o crescimento microbiano, segundo metodologia descrita por Silva (2015).

3.6.4 Produção de lipase

A atividade da enzima lipase foi testada de acordo com metodologia de Savitha et al. (2007). Foi avaliado o crescimento dos isolados em meio de cultura composto por 5 g/L peptona, 1 g/L de extrato de levedura, 4 g/L de cloreto de sódio, 15 g/L de ágar, 31,25 mL/L de óleo de oliva, 0,01 g/L de rodamina B; pH 7,0. Após 48 h de crescimento microbiano foi avaliada a presença de halos de coloração azul em torno das colônias quando expostas à radiação ultravioleta.

3.6.5 Índice enzimático

Após o crescimento microbiano em cada meio de cultura específico, o diâmetro das colônias e os halos formados foram medidos com paquímetro e o índice enzimático (IE) foi calculado conforme fórmula abaixo:

$$\text{IE} = \frac{\text{DH}}{\text{DC}}$$

Sendo: DH = o diâmetro em mm do halo descolorido e DC = o diâmetro em mm das colônias dos isolados.

3.7 Avaliação da redução da incidência do patógeno em sementes de milho

Para avaliar a redução da incidência do fitopatógeno *F. verticillioides* foram utilizadas sementes de milho BRS1010 sem nenhum tipo de tratamento antifúngico. Inicialmente, as sementes foram desinfestadas através da imersão em solução de hipoclorito a 3% (v/v) por 5 minutos, seguida de três lavagens com água deionizada. As sementes foram submetidas à luz direta por 24 h e posteriormente congeladas a -20 °C por mais 24 h a fim de inibir o processo de germinação. Após esse tempo, as sementes foram desinfestadas para eliminar os fungos presentes e posteriormente infectadas com *F. verticillioides*. Para a desinfecção, as sementes foram colocadas em uma solução de etanol 70% (v/v) por 10 min e imersas em água deionizada estéril por 4 h. Em seguida, as sementes foram incubadas em água deionizada estéril em banho-maria a 60 °C por 5 min, de acordo com metodologia descrita por Daniels (1983). Para a infecção com *F. verticillioides*, suspensões de esporos foram preparadas conforme descrito no item 3.5, no entanto, a concentração foi ajustada para 1×10^6

conídios/mL. As sementes incubadas com suspensão de conídios foram mantidas sob agitação constante por 24 h a 25 °C e secas em temperatura ambiente.

Para o tratamento das sementes foi utilizada a metodologia adaptada de Bressan e Figueiredo (2003). Os isolados foram crescidos em meio TSB por 72 h e as concentrações ajustadas para aproximadamente 10⁸ UFC/mL. As sementes foram imersas nas suspensões de cada isolado por 24 h a 28 °C e agitadas em agitador orbital à 130 rpm. A testemunha consistiu na imersão das sementes em meio TSB pelo mesmo período de tempo. Um controle adicional contendo sementes desinfectadas, sem tratamento com os isolados e sem inóculo de *F. verticillioides*, foi incluído para avaliar a eficácia da desinfecção.

Após esse procedimento, as sementes foram plaqueadas em caixas plásticas gerbox, com dimensões de 11 x 11 x 3 cm, contendo três camadas de papel filtro umedecido com água deionizada estéril. Para cada tratamento foram utilizadas 60 sementes distribuídas em três repetições de 20 sementes por cada caixa. As caixas foram acondicionadas em prateleiras a 22 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h de luz. A avaliação da incidência de *F. verticillioides* nas sementes foi realizada após oito dias de incubação, examinando-se individualmente as sementes em microscópio.

3.8 Avaliação do tratamento de sementes com as bactérias antagonistas na redução da podridão-do-colmo

O ensaio foi instalado em casa de vegetação da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas-MG. Para avaliação da capacidade de controlar a podridão-do-colmo ocasionada por *F. verticillioides* nas plantas de milho, foram selecionadas quatro bactérias que apresentaram maior eficiência nos testes de antagonismo *in vitro*.

Para o tratamento das sementes, os isolados foram inoculados em 500 mL de meio líquido LB e incubados a 35 °C por 72 h sob agitação de 300 rpm. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 2 min para a separação do sobrenadante que posteriormente foi descartado. A biomassa foi ressuspensa em 200 mL de solução de sacarose a 20% (m/v). Para microbiolização, foram utilizadas sementes de milho BRS 1010 reconhecidas como suscetíveis ao patógeno. As suspensões foram inoculadas nas sementes e a incubação foi realizada sob agitação de 80 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente. O excesso de inóculo foi descartado, as sementes foram misturadas em amido e sacarose a 50% (m/v) e secas por 24 h a 30 °C, conforme metodologia descrita por Lanza et al. (2012).

Inicialmente foi preparada a suspensão de esporos de *F. verticillioides* como descrito no item 3.5 e a concentração ajustada para 1×10^6 conídios/mL. Para os testes nas plantas de milho, as sementes foram plantadas a 5 cm de profundidade em vasos contendo 5 kg de solo. Após 30 dias de plantio foi realizada a inoculação do fitopatógeno no colmo das plantas utilizando um palito esterilizado e imerso na suspensão de esporos. Os tratamentos foram constituídos de: 1) sementes tratadas com cada isolado antagonista e inoculação com *F. verticillioides*; 2) sementes sem tratamento com os isolados e inoculação com *F. verticillioides*; e 3) sementes sem tratamento com os isolados e palitos sem inoculação com *F. verticillioides*. Um controle adicional foi incluído para verificar se os isolados não causaram nenhum efeito prejudicial nos colmos da planta de milho. Nesse caso, as sementes foram tratadas com cada um dos isolados sem a inoculação de *F. verticillioides* e foram cultivadas sob as mesmas condições descritas acima. Após 45 dias, a severidade da podridão-do-colmo foi avaliada segundo escala de notas descrita por Nicoli et al. (2015).

3.9 Análises estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA), seguido do teste de comparação de médias Scott-Knott a $p < 0,05$. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e os resultados, expressos como média das repetições. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software Sisvar (Ferreira, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento dos microrganismos de estigmas de milho

Foram obtidos 190 morfotipos de microrganismos isolados de estigmas de milho coletados nas regiões de Sete Lagoas-MG, Goiânia-GO, Sertaneja-PR e Sidrolândia-MS. Por meio da metodologia de isolamento e de avaliação macromorfológica adotada, foi possível isolar tanto microrganismos endofíticos, que representaram 46% dos isolados, quanto microrganismos epifíticos, representando 54% dos isolados (Tabela 2).

Não foram encontrados na literatura relatos de microrganismos de estilo de vida endofítico em estigma de milho. A busca por microrganismos de tecidos vegetais pouco explorados pode contribuir não somente para fornecer informações sobre a diversidade microbiana nesses locais, como também favorecer a descoberta de novas espécies com potencial biotecnológico. Microrganismos endofíticos vivem, pelo menos uma parte do ciclo

de vida, dentro dos tecidos das plantas, como folhas, caules (Johnston-Monje e Raizada, 2011) e principalmente raízes (Miliute et al., 2015). Porém, os microrganismos podem entrar no tecido da planta através de sítios de emergência de raízes laterais, lesões, aberturas naturais como estômatos e radículas em germinação. Os microrganismos endofíticos são assintomáticos e, ao contrário dos microrganismos patogênicos, não causam danos à planta hospedeira. Além disso, podem atuar na proteção das plantas contra fitopatógenos através da produção de compostos antimicrobianos, competição por espaço e nutrientes e indução de resistência da planta hospedeira (Souza, 2001).

Tabela 2 - Microrganismos endofíticos e epifíticos isolados de estigmas de milho coletados em quatro regiões do Brasil.

Região	Endofíticos	Epifíticos	Total
Sete Lagoas-MG	17	31	48
Goiânia-GO	22	25	47
Sidrolândia-MS	28	22	50
Sertaneja-PR	21	24	45
Total	88	102	190

O isolamento de microrganismos nativos das plantas de milho foi um dos critérios utilizados nesse trabalho, pois, esses isolados são mais adequados para a utilização em programas de controle biológico. Isso deve-se ao fato de que esses isolados coexistem por muitos anos com a microbiota natural e apresentam maiores vantagens competitivas comparadas às espécies exóticas (Figuerola-López et al., 2016). Por esses microrganismos serem mais adaptados ao local de origem, podem apresentar maior capacidade de sobrevivência no campo e capacidade de colonizar o hospedeiro, aumentando as chances de sucesso do controle biológico. O isolamento dos microrganismos direto do estigma do milho foi realizado visando obter microrganismos mais adaptados a esse local específico, que é uma das principais portas de entrada de *F. verticillioides* na planta (Munkvold et al., 1997).

4.2 Avaliação da inibição de *Fusarium verticillioides* em meio sólido

Todos os 190 microrganismos isolados foram testados quanto seu potencial de inibição contra *F. verticillioides*. No entanto, 47 microrganismos não apresentaram crescimento ou apresentaram baixo crescimento no teste de confronto direto. Diante disso, esses isolados não foram incluídos nos resultados desse teste. Provavelmente esses

microrganismos não serão capazes de produzir substâncias em quantidade suficiente para inibir o crescimento de *F. verticillioides* ou não alcançarão um limite que lhes permita exibir uma resposta antagônica.

A zona de inibição apresentou variações significativas em relação aos isolados testados ($p \leq 0,05$). Do total de 167 microrganismos (143 isolados neste trabalho e 24 pertencentes à CMMF), 28 não apresentaram diferença de redução do crescimento em relação ao controle (Grupo A). Os outros 139 isolados que reduziram significativamente o crescimento do *F. verticillioides* foram separados em quinze grupos por meio do teste estatístico de Scott-Knott (Tabela 3). O maior número de isolados (grupo K) apresentou potencial de inibição que variou entre 48,7 a 52,1%.

Tabela 3 - Agrupamentos dos isolados em relação à zona de inibição do crescimento de *Fusarium verticillioides* em teste de confronto direto com base no teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Agrupamento Scott-Knott	Número de isolados	ZI%*	Agrupamento Scott-Knott	Número de isolados	ZI%*
A	28	0 - 1,7	I	7	35,8 - 39,3
B	20	2,5 - 7,6	J	20	43,5 - 48,3
C	9	8,5 - 10,2	K	30	48,7 - 52,1
D	11	11,6 - 16,6	L	4	53,2 - 57,1
E	10	17,0 - 21,3	M	5	58,4 - 62,5
F	8	22,0 - 25,0	N	1	71,6
G	5	26,4 - 28,5	O	1	75,8
H	7	30,7 - 35,0	P	1	100,0

* Zona de inibição obtida pelo teste de confronto direto entre os isolados e *Fusarium verticillioides*.

O teste de confrontação direta *in vitro* é um método de triagem convencional apropriado para avaliar com maior rapidez e menor custo um grande número de microrganismos com atividade antagonista (Mota et al., 2017). A vantagem da utilização desse método é a possibilidade de selecionar tanto microrganismos que produzem substâncias antimicrobianas difusíveis no meio de cultura quanto microrganismos que atuam inibindo o fitopatógeno quando ocorre o contato entre eles, ou seja, microrganismos que empregam diferentes estratégias de biocontrole (Figuerola-López et al., 2016), como a competição por espaço e ou produção de metabólitos.

Utilizando o teste de confronto direto no meio sólido, nesse trabalho foi possível observar dois tipos de inibição do crescimento de *F. verticillioides* pelos diferentes isolados.

A maioria dos isolados promoveu a inibição do crescimento do fitopatógeno com a formação de uma área limpa ao redor das colônias (Figura 1A). O restante dos isolados interrompeu o crescimento quando houve o contato do micélio do fitopatógeno com a colônia do isolado (Figura 1B). O mesmo resultado foi observado por Palumbo et al. (2007), que analisaram o antagonismo de bactérias do solo e rizosfera contra *Aspergillus flavus* e verificaram que o mecanismo de ação foi através da produção de um ou mais compostos antimicrobianos que se difundiram no meio de cultura.

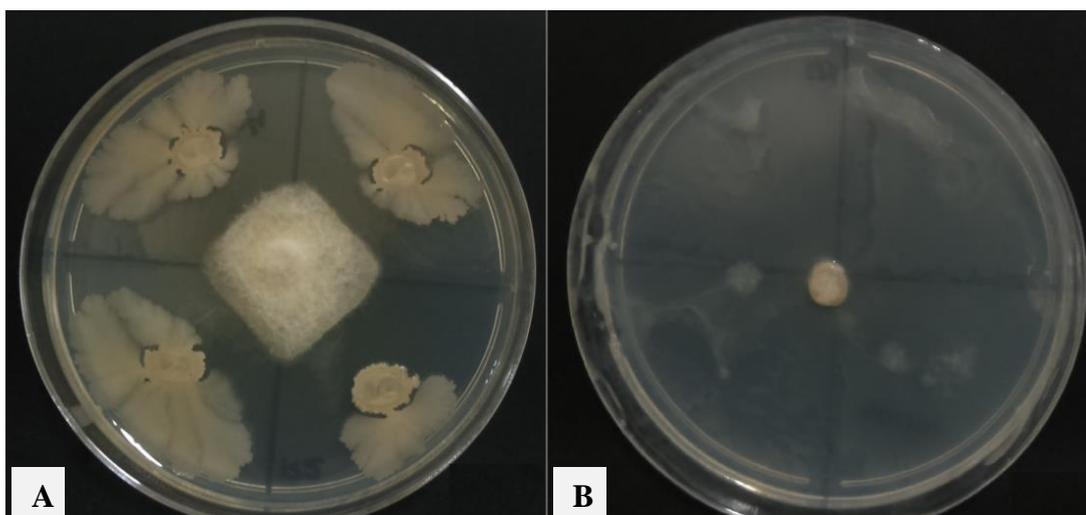


Figura 1 - Inibição do crescimento de *Fusarium verticillioides* por dois isolados com estratégias distintas no teste de confronto direto. (A) Inibição formando uma área limpa ao redor dos isolados, isolado IM14. (B) Interrupção do crescimento sem a formação de halo

A triagem é um passo crítico no controle biológico, uma vez que, o sucesso de todas as etapas subsequentes depende da capacidade de um procedimento de identificar candidatos com potencial antagonista (Cavaglieri et al., 2004). Nesse estudo, o método de seleção utilizado foi eficiente para selecionar microrganismos com a atividade de inibição *in vitro* de *F. verticillioides*. De todos os microrganismos testados neste primeiro ensaio, 83% apresentaram alguma atividade inibitória promovida por diferentes mecanismos de ação.

Variações na capacidade de inibição dos isolados foram observadas de acordo com a região de cada microrganismo (Figura 2). O maior número de isolados que inibiram entre 0 a 20% do crescimento de *F. verticillioides* foram coletados da região de Sete Lagoas-MG, onde foi incluído tanto os microrganismos isolados quanto os pertencentes à Coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF). O índice de inibição entre 20,01 e 40% foi obtido principalmente pelos isolados de Goiânia-GO. Os isolados de Sidrolândia-MS apresentaram maior potencial de inibição entre todos os microrganismos avaliados. Nessa região foi isolado o maior número de microrganismos com potencial de inibição variando de

40,01 a 60% e foi a única região que continha um isolado que inibiu 100% do crescimento do fitopatógeno.

O desenvolvimento de novas tecnologias mais sustentáveis baseia-se na busca de fontes genéticas, químicas e biológicas que podem ser empregadas como alternativa na redução dos problemas gerados pelo uso de fungicidas na agricultura (Gillican, 2008). Nesse trabalho, a busca por microrganismos de regiões diferentes visou a obtenção de um maior número de isolados que poderiam apresentar potencial como agentes de biocontrole. O teste de seleção de agentes antagonistas mostrou que em todas as quatro regiões foram encontrados microrganismos que apresentaram grande potencial de inibição de *F. verticillioides*.

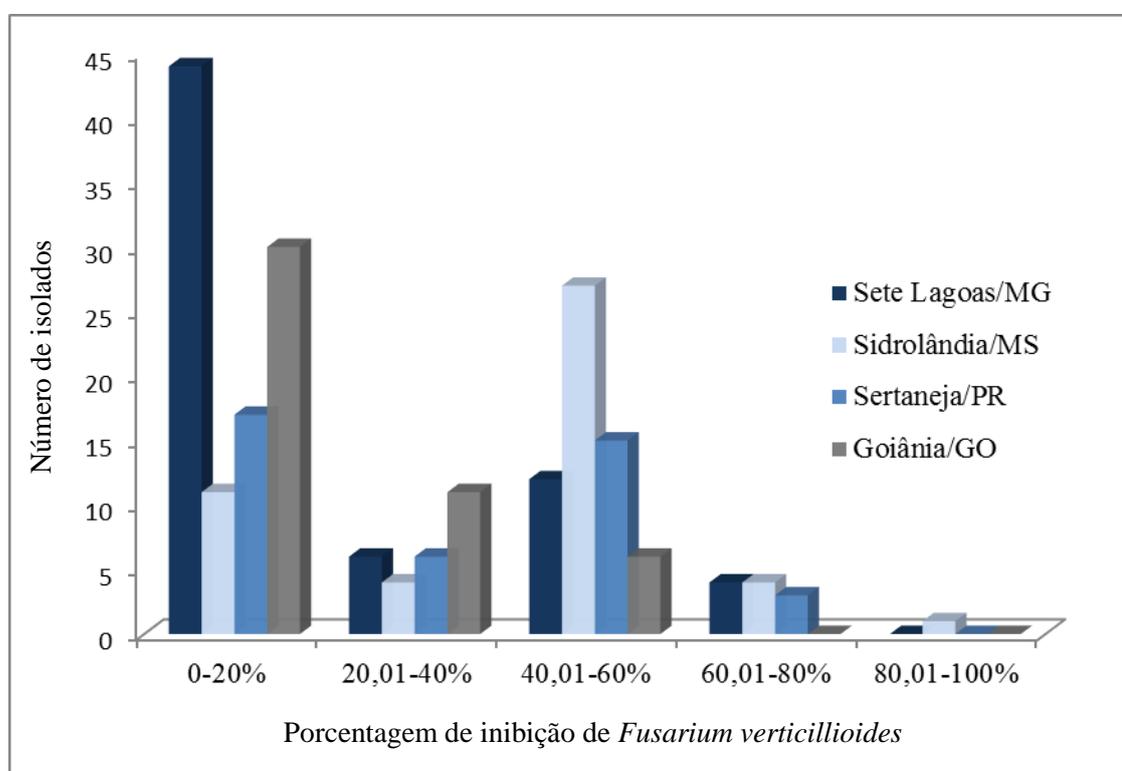


Figura 2 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium verticillioides* por microrganismos coletados em diferentes regiões brasileiras.

4.3 Identificação molecular dos isolados selecionados

Para a identificação molecular, foram selecionados 42 isolados que mostraram inibição superior ou igual a 48,7% do crescimento de *F. verticillioides*, no teste de confronto direto.

A identificação desses isolados foi feita com base na comparação das sequências obtidas com as sequências depositadas no Genbank, com valores de similaridade acima de 98% e E-value igual a 0. O sequenciamento do DNA permitiu a identificação dos isolados em

oito diferentes gêneros: *Bacillus* sp. (57,1%), *Burkholderia* sp. (23,8%), *Achromobacter* sp. (7,1%), *Pseudomonas* sp. (2,4%), *Serratia* sp. (2,4%), *Penicillium* sp. (2,4%), *Candida* sp. (2,4%) e *Aspergillus* sp. (2,4%) (Tabela 4).

Tabela 4 - Isolados, local de coleta, tipo (estilo de vida), atividade antagonista (ZI) e identificação molecular de 42 isolados que apresentaram inibição $\geq 48,7\%$ do crescimento de *Fusarium verticillioides*.

Isolado	Local de coleta	Tipo	ZI*	Identificação
ISD04	Sidrolândia	Endofítico	100	<i>Achromobacter</i> sp.
IPR24	Sertaneja	Epifítico	75	<i>Aspergillus</i> sp.
CT01	Sete Lagoas	Epifítico	71	<i>Penicillium</i> sp.
CT02	Sete Lagoas	Epifítico	62	<i>Bacillus</i> sp.
IPR45	Sertaneja	Endofítico	61	<i>Pseudomonas</i> sp.
IPR23	Sertaneja	Epifítico	60	<i>Achromobacter</i> sp.
IM14	Sete Lagoas	Endofítico	58	<i>Bacillus</i> sp.
IPR06	Sertaneja	Epifítico	58	<i>Bacillus</i> sp.
2080**	Sete Lagoas	Endofítico	57	<i>Bacillus</i> sp.
IGN23	Goiânia	Epifítico	55	<i>Bacillus</i> sp.
1919**	Sete Lagoas	Endofítico	53	<i>Burkholderia</i> sp.
IGN01	Goiânia	Epifítico	53	<i>Bacillus</i> sp.
IGN36	Goiânia	Endofítico	52	<i>Candida</i> sp.
IGN14	Goiânia	Epifítico	51	<i>Bacillus</i> sp.
IPR09	Sertaneja	Endofítico	50	<i>Bacillus</i> sp.
ISD23	Sidrolândia	Epifítico	50	<i>Bacillus</i> sp.
CT04	Sete Lagoas	Epifítico	50	<i>Bacillus</i> sp.
CT03	Sete Lagoas	Epifítico	50	<i>Bacillus</i> sp.
IM25	Sete Lagoas	Epifítico	50	<i>Bacillus</i> sp.
ISD03	Sidrolândia	Endofítico	50	<i>Bacillus</i> sp.
ISD01	Sidrolândia	Endofítico	50	<i>Bacillus</i> sp.
ISD41	Sidrolândia	Endofítico	50	<i>Bacillus</i> sp.
CT05	Sete Lagoas	Epifítico	50	<i>Bacillus</i> sp.
ISD36	Sidrolândia	Endofítico	50	<i>Bacillus</i> sp.
IM45	Sete Lagoas	Epifítico	50	<i>Serratia</i> sp.
ISD31	Sidrolândia	Epifítico	50	<i>Burkholderia</i> sp.
ISD12	Sidrolândia	Endofítico	50	<i>Burkholderia</i> sp.
ISD40	Sidrolândia	Endofítico	50	<i>Burkholderia</i> sp.

ISD34	Sidrolândia	Epifítico	50	<i>Burkholderia</i> sp.
ISD46	Sidrolândia	Endofítico	50	<i>Burkholderia</i> sp.
ISD15	Sidrolândia	Epifítico	50	<i>Burkholderia</i> sp.
IPR16	Sertaneja	Epifítico	50	<i>Burkholderia</i> sp.
ISD11	Sidrolândia	Endofítico	50	<i>Achromobacter</i> sp.
ISD49	Sidrolândia	Endofítico	49	<i>Bacillus</i> sp.
ISD05	Sidrolândia	Endofítico	49	<i>Bacillus</i> sp.
ISD07	Sidrolândia	Epifítico	49	<i>Bacillus</i> sp.
ISD18	Sidrolândia	Epifítico	49	<i>Burkholderia</i> sp.
IPR04	Sertaneja	Epifítico	48	<i>Bacillus</i> sp.
IPR05	Sertaneja	Epifítico	48	<i>Bacillus</i> sp.
IPR03	Sertaneja	Endofítico	48	<i>Bacillus</i> sp.
IPR41	Sertaneja	Endofítico	48	<i>Bacillus</i> sp.
IPR01	Sertaneja	Endofítico	48	<i>Burkholderia</i> sp.

* Zona de inibição obtida pelo teste de confronto direto entre os isolados e *Fusarium verticillioides*.

** Bactérias pertencentes à coleção da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF), isoladas da cidade de Sete Lagoas-MG. As bactérias provenientes da CMMF foram isoladas de seiva (1919) e de folha de plantas de milho (2080).

Nos últimos anos, bactérias de diferentes habitats ou nichos ecológicos (rizosféricas e endofíticas) e diferentes gêneros foram utilizadas para controlar fitopatógenos, como *F. verticillioides*, bem como promover o crescimento das plantas. Espécies de *Burkholderia* e *Pseudomonas* foram relatadas habitando a rizosfera de diferentes culturas agrícolas promovendo o crescimento da planta e atuando como agente de controle de *F. verticillioides* no milho (Hernández-Rodríguez et al., 2008). Palumbo et al. (2007), analisando os microrganismos do solo, da rizosfera e endofíticos da cultura do milho, encontraram diferentes gêneros de bactérias com potencial antagonista contra *F. verticillioides* e *Aspergillus flavus*. Entre os gêneros predominantes na rizosfera, *Burkholderia* e *Pseudomonas* foram os mais encontrados, e nas amostras do solo, os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* prevaleceram.

Dentre os microrganismos identificados nesse estudo, bactérias do gênero *Bacillus* foram encontradas em maior número, tanto como endofíticas quanto epifíticas do milho. Espécies desse gênero são frequentemente encontradas no solo e em outros ambientes por causa da sua capacidade de formar endósporos que lhes confere vantagens em relação a outros microrganismos como maior tolerância a flutuações de temperatura e escassez de nutrientes, entre outros estresses ambientais (Sonenshein et al., 2002).

Além de terem sido encontradas em maior número, os isolados de *Bacillus* destacaram-se como agentes de controle de *F. verticillioides*. Esse resultado está de acordo com outros trabalhos que têm mostrado o potencial desse gênero no controle de diferentes fitopatógenos (Raaijmakers e Mazzola, 2012). Em um estudo de Passari et al. (2017), *Bacillus* também foi encontrado como o gênero dominante entre os isolados de rizosfera com potencial de inibição do crescimento de diferentes fitopatógenos, principalmente espécies de *Fusarium*. Esse gênero representou 56,2% do total de isolados, seguido pelos gêneros *Staphylococcus* (15,6%), *Pseudomonas* (12,5%), *Sphingomonas* (9,3%) e *Achromobacter* (3,1%). A prevalência de espécies de *Bacillus* também foi encontrada na rizosfera de milho por Figueroa-López et al. (2016) buscando microrganismos nativos com potencial para o controle de *F. verticillioides*. Tais autores identificaram como principais gêneros bacterianos *Bacillus* (341 isolados), *Enterobacter* (38), *Pseudomonas* (23) e *Lysinibacillus* (13) que exibiram porcentagem de inibição variando de 53 a 99%.

Os resultados de identificação mostraram que dois isolados que se destacaram no controle de *F. verticillioides in vitro* pertencem aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* que são relatados como fitopatogênicos para a cultura do milho. Há relatos na literatura mostrando o potencial desses microrganismos para o uso como agentes de biocontrole. No entanto, isso não implica a recomendação do seu uso direto no campo. Para que isso seja possível, testes posteriores de patogenicidade e de produção de micotoxinas deverão ser realizados para melhor caracterização da virulência desses isolados.

Além do seu potencial como agentes de controle biológico, bactérias e fungos dos gêneros identificados nesse trabalho são conhecidos pela sua importância como agentes promotores de crescimento vegetal. Bactérias dos gêneros *Bacillus* (Kavamura et al., 2013), *Pseudomonas* (Islam et al., 2014), *Serratia* (Gyaneshwar et al., 2001), *Burkholderia* (Minerdi et al., 2001), *Achromobacter* (Sala et al., 2008), fungos dos gêneros *Penicillium* (Souchie e Abboud, 2007) e *Aspergillus* (Lian et al., 2008) e *Candida* (Amprayan et al., 2012) podem atuar promovendo aumentos significativos no milho e em outras culturas de importância agrícola. Essa característica deve-se à capacidade desses microrganismos de atuarem produzindo fito-hormônios, fixando nitrogênio, aumentando a absorção de nutrientes através da produção de sideróforos e ácidos orgânicos envolvidos na solubilização de fosfato, que são favoráveis para o crescimento e desenvolvimento das plantas e síntese de enzimas relacionadas à resistência sistêmica (Graças et al., 2015).

4.4 Análise filogenética

A partir das sequências de DNA dos isolados bacterianos foi construída uma árvore filogenética contendo sequências de “isolados tipo” depositadas no GenBank. A árvore foi obtida pelo método de Neighbor Joining, utilizando o modelo evolutivo Tamura 3 parameter, com 1.000 replicações de bootstraps (Figura 3).

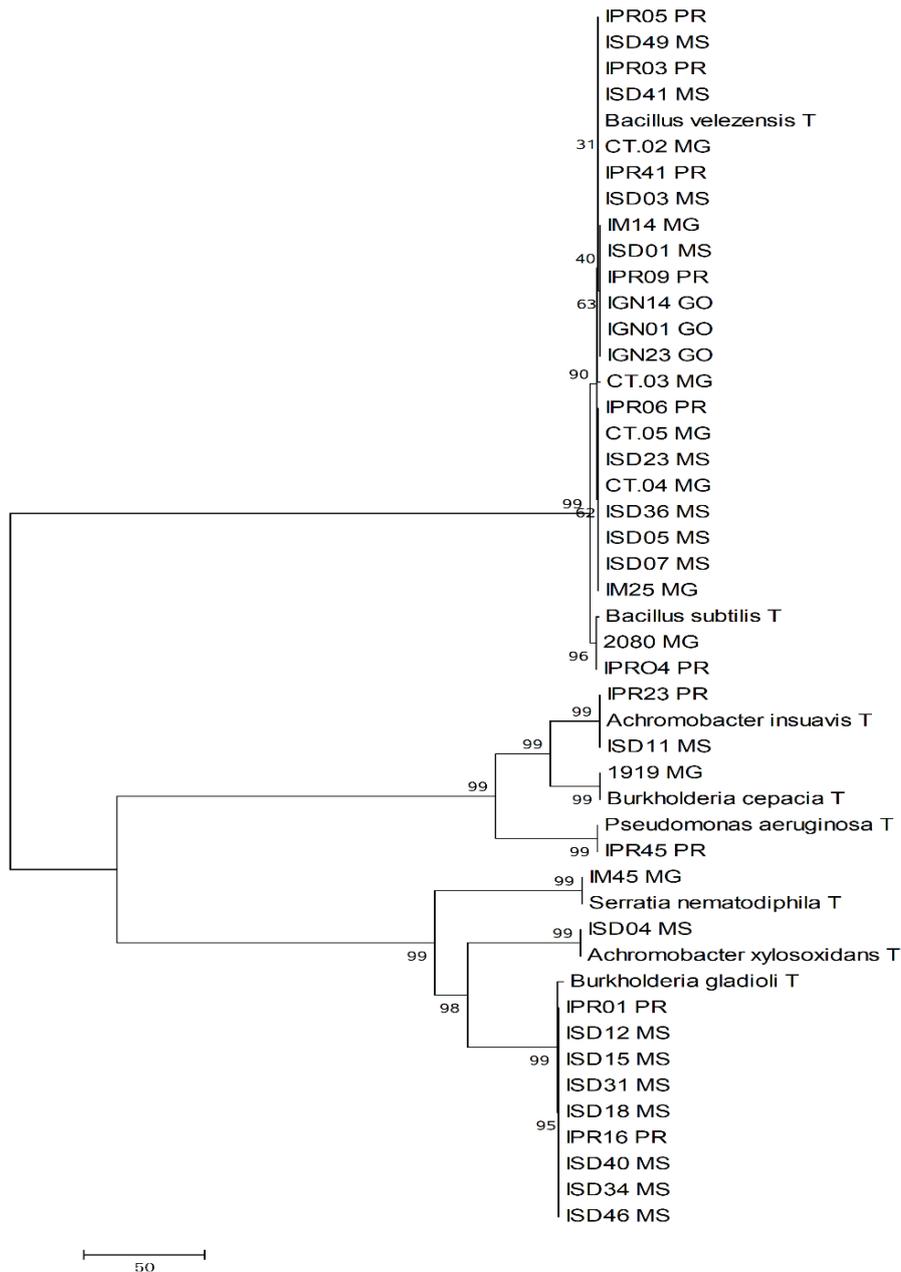


Figura 3 - Árvore filogenética construída a partir de sequências parciais do gene *16S rRNA* dos isolados selecionados e comparadas com sequências tipo (T) depositadas no GenBank. O método utilizado para a construção do dendograma foi baseada em Neighbor Joining, utilizando o modelo evolutivo Tamura 3 parameter com 1.000 replicações de bootstraps, através do programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

As sequências das bactérias selecionadas foram agrupadas com espécies de “isolados tipos” de cinco gêneros: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Acromobacter*, confirmando a identificação obtida anteriormente pelo BLAST (Tabela 4). As bactérias foram relacionadas com as espécies: *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia nematodiphila*, *Achromobacter insuavis*, *Achromobacter xylosoxidans* e *Burkholderia gladioli*.

Embora o sequenciamento utilizado nesse estudo tenha se mostrado eficiente para identificação de algumas espécies de interesse, a análise filogenética com base apenas no gene ribossomal 16S é limitada e pode não ser suficiente para distinguir espécies estritamente relacionadas como as do gênero *Bacillus*. Isso ocorre por causa do grau muito elevado de conservação nas sequências nucleotídicas que este gene apresenta, o que pode gerar dificuldades na classificação de algumas espécies (Vandamme et al., 1996).

Espécies de bactérias identificadas nesse trabalho têm sido relacionadas em outros trabalhos como agentes de biocontrole contra diferentes fitopatógenos que causam danos em culturas de grande importância agrícola. *Bacillus subtilis* e *Bacillus velezensis* são espécies intimamente relacionadas (Dunlap et al., 2016) e são conhecidas pelo seu potencial antagonista contra diferentes patógenos de plantas. Em um trabalho de Palazzini et al. (2016), a espécie *B. subtilis* foi reclassificada como *B. velezensis* de acordo com a análise filogenética. No estudo, *B. velezensis* mostrou atividade antagonista contra *Fusarium graminearum* reduzindo a gravidade da doença e diminuindo a acumulação de micotoxinas em condições de campo. Os autores atribuíram essa capacidade à produção de lipopeptídeos como a surfactina, fengicina e iturina que são compostos relacionados à atividade antimicrobiana. Em um trabalho de Raudales et al. (2017), analisando o genoma de *B. velezensis*, foram encontrados vários genes envolvidos na biossíntese de compostos com efeitos tóxicos sobre estruturas de células de fungos e genes de resistência induzida sistêmica nas plantas, o que explica em parte as características dessa espécie como agente antagonista.

Burkholderia cepacia é uma espécie também descrita na literatura com atividade de inibição de diferentes fungos fitopatogênicos, incluindo espécies de *Fusarium*. Em um trabalho de Li et al. (2009), *B. cepacia* foi descrita como produtora de um composto antifúngico (CF66I) que atuou inibindo *F. solani*. Segundo os autores, altas concentrações desse metabólito atuaram promovendo a morte do fitopatógeno e baixas concentrações causaram alterações nas hifas, como o inchaço e a deposição anormal de quitina, o que provavelmente inibiu o crescimento do fungo. *Pseudomonas aeruginosa* foi descrita como agente de biocontrole de *F. verticillioides* em um trabalho de Borah et al. (2016b). Os autores

descreveram que um biossurfactante produzido por essa espécie, identificado como ramnolipídio, apresentou atividade antifúngica e promoveu danos na estrutura micelial do fungo. O tratamento de sementes com *P. aeruginosa* foi eficiente para suprimir os sintomas da doença e controlar a podridão-do-colmo e da espiga, além de promover um aumento da biomassa vegetal e melhorar a frutificação das plantas de milho.

A espécie *Serratia nematodiphila* foi identificada com potencial de inibir o crescimento de *Aspergillus parasiticus* em sementes de amendoim, bem como de reduzir os níveis de aflatoxinas produzidas por esse fitopatógeno. A capacidade dessa espécie como agente de biocontrole foi relacionada com a produção de quitinases que degradam as paredes celulares fúngicas (Wang et al., 2013). Além de seu potencial como agente de controle biológico, essa espécie está envolvida na promoção de crescimento vegetal. Em um trabalho de Khan et al. (2017), que analisou o genoma completo dessa espécie, identificaram-se genes que atuam na biossíntese de ácido indolacético (AIA), solubilização de fosfato e genes enzimáticos com resposta ao estresse oxidativo. Da mesma forma, a espécie *Burkholderia gladioli* foi identificada como agente de controle biológico contra diferentes fungos fitopatogênicos (Elshafie et al., 2012). Nesse trabalho, atividade antifúngica de *B. gladioli* foi relacionada com a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, como quitinase, protease e glucanase e de metabólitos secundários difusíveis e voláteis que reduziram a taxa de crescimento de *F. oxysporum* e *Rhizoctonia solani*. A espécie *Burkholderia gladioli* também foi relacionada como promotora de crescimento de milho em um trabalho de Gunjal e Kapadnis (2013), que atribuiu essa atividade à solubilização de fósforo, produção de fitohormônios, como ácido indolacético (AIA), giberelina e outros compostos relacionados ao incremento vegetal.

Achromobacter xylosoxidans é uma bactéria frequentemente encontrada na rizosfera que foi identificada como agente de biocontrole de *Fusarium* em plantas de tomate (Moretti et al., 2008). Os principais mecanismos de biocontrole utilizados por esse microrganismo incluem a produção de sideróforos que fornece vantagens de competição por ferro no ambiente, indução da resistência sistêmica nas plantas (Moretti et al., 2008) e produção de quitinase (Vaidya et al., 2001).

4.5 Produção de metabólitos antifúngicos pelos isolados

Testes de antagonismo utilizando o confronto direto entre as culturas são importantes para a seleção inicial dos isolados com potencial de controle biológico. Esse controle pode

ocorrer por causa de diferentes mecanismos de atuação como a produção de compostos antifúngicos ou por competição entre os microrganismos. Uma vez comprovada a inibição, a próxima etapa consiste em analisar as causas da inibição, que normalmente estão relacionadas à produção de metabólitos com atividade inibitória ou de enzimas líticas (Carissimi, 2006). O conhecimento sobre os mecanismos de inibição dos patógenos é importante para uma aplicação bem-sucedida dos agentes de controle biológico (Jeffries e Young, 1994).

Quatorze isolados selecionados no teste de confrontação direta foram avaliados quanto à capacidade de produzir metabólitos antifúngicos. Os resultados mostraram que praticamente todos os isolados apresentaram capacidade de produzir sobrenadantes que reduziram significativamente o crescimento de *F. verticillioides* medido através do peso seco da biomassa. Dos isolados testados, nove apresentaram maiores valores de inibição (59 a 74%), não havendo diferença significativa entre eles. Somente o filtrado de um isolado *Penicillium* sp. (CT01) não apresentou valores significativos de redução do peso da biomassa quando comparado com a testemunha (Tabela 5).

Grande parte dos microrganismos envolvidos no controle biológico apresentam a capacidade de produzir um grande número e tipos de metabólitos biologicamente ativos, de amplo espectro ou específicos, que são característicos das espécies e tem como principal função a proteção contra outros organismos (Braz-Filho, 2010). O mesmo isolado pode produzir mais de um composto antimicrobiano ao mesmo tempo, atuando sobre estruturas distintas do fungo (Handelsman e Stabb, 1996). Os metabólitos antifúngicos produzidos podem atuar causando a quebra da estrutura celular independente do contato físico entre os microrganismos (Bettioli e Ghini, 1995). Além da vantagem de sobrevivência que a produção desses compostos confere, muitas outras funções importantes podem estar associadas a essas substâncias como a aquisição de substratos ou a sobrevivência em condições estressantes (Raaijmakers e Mazzola, 2012).

Tabela 5 - Inibição de *Fusarium verticillioides* pelos metabólitos produzidos pelos isolados antagonistas medida pelo peso final da biomassa.

Isolado	Identificação	Peso da biomassa (mg)*	Inibição do Crescimento (%) em relação à testemunha
Testemunha**		367,66 a	-
CT01	<i>Penicillium sp.</i>	319,00 a	13,23
IGN36	<i>Candida intermedia</i>	282,66 b	23,11
IPR24	<i>Aspergillus flavus</i>	251,66 b	31,55
ISD04	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	194,00 c	47,23
2080	<i>Bacillus sp.</i>	191,66 c	47,87
IM14	<i>Bacillus sp.</i>	147,33 d	59,92
1919	<i>Burkholderia cepacia</i>	130,00 d	64,64
IPR23	<i>Achromobacter insuavis</i>	116,33 d	68,35
IGN23	<i>Bacillus sp.</i>	113,00 d	69,26
IGN01	<i>Bacillus sp.</i>	111,33 d	69,71
IGN14	<i>Bacillus sp.</i>	110,00 d	70,08
IPR06	<i>Bacillus sp.</i>	104,66 d	71,53
IPR45	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,66 d	72,89
CT02	<i>Bacillus sp.</i>	93,00 d	74,70

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

**Testemunha: fitopatógeno crescido em meio de cultura sem o contato com os metabólitos.

Nesse estudo, os testes de produção de metabólitos revelaram que treze dos quatorze isolados mais eficientes no teste de confrontação direta apresentaram a capacidade de liberar para o meio de cultura substâncias ativas contra *F. verticillioides*. Esse resultado está de acordo com outros trabalhos que demonstraram que um dos principais mecanismos de atuação dos antagonistas consiste na produção de compostos antimicrobianos. Mostraram que espécies do gênero *Bacillus* têm sido capazes de produzir muitos metabólitos secundários com efeitos antifúngicos em diversos patógenos das plantas (Raaijmakers e Mazzola, 2012). Dentre os principais metabólitos com propriedade antimicrobiana de *Bacillus* destacam-se os lipopeptídeos cíclicos, como a iturina A, fengicina e surfactina. A fengicina apresenta atividade fungitóxica contra fungos filamentosos e pode induzir a resistência das plantas e a surfactina atua como um biosurfactantes e também induzem a resistência sistêmica (Gong et al., 2015; Kim et al., 2017). A iturina mostra uma forte atividade antifúngica contra leveduras e fungos e tem sido relatada atuando na membrana citoplasmática, podendo causar o

vazamento de substâncias vitais que acabam levando a célula à morte (Ongena e Jacques, 2008).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* têm sido bastante investigadas quanto à atividade antagonista por apresentam capacidade de produzir uma ampla gama de compostos que são ativos contra diversos fungos fitopatogênicos. Os principais metabólitos produzidos por *Pseudomonas* incluem antifúngicos peptídicos como a viscosinamida; antibióticos, como floroglucinóis, fenazinas, pioluteorina e pirrolnitrila; enzimas; gás hidrocianeto; sideróforos, como o ácido salicílico, a pioeverdina e a pioquelina, responsáveis por quelar o ferro e outros metais, que conferem vantagem competitiva aos agentes de biocontrole pela limitação de minerais essenciais nos habitats naturais (Duffy e Défago, 1999; Villa, 1999).

4.6 Efeito dos metabólitos na germinação de conídios e desenvolvimento de hifas

A germinação dos conídios de *F. verticillioides* foi alterada pelo contato com metabólitos produzidos pelos isolados (Tabela 6). No controle com o meio de cultura ou água estéril as hifas apresentaram crescimento normal dentro das 24 h de incubação (Figura 4A e 4B). Os isolados apresentaram diferentes percentuais de inibição comparando com o controle que apresentou 87% de germinação. Somente o filtrado da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (IPR45) inibiu 100% a germinação dos conídios. Os demais isolados apresentaram valores de inibição que variaram de 18,4 a 56,3%.

Walker et al. (2001), avaliando os efeitos de metabólitos produzidos por *Pseudomonas antimicrobica* sobre os esporos de *Botrytis cinerea*, encontraram resultados positivos de inibição da germinação e de redução da ramificação das hifas do fitopatógeno, independentemente do tempo de incubação. Em outro trabalho, os mesmos autores avaliaram o efeito dos metabólitos na germinação dos conídios em folhas de morango e encontraram redução significativa da germinação quando as substâncias produzidas por *P. antimicrobica* foram aplicadas na planta (Walker et al., 1996).

Os microrganismos antagonistas ou os metabólitos produzidos por eles podem atuar tanto prevenindo o estabelecimento dos fitopatógenos, quanto inibindo sua atividade fitopatogênica após a colonização na planta. No entanto, quando ocorre a atuação dos microrganismos em uma determinada fase crítica do desenvolvimento do fitopatógeno, como no período de germinação de seus esporos ou na formação inicial do tubo germinativo, antes da penetração na planta hospedeira, o controle pode se tornar ainda mais efetivo.

Tabela 6 - Porcentagem de germinação e de inibição da germinação de conídios de *Fusarium verticillioides* que tiveram contato com o filtrado dos isolados.

Isolado	Identificação	Germinação (%)	Inibição da germinação em relação à testemunha (%)
Testemunha**		87	-
CT01	<i>Penicillium</i> sp.	61	29,9
IGN36	<i>Candida intermedia</i>	46	47,1
IPR24	<i>Aspergillus flavus</i>	71	18,4
ISD04	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	43	50,6
2080	<i>Bacillus</i> sp.	58	33,3
IM14	<i>Bacillus</i> sp.	38	56,3
1919	<i>Burkholderia cepacia</i>	52	40,2
IPR23	<i>Achromobacter insuavis</i>	45	48,3
IGN23	<i>Bacillus</i> sp.	69	20,7
IGN01	<i>Bacillus</i> sp.	67	23,0
IGN14	<i>Bacillus</i> sp.	71	18,4
IPR06	<i>Bacillus</i> sp.	69	20,7
IPR45	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	100,0
CT02	<i>Bacillus</i> sp.	48	44,8

**Testemunha: conídios de *Fusarium verticillioides* que não tiveram contato com os metabólitos dos isolados.

A avaliação microscópica mostrou que 64% dos isolados pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp. (IM14, IGN01, IGN14, 2080, CT02, IPR06, IGN23), *Burkholderia* sp. (1919) e *Achromobacter* sp. (IPR23) produziram filtrados que alteraram o crescimento normal das hifas e causaram anormalidades morfológicas, como inchaço, encurtamento e vacuolização das hifas (Figura 4C, 4D e 4E). Além disso, foi observado que o filtrado do isolado *Pseudomonas aeruginosa* (IPR45) inibiu completamente a germinação e reduziu consideravelmente o número de esporos na suspensão (Figura 4F), o que pode indicar a produção de metabólitos ou enzimas extracelulares que romperam a parede do conídio causando a sua destruição. Esse resultado foi consistente quando o experimento foi repetido. O mesmo fenômeno foi observado por Chan et al. (2003) analisando o efeito do filtrado de *Bacillus subtilis* em diferentes concentrações sobre a germinação de macroconídios e crescimento de hifas de *F. graminearum* após quatro dias de incubação. Os autores supõem que o mecanismo de atuação foi a produção de antibióticos que atuaram sobre a membrana celular fúngica alterando sua permeabilidade, o que gerou o inchaço das hifas e a ruptura de

algumas células. As mesmas alterações morfológicas foram relatadas por Gunji et al. (1983) analisando o efeito de antibióticos com ação fungicida sobre fungos e leveduras. Os autores descrevem várias anormalidades causadas por diferentes antibióticos sobre as células, entre elas, o inchaço e a ruptura das hifas, que foram alterações frequentemente observadas no estudo.

Foi demonstrado nesse ensaio que o isolado IPR45 (*Pseudomonas aeruginosa*) apresentou a capacidade de inibir completamente a germinação dos esporos de *F.verticillioides*. Além disso, os filtrados de alguns isolados causaram severas alterações morfológicas nas hifas e impossibilitaram seu crescimento normal. Sabe-se que o micélio é a estrutura vegetativa que apresenta um papel fundamental na reprodução assexuada e na progressão da doença. Dessa forma, os danos causados a integridade dessa estrutura podem reduzir a patogenicidade e impedir o estabelecimento de um fungo fitopatogênico (Borah et al., 2016a).

Recentemente, a quimiosensibilização foi apresentada como nova estratégia para o aumento da eficácia dos fungicidas, permitindo aumentar a sensibilidade dos fitopatógenos aos compostos químicos pela utilização simultânea de duas ou mais substâncias fungicidas que teriam pouco ou nenhum efeito se utilizadas individualmente (Kim et al., 2017). Assim, os metabólitos antimicrobianos, que causam danos à parede celular e alteram a permeabilidade da membrana, produzidos pelos isolados nesse estudo, podem aumentar a sensibilidade do fitopatógeno aos fungicidas. A utilização desses compostos em conjunto com os fungicidas convencionais poderá aumentar a eficiência de controle, bem como diminuir o desenvolvimento de resistência dos patógenos e reduzir danos ao meio ambiente pela utilização de menor dosagem dos produtos comerciais.



Figura 4 - Hifas de *Fusarium verticillioides* em crescimento sem o contato com os filtrados. (A, B), hifas com anormalidades na presença dos filtrados após 24 h de incubação (C, D, E), esporo não germinado de *F. verticillioides* em contato com o filtrado de *Pseudomonas aeruginosa* (F).

4.7 Caracterização enzimática dos isolados

4.7.1 Produção de celulase

A atividade da enzima celulase foi identificada através da observação de um halo amarelo em torno das colônias após a adição do corante vermelho congo ao meio de cultura (Figura 5). A formação dos halos de hidrólise está diretamente relacionada à zona de atuação da enzima celulase e acontece em razão da quebra do substrato carboximetilcelulose em fragmentos pequenos aos quais o corante não consegue se ligar ou que podem ser lavados para fora das placas durante o processo de coloração.

Do total de quatorze isolados avaliados, dez foram positivos para a produção de celulase. Quatro isolados (IGN36, IPR24, IPR45, ISD04), pertencentes aos gêneros *Cândida*, *Aspergillus*, *Pseudomonas* e *Achromobacter*, respectivamente, não produziram halo indicativo da atividade enzimática.



Figura 5 - Formação de halo indicativo da produção da enzima celulase pelos isolados em meio carboximetilcelulose corado com vermelho congô.

Os valores de IE (índice enzimático) dos isolados que produziram celulase apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre eles e foram separados em quatro grupos distintos. Os maiores valores de índice enzimático foram obtidos pelos isolados 2080, identificado como *Bacillus* sp. (IE= 1,85), e IPR23 (IE= 1,74), identificado como *Achromobacter insuavis*, não havendo diferença significativa entre eles (Tabela 7).

4.7.2 Produção de pectinase

Para a determinação da atividade pectinolítica após o crescimento microbiano foi avaliada a formação de halo de coloração amarela ao redor das colônias (Figura 6). Da mesma forma como observado no teste de produção de celulase, os mesmos quatro isolados (IGN36, IPR24, IPR45, ISD04) não formaram halo no meio de cultura específico, indicando que esses isolados também não possuem a capacidade de produzir enzima pectinase.



Figura 6 - Formação de halo indicativo da produção da enzima pectinase pelos isolados em meio corado com lugol.

Os outros dez isolados que apresentaram a capacidade de produzir pectinase foram separados pelo Teste de Scott-Knott em três grupos (Tabela 7). O isolado do gênero *Penicillium* apresentou o maior índice enzimático (IE= 2,35), diferindo estatisticamente dos demais microrganismos positivos para atividade de pectinase.

4.7.3 Produção de protease

A capacidade dos microrganismos de produzir enzima protease foi avaliada pela presença de um halo incolor em torno das colônias (Figura 7). Do total de quatorze isolados testados, somente três isolados pertencentes aos gêneros *Cândida* (IGN36), *Achromobacter* (ISD04) e *Aspergillus* (IPR24) apresentaram resultados negativos para a produção de protease.



Figura 7 - Formação de halo indicativo da produção da enzima protease pelos isolados em meio contendo leite desnatado.

Os demais isolados com atividade proteolítica foram separados em dois grupos de acordo com cada índice enzimático (Tabela 7). O isolado CT01 (*Penicillium* sp.) apresentou o maior valor de IE (2,02), sendo estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) dos valores de IE do restante dos microrganismos produtores de protease.

4.7.4 Produção de lipase

Para avaliação da produção da enzima lipase pelos isolados, após o crescimento microbiano foi observada a formação de um halo de coloração azul ao redor da colônia quando as placas foram submetidas à luz UV (Figura 8).

Somente um isolado *Pseudomonas aeruginosa* (IPR45) apresentou atividade positiva de degradação de lipídeo em meio de cultura específico, com índice enzimático de 2,30 (Tabela 7).

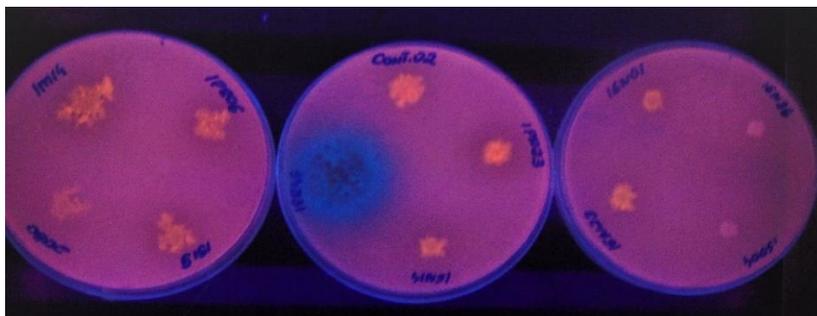


Figura 8 - Formação de halo indicativo da produção da enzima lipase pelos isolados em meio contendo óleo de oliva.

Tabela 7 - Índice enzimático (IE) de celulase, pectinase, protease e lipase obtido pelos isolados selecionados no teste de antagonismo contra *Fusarium verticillioides*.

Isolado	Identificação	Índice enzimático*			
		Celulase	Pectinase	Protease	Lipase
CT01	<i>Penicillium</i> sp.	1,65 c	2,35 c	2,02 b	0,00
IGN36	<i>Candida intermedia</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
IPR24	<i>Aspergillus flavus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
ISD04	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
2080	<i>Bacillus</i> sp.	1,85 d	1,86 b	1,29 a	0,00
IM14	<i>Bacillus</i> sp.	1,40 b	1,91 b	1,31 a	0,00
1919	<i>Burkholderia cepacia</i>	1,26 a	1,74 a	1,32 a	0,00
IPR23	<i>Achromobacter insuavis</i>	1,74 d	2,03 b	1,44 a	0,00
IGN23	<i>Bacillus</i> sp.	1,52 c	1,80 a	1,36 a	0,00
IGN01	<i>Bacillus</i> sp.	1,62 c	1,83 a	1,25 a	0,00
IGN14	<i>Bacillus</i> sp.	1,23 a	1,95 b	1,47 a	0,00
IPR06	<i>Bacillus</i> sp.	1,27 a	1,73 a	1,41 a	0,00
IPR45	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,00	0,00	1,46 a	2,30
CT02	<i>Bacillus</i> sp.	1,66 c	1,88 b	1,55 a	0,00

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os resultados da avaliação da produção de enzimas líticas mostraram que dos quatorze isolados que foram mais eficientes na inibição do crescimento de *F.verticillioides*, onze isolados produziram pelo menos uma das enzimas líticas, sendo que 78% dos microrganismos foram capazes de produzir protease, 71% de celulase e pectinase, e somente um isolado (7%) apresentou atividade lipolítica. A maioria dos isolados avaliados (71%) produziram três das quatro enzimas extracelulares (celulase, pectinase e protease). Essa capacidade de produzir diferentes enzimas confere ao microrganismo maior vantagem no biocontrole, pois significa que eles possuem um maior espectro de ação no controle dos fungos fitopatogênicos (Nielsen e Soresnsen, 1997).

As enzimas líticas produzidas por microrganismos desempenham um papel importante não somente na degradação da matéria orgânica e no aumento do crescimento vegetal, mas também agem na redução de doenças, pois podem enfraquecer ou degradar constituintes das paredes celulares e membranas de fungos, levando-os à morte (Kavamura et al., 2013). A parede celular da maioria dos patógenos fúngicos consiste de polímeros como quitina, glucana, proteínas, celulose e lipídios (Bartnicki-García, 1968). Entre uma variedade de

enzimas hidrolíticas produzidas pelos antagonistas, as quitinases, celulasas, proteases e lipases são de grande interesse, pois, estão diretamente relacionadas à atividade de biocontrole (Duo-Chuan et al., 2005). Além disso, as enzimas extracelulares produzidas podem agir desencadeando respostas de defesa das plantas, que é considerado outro mecanismo de ação dos antagonistas. Isso ocorre quando microrganismos endofíticos produzem principalmente celulase e pectinase como uma forma de penetração ativa na planta hospedeira.

A produção de enzimas hidrolíticas é um importante mecanismo de ação utilizado pelos agentes de biocontrole que está relacionado ao micoparasitismo (Harman, 2000). A relação entre o antagonista e o fitopatógeno é caracterizada por um período relativamente longo de contato, em que o parasita obtém todo ou parte de seu alimento do hospedeiro, através da digestão de estruturas celulares pela atuação de enzimas hidrolíticas como quitinases, proteases, glucanases e lipases (Bettiol, 1991). Além disso, a produção de protease pelos antagonistas pode ser relacionada a outro mecanismo de atuação e envolve a inativação de enzimas do fitopatógeno que são responsáveis pela destruição da parede celular da planta e permite sua infecção. Em um trabalho de Harman (2000), estudando os mecanismos de biocontrole de *Trichoderma harziaanum* sobre *Botrytis cinerea*, o autor descreve a atuação de proteases produzidas pelo antagonista sobre enzimas pectinolíticas, cutinolíticas e celulolíticas responsáveis pela infecção do patógeno na planta.

Isolados das espécies *Bacillus* têm apresentado grande capacidade de antagonismo no controle de *Fusarium verticillioides* em milho e grande parte dessa atividade se deve à produção de enzimas extracelulares. Em um trabalho Lizárraga-Sánchez et al. (2015) e Figueroa-López et al. (2016), a inoculação desses isolados em plantas provocou uma redução da gravidade da podridão-do-colmo e da espiga e diminuição dos níveis de fumonisina nos grãos. Os testes *in vitro* revelaram o potencial dessas espécies em produzir glucanases, proteases, e quitinases indicando serem esses os prováveis mecanismos de inibição.

Nesse trabalho, somente um isolado identificado como *Pseudomonas aeruginosa* apresentou resultado positivo para a atividade lipolítica com índice enzimático de 2,30. Diferentes trabalhos têm mostrado que espécies de *Pseudomonas* são grandes produtoras de enzimas lipases. Em um trabalho de Poritsanos et al. (2006) foi confirmado o potencial desse gênero de produzir lipases e proteases que foram associadas à atividade de biocontrole. No estudo de Pliego et al. (2007) foi demonstrada produção de exoenzimas como protease e lipase em três bactérias com grande potencial de biocontrole, sendo que duas espécies são pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (*P. putida* e *P. pseudoalcaligenes*).

As enzimas hidrolíticas são amplamente disseminadas na natureza e os microrganismos são a fonte preferida dessas enzimas, em razão do seu rápido crescimento, fácil cultivo e facilidade de manipulação genética, que permite a obtenção de enzimas com propriedades desejadas para aplicações específicas (Beg e Gupta, 2003). Muitos processos industriais utilizam catalizadores enzimáticos para aumentar a velocidade das reações químicas, possibilitando o desenvolvimento de métodos tecnológicos tão eficientes quanto aos realizados pela natureza (Hasan et al., 2006). A utilização de enzimas de origem microbiana na indústria possui vantagens sobre as de origem vegetal e animal, pois elas possuem um menor custo de produção e possibilidade de produção em larga escala. A pesquisa de novas fontes microbianas é de grande interesse, pois garante o suprimento de enzimas aos mais variados processos empregados pela indústria. Além de possuir um papel importante como um mecanismo de ação dos antagonistas, as enzimas líticas avaliadas nesse trabalho poderão ser avaliadas futuramente quanto o seu potencial em aplicações biotecnológicas.

4.8 Incidência de *Fusarium verticillioides* nas sementes tratadas com os isolados

O teste que avaliou a inibição de *F. verticillioides* nas sementes de milho mostrou elevada incidência do patógeno na testemunha que foi inoculada com a suspensão de esporos e não recebeu nenhum tratamento com os isolados (Figura 9B). Nenhum crescimento micelial foi observado no tratamento controle com as sementes que foram desinfectadas e não foram inoculadas com a suspensão de esporos (Figura 9A), comprovando a eficiência da técnica utilizada (Tabela 8).

Em relação ao tratamento com os agentes de biocontrole, os resultados mostraram que o isolado IPR45 (*Pseudomonas aeruginosa*) inibiu de forma eficaz o aparecimento do fitopatógeno nas sementes, indicando a ação antifúngica dessa bactéria (Figura 9C). Os demais isolados não apresentaram capacidade de inibir o crescimento de *F. verticillioides* nas sementes (Tabela 8), apresentando incidência similar à observada na testemunha.

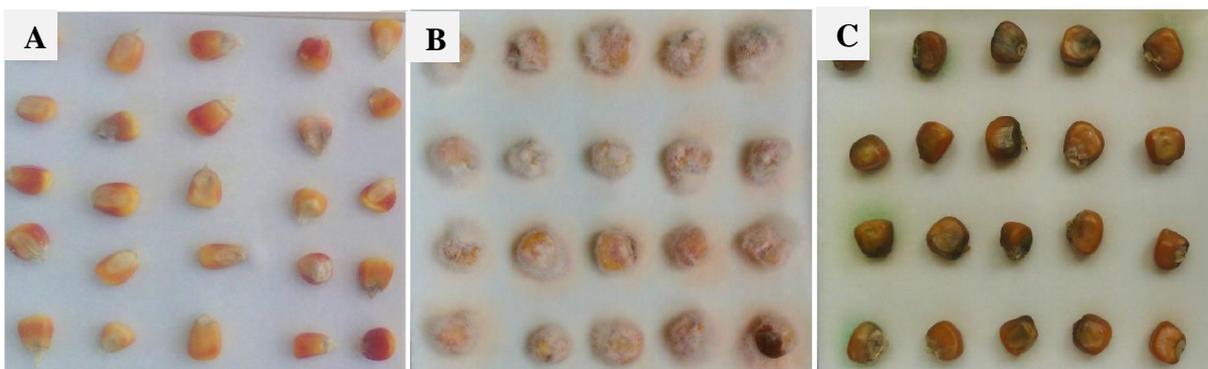


Figura 9 - Incidência de *Fusarium verticillioides* nas sementes de milho que foram desinfetadas e não foram inoculadas com a suspensão de esporos (A), nas sementes que foram inoculadas com o fitopatógeno e não receberam tratamento (B) e nas sementes que receberam o tratamento com *Pseudomonas aeruginosa* (C).

Tabela 8 - Avaliação da capacidade dos isolados em inibir o crescimento de *Fusarium verticillioides* nas sementes em relação ao controle contendo sementes inoculadas somente com *Fusarium verticillioides*.

Isolado	Identificação	Inibição do crescimento (%)
CT01	<i>Penicillium</i> sp.	0
IGN36	<i>Candida intermedia</i>	0
IPR24	<i>Aspergillus flavus</i>	0
ISD04	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0
2080	<i>Bacillus</i> sp.	0
IM14	<i>Bacillus</i> sp.	0
1919	<i>Burkholderia cepacia</i>	0
IPR23	<i>Achromobacter insuavis</i>	0
IGN23	<i>Bacillus</i> sp.	0
IGN01	<i>Bacillus</i> sp.	0
IGN14	<i>Bacillus</i> sp.	0
IPR06	<i>Bacillus</i> sp.	0
IPR45	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
CT02	<i>Bacillus</i> sp.	0
Controle1*	-	100
Controle2**	-	0

*Controle contendo sementes desinfetadas e sem suspensão de esporos de *Fusarium verticillioides*.

**Controle contendo sementes inoculadas com *F. verticillioides* e sem tratamento com os isolados.

No ensaio que avaliou a capacidade dos isolados de produzir compostos antifúngicos, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (IPR45) apresentou grande capacidade de produção de metabólitos, inibindo o crescimento de *F. verticillioides* em 72,8% (Tabela 5) por esse mecanismo de ação. Além disso, quando foi avaliado o efeito desses metabólitos na germinação de conídios, o filtrado do isolado IPR45 foi o único que inibiu 100% a germinação e reduziu o número de conídios na solução, o que foi descrito como resultado da produção de antibióticos pela bactéria. No teste de produção de enzimas extracelulares, *Pseudomonas aeruginosa* foi o único isolado que apresentou atividade lipolítica. Além disso, num experimento preliminar, esse mesmo isolado produziu compostos voláteis que reduziram significativamente o crescimento de *F. verticillioides in vitro* (dados não mostrados). Os resultados positivos dos diferentes testes podem indicar que o isolado atua por diferentes mecanismos de ação que foram efetivos na redução do fitopatógeno nas sementes.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são frequentemente encontradas no solo e têm sido usadas efetivamente como agentes de biocontrole ao longo dos anos (Akhtar et al., 2010). Estas bactérias apresentam crescimento rápido e são boas colonizadoras. Sua atividade de biocontrole é reproduzível na rizosfera de diferentes culturas e aplicável contra várias doenças de plantas. Além disso, colonizam com alta densidade, competem com sucesso com outros microrganismos na rizosfera e produzem metabólitos secundários com forte atividade antifúngica (Bhattacharyya e Jha, 2012). Além de atuarem como agente de biocontrole, espécies do gênero *Pseudomonas* são bem estudadas quanto o seu potencial de promover o desenvolvimento das plantas, por causa principalmente da capacidade de produzir sideróforos e hormônios de crescimento vegetal. Estas características podem sugerir que o isolado encontrado neste estudo (*Pseudomonas aeruginosa* IPR45) possui o “estilo de vida” endofítico e atua como promotor de crescimento de plantas e agente de biocontrole.

Em um trabalho de Islam et al. (2014) foi mostrado que *Pseudomonas aeruginosa* apresenta a capacidade de melhorar o crescimento vegetal mesmo em solos contendo metais pesados, uma vez que essa espécie é altamente resistente a zinco, cobre e chumbo. A inoculação das sementes de trigo com essa bactéria melhorou a absorção de P e N, aumentou a clorofila foliar, a produção total de proteína solúvel e biomassa vegetal em plantas cultivadas em solos com alta concentração de zinco.

O tratamento de sementes com bactérias antagonistas tem se mostrado uma técnica eficiente para introduzir os agentes no sistema solo-planta e facilitar suas atividades de biocontrole (Correa et al., 2009). Essa técnica é utilizada principalmente com o intuito de

permitir a germinação das sementes infectadas, controlar os patógenos transmitidos pelas sementes e proteger as sementes dos fungos do solo (Henning et al., 1994).

A microbiolização de sementes de milho com bactérias do gênero *Bacillus* sp. tem sido eficiente para a redução da incidência e da gravidade da doença causada por *F. verticillioides* em milho (Lizárraga-Sánchez et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que uma única aplicação do inóculo bacteriano nas sementes foi suficiente para proteger a cultura durante todo o ciclo da planta e sob diferentes condições de infecção do fitopatógeno (infecção natural e inoculação no solo).

A microbiolização das sementes com o isolado IPR45 (*Pseudomonas aeruginosa*) realizado nesse estudo indica ser um tratamento eficiente para reduzir a incidência de *F. verticillioides*. Novos testes em milho em condições de campo poderão confirmar o potencial desse isolado em suprimir a infecção pelo fitopatógeno durante o crescimento da cultura e avaliar o potencial dessa espécie na promoção de crescimento vegetal.

4.9 Efeito do tratamento de sementes com os isolados na redução da podridão-do-colmo

A podridão-do-colmo foi medida em porcentagem da severidade de acordo com a escala de Nicoli et al. (2015) após 45 dias da inoculação com *F. verticillioides*, tempo necessário para ocorrer a infecção pelo fitopatógeno. Foram avaliadas lesões de coloração marrom característica da podridão causada por *F. verticillioides*. Nas sementes tratadas somente com os isolados sem a inoculação de *F. verticillioides* não foram observados sintomas da doença nos colmos das plantas (dados não mostrados).

A Tabela 9 mostra a severidade da doença observada em cada tratamento e o efeito dos isolados no percentual de redução da podridão-do-colmo. Os resultados mostraram que a severidade diminuiu significativamente quando foi utilizado o tratamento das sementes com o isolado ISD04 (*Achromobacter xylosoxidans*), ocorrendo uma redução de 72,6% da podridão-do-colmo em relação ao controle que foi inoculado com *F. verticillioides* e não recebeu nenhum tratamento (Figura 10C).

Tabela 9 - Efeito do tratamento de sementes com quatro isolados bacterianos na redução da severidade da podridão-do-colmo 45 dias após a inoculação de *Fusarium verticillioides* em condições de casa de vegetação.

Híbrido	Tratamentos	Severidade da doença (%) [*]	Redução da podridão (%)
BRS1010	Controle não inoculado	6,02 a	-
	Controle + <i>F. verticillioides</i>	38,06 c	0
	<i>Achromobacter</i> sp. + <i>F. verticillioides</i>	10,40 a	72,67
	<i>Pseudomonas</i> sp. + <i>F. verticillioides</i>	18,75 b	50,73
	<i>Bacillus</i> sp. + <i>F. verticillioides</i>	50,05 c	0
	<i>Bacillus</i> sp. + <i>F. verticillioides</i>	25,57 b	32,81

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

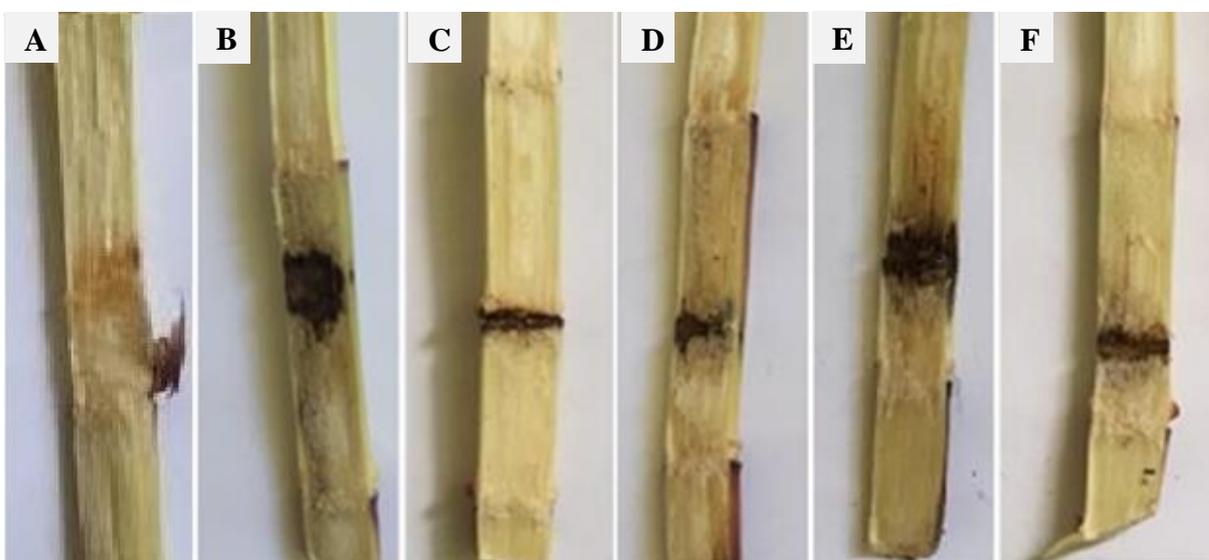


Figura 10 - Efeito do tratamento de sementes com os isolados na podridão-do-colmo causada por *Fusarium verticillioides*. (A) Controle não inoculado (B) Controle + *F. verticillioides* (C) *Achromobacter* + *F. verticillioides* (D) *Pseudomonas* + *F. verticillioides* (E) *Bacillus* sp. + *F. verticillioides* (F) *Bacillus* sp. + *F. verticillioides*.

O tratamento com o isolado ISD04 (*Achromobacter xylosoxidans*) foi o único em que a severidade da doença foi estatisticamente igual ao controle que não foi inoculado com *F. verticillioides*. Os resultados obtidos nos testes feitos anteriormente indicam que o principal mecanismo de atuação desse microrganismo é a competição por espaço e/ou nutrientes. Por exemplo, no teste de confronto direto entre as culturas, esse isolado não apresentou zona limpa em torno da colônia (Figura 1B), ao contrário dos outros três isolados que foram testados na planta. No mesmo teste, esse isolado se destacou como agente antagonista apresentando 100% de inibição do crescimento de *F. verticillioides* e foi caracterizado como endofítico (Tabela 4). O isolado ISD04 não foi produtor de enzimas extracelulares (Tabela 7) e não se destacou como grande produtor de metabólitos no meio líquido (Tabela 5). Isso

indica que provavelmente o mecanismo de atuação não é a produção de enzimas extracelulares ou compostos antimicrobianos, o que o torna diferente dos demais isolados avaliados *in vivo* e que pode ter influenciado no resultado do teste em plantas.

Os isolados IPR45 e CT02 reduziram a podridão-do-colmo em 50,73% e 32,81%, respectivamente, e apresentaram severidade menor que a obtida no controle inoculado somente com *F. verticillioides*.

O isolado IM14 não apresentou diferença estatística na diminuição da severidade em relação a nenhum controle (Tabela 9), apesar dos bons resultados *in vitro* obtidos por esse isolado. Neste caso, os resultados positivos obtidos em laboratório não apresentaram a mesma eficiência quando em condições de casa de vegetação, na planta de milho. Essa desigualdade entre os resultados pode estar relacionada ao fato de que o controle da doença pelos microrganismos introduzidos é dinâmico e inclui ciclos como a sobrevivência, o estabelecimento e a atividade de antagonismo dos isolados. O sucesso do controle muitas vezes depende da disponibilidade de nutrientes fornecidos pela semente ou pela planta que é determinante para o crescimento, desenvolvimento, colonização interna do colmo e atividade metabólica dos microrganismos (Thomashow e Weller, 1996). Além disso, outros fatores como a produção de exsudatos pela planta hospedeira podem atuar sobre os isolados reduzindo sua eficiência na colonização (Fan et al., 2012). O fato deste isolado ser realmente de estilo de vida endofítico precisa também ser averiguado, ou seja, a efetividade da colonização endofítica para a competição com o patógeno no colmo *in vivo*, deve ser considerada neste caso.

Alguns autores relatam que as atividades de metabólitos *in vitro* geralmente não se correlacionam com as atividades de biocontrole *in vivo* (Fravel, 1988). Isso ocorre porque a aplicação direta dos isolados vivos nas sementes requer que esses microrganismos se estabeleçam na planta e que produzam os mesmos metabólitos que os obtidos em laboratório, o que nem sempre acontece. Técnicas de aplicação direta do filtrado no lugar das células vivas por exemplo, não exigem a colonização dos tecidos vegetais pelo isolados e eliminam fatores externos que podem diminuir a eficiência de controle desses microrganismos (Chan et al., 2003). Os resultados dos testes feitos anteriormente mostram que os isolados (IM14, CT.02 e IPR45) são bons produtores de metabólitos antimicrobianos e enzimas extracelulares que provavelmente são os seus principais mecanismos de ação contra *F. verticillioides*. Dessa forma, outras técnicas de aplicação em campo utilizando os metabólitos desses isolados poderão fornecer um controle mais efetivo da doença.

5 CONCLUSÕES

- No teste de confronto direto em meio sólido, 83% dos microrganismos isolados de estigma de milho apresentaram potencial de inibição de *Fusarium verticillioides*.
- Os microrganismos mais eficientes na inibição *in vitro* do crescimento de *F. verticillioides* pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Penicilium*, *Candida* e *Aspergillus*, predominando o gênero *Bacillus*.
- Dos quatorze isolados mais eficientes na inibição *in vitro* do crescimento de *F. verticillioides*, treze isolados produzem metabólitos antifúngicos em meio líquido, indicando que esse pode ser o seu principal mecanismo de inibição.
- Os metabólitos produzidos pelos isolados apresentam efeito inibitório na germinação de conídios e no crescimento normal das hifas de *F. verticillioides*.
- Dos isolados mais eficientes, 78% produziram pelo menos uma das enzimas hidrolíticas avaliadas.
- O tratamento das sementes de milho com o isolado IPR45, espécie *Pseudomonas aeruginosa*, é eficiente para impedir o aparecimento do fitopatógeno *in vitro*.
- O tratamento de sementes com os isolados *Achromobacter* sp. (ISD04), *Pseudomonas* sp. (IPR45) e *Bacillus* sp. (CT02) foi eficiente na redução da podridão-do-colmo em plantas de milho, crescidas sob condições de casa de vegetação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, M. S.; SHAKEEL, U.; SIDDIQUI, Z.A. Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil. **Turkish Journal of Biology**, v. 3, p. 1-7, 2010.

ALMEIDA, A. P.; CORRÊA B.; MALLOZZI, M. A. B.; SAWASAKI, E.; ORTEGA E. M. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 321-326, 2000.

ALVES, E. N. T. D.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, C. A.; COSTA, R. V.; COTA, L.V.; SILVA, D. D.; MATTOS, B. B.; VERDOLIN, A. L. G. **Seleção de Microrganismos Antagonistas para Biocontrole de *Fusarium verticillioides* na Cultura do Milho (*Zea mays L.*)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013, 26 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 75).

AMPRAYAN, K.; ROSE, M. T.; KECSKÉS, M.; PEREG, L.; NGUYEN, H.T.; KENNEDY, I. R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis HY*) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v.61, p. 295-299, 2012.

AMSTALDEN, A. C. **A produção e comercialização do milho: A influência do custo logístico**. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Departamento de Economia, Administração e Sociologia, 2013. 22p.

ANTONISSEN, G.; MARTEL, A.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; VERBRUGGHE, E.; VANDENBROUCKE, V.; LI, S.; HAESBROUCK, F.; VAN IMMERSSEEL, F.; CROUBELS, S. The impact of *Fusarium* mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. **Toxins**, v.6, p. 430-452, 2014.

ARSENEAULT, T.; FILION, M. Biocontrol through antibiosis: Exploring the role played by subinhibitory concentrations of antibiotics in soil and their impact on plant pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.39, p. 267-274, 2017.

BACON, C. W.; NELSON, P. E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, p. 514-521, 1994.

BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON, D. M.; MEREDITH, F. Biological Control of *Fusarium moniliforme* in Maize. **Environmental Health Perspectives**, v.109, p. 325-332, 2011.

BARTNICKI-GARCÍA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 22, p. 87-108, 1968.

BEG, Q. K.; GUPTA, R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. **Enz Microb Technol**, v. 32, p. 294-304, 2003.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília, Embrapa, 1991. p.1-5.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (3Ed.). **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres. 1995. p. 717- 728.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327-1350, 2012.

BORAH, S. N.; DEKA, S.; SARMA, H. K. First report of *Fusarium verticillioides* causing stalk rot of maize in Assam, India. **Plant Disease**, v.100, p. 1501, 2016a.

BORAH, S. N.; GOSWAMI, D.; SARMA, H. K.; CAMEOTRA, S. S.; DEKA, S. Rhamnolipid Biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to Control Stalk and Ear Rot Disease of Maize. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 2016b.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, p. 229-239, 2010.

BRESSAN, W.; FIGUEIREDO, J. E. F. **Controle de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho por actinomicetos**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003, 4p. (Comunicado Técnico, 65).

BRITO, A. H.; PINHO, R. G. V.; PEREIRA, J. L. A. R.; BALESTRE, M. Controle químico da cercosporiose, mancha-branca e grãos ardidos em milho. **Revista Ceres**, v. 60, n.5, p. 629-635, 2013.

BULGARI, D.; CASATI, P.; BRUSETTI, L.; QUAGLINO, F.; BRASCA, M.; DAFFONCHIO, D.; BIANCO, P. A. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. **The Journal of Microbiology**, v.47, p.393- 401, 2009.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279p.

CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and in planta test. **European Journal of Plant Pathology**, v.117, p. 237-246, 2007.

CARISSIMI, M. **Estudo da Atividade antifúngica de *Bacillus* E164 contra *Bipolaris sorokiniana***. 2006. 81p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CAVAGLIERI, L.; PASSONE, A.; ETCHEVERRY, M. Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 747-754, 2004.

CENDOYA, E.; MONGE, M. P.; PALACIOS, S. A.; CHIACCHIERA, S. M.; TORRES, A. M.; FARNOCHI, M. C.; RAMIREZ, M. L. Fumonisin occurrence in naturally contaminated wheat grain harvested in Argentina. **Food Control**, v.37, p. 56-61, 2014.

CHAN, Y. K.; MCCORMICK, W. A.; SEIFERT, K. A. Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 253-262, 2003.

CHARAN, A. R.; REDDY, V. P.; REDDY, P. N.; REDDY, S.S. Assessment of genetic diversity in *Pseudomonas fluorescens* using PCR-based methods. **Bioremediation Biodiversity and Bioavailability**, v. 5, p. 10-16, 2011.

CHRISTENSEN, C. M.; SAUER, D. B. Microflora. In: CHRISTENSEN, C. M. **Storage of cereal grains and their products**. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists. 1982. p. 219-240.

CHU, F. S.; LI, G. Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy maize collected from People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 847-852, 1994.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Safra 2016/17: Décimo segundo levantamento: setembro 2017**. Brasília, 2017. 158p. Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_09_12_10_14_36_boletim_graos_setembro_2017.pdf>.
Acesso em: dez. 2017.

CORREA, O. S.; MONTECCHIA, M. S.; BERTI, M. F.; FERNÁNDEZ FERRARI, M. C.; PUCHEU, N. L.; KERBER, N. L.; GARCIA, A. F. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 41, p. 185-194, 2009.

COTA, L. V.; COSTA, R. V.; SÁBATO, E. O.; SILVA, D. D. **Histórico e perspectivas das doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. p.7. (Circular técnica, 193).

DANIELS, B. A. Elimination of *Fusarium moniliforme* from corn seed. **Plant Disease**, v. 67, p. 609-611, 1983.

DEACON, J. W. **Introduction to modern mycology**. London: Blackwell Scie Publi, 1980. 197p.

DESJARDINS, A. E. ***Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology**. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 2006.

DUARTE, J. O. Introdução e importância econômica do milho. In: CRUZ, J. C; VERSIANI, R. P.; FERREIRA, M. T. R. **Cultivo do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2000. (Sistemas de Produção, 1).

DUARTE, R. P.; JULIAATTI, F. C.; LUCAS, B. V.; FREITAS, P. T. Comportamento de diferentes genótipos de milho com aplicação foliar de fungicida quanto à incidência de fungos causadores de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.25, n.4, p. 112-122, 2009.

DUFFY, B. K.; DÉFAGO, G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2429-2438, 1999.

DUNLAP, C. A.; KIM, S. J.; KWON, S. W.; ROONEY, A. P. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 1212–1217, 2016.

DUO-CHUAN, L. I.; CHEN, S.; JING, L. Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Tararomyces flavus*. **Mycopathologia**, v. 159, p. 223-229, 2005.

DUVICK, J. Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 337-342, 2001.

ELSHAFIE, H. S.; CAMELE, I.; RACIOPPI, R.; SCRANO, L.; IACOBELLIS, N. S.; BUFO, S. A. *In vitro* antifungal activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* against some phytopathogenic fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13 (12), p. 16291-16302, 2012.

FAN, B.; CARVALHAIS, L. C.; BECKER, A.; FEDOSEVENKO, D.; VON WIREN, N.; BORRIS, R. Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. **BMC Microbiology** 12, v. 116, p. 1471-2180, 2012.

FANTAZZINI, T. B. **Desempenho de sementes e expressão gênica da interação *Fusarium verticillioides* e milho**. 2014. 84p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FERREIRA, D. F. SISVAR - **Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FIGUEIRA, E. L. Z.; COELHO, A. R.; ONO, E. Y. S.; HIROOKA, E. Y. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n.2, p. 359-378, 2003.

FIGUEROA-LÓPEZ, A. M.; CORDERO-RAMÍREZ, J. D.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. C.; LÓPEZ-MEYER, M.; LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ, G. J.; FÉLIX-GASTÉLUM, R.; CASTRO-MARTÍNEZ, C.; MENDOZA- MALDONADO, I. E. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. **Springer Plus**, 5: 330, 2016.

FRAVEL, D. R. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 75-91, 1988.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48 p. (Documentos, 110).

GHINI, R. Integração do controle biológico com outros métodos de controle de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991. 388p. (Documentos, 15).

GILLICAN, C. A. Sustainable agriculture and plant diseases: An epidemiological perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 27, p. 741-756, 2008.

GONG, A. D.; LI, H. P.; YUAN, Q. S.; SONG, X. S.; YAO, W.; HE, W. J.; ZHANG, J. B.; LIAO, Y. C. Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*. **Plos ONE**, 10(2), e0116871, 2015.

GRAÇAS, J. P.; RIBEIRO, C.; COELHO, F. A. A.; CARVALHO, M. E. A.; CASTRO, P. R. C. **Microrganismos estimulantes na agricultura**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2015, 56p.

GUNJAL, A. B.; KAPADNIS, B. P. *Burkholderia gladioli*, an endophyte with plant growth promoting potential. **Journal of chemo and biosphere**, p. 43-53, 2013.

GUNJI, S.; ARIMA, K.; BEPPU, T. 1. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, p. 2061-2069, 1983.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; NATARAJAN, M.; REDDY, P. M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p. 2634-2645, 2001.

HAAS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p.117-53, 2003.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R.; ABONYI, T.; BATA, Á. Decontamination of mycotoxin containing food and feed by biodegradation. **Food Reviews International**, New York, v. 25, p. 284-298, 2009.

HANDELSMAN, J.; STABB, E. Y. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **The Plant Cell**, Rockville, US, v. 8, p. 1855-1869, 1996.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, p. 376-393, 2000.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 235-251, 2006.

HENNING, A. A.; CATTELAN, A. J.; KRZYZANOWSKI, F. C.; NETO, J. B. F.; COSTA, N. P. **Tratamento e inoculação de sementes de soja**. Londrina: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Soja, 1994. 6p. (Comunicado Técnico, 54).

HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, A.; HEYDRICH-PÉREZ, M.; ACEBO-GUERRERO. Y.; VELAZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; HERNANDEZ-LAUZARDO, A. N. Antagonistic

activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) in maize (*Zea mays* L.). **Applied Soil Ecology**, v. 39, p. 180-186, 2008.

HODKINSON, B. P.; LUTZONI, F. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. **Symbiosis**, v. 49, p. 163-180, 2009.

IMAMURA, N.; MOTOIKE, I.; NODA, M.; ADACHI, K.; KONNO, A.; FUKAMI, H. Argimicin A, a novel anti-ayanobacterial compound produced by an algae-lysing bacterium. **The Journal of antibiotics**, v. 53, n.11, p. 1317-1319, 2000.

ISLAM, F.; YASMEEN, T.; ALI, Q.; ALI, S.; ARIF, M.S.; HUSSAIN, S.; RIZVI, H. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 285-293, 2014.

JEFFRIES, P.; YOUNG, T. W. K. **Interfungal parasitic relationships**. Wallingford, Oxon UK: CAB International, 1994.

JOHNSTON-MONJE, D.; RAIZADA, M. N. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. **Plos One**, 6(6): e20396, 2011.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; AVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, p. 183-191, 2013.

KHAN, A. R.; PARK, G. S.; ASAF, S.; HONG, S. J.; JUNG, B. K.; SHIN, J. H. Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. **Plos One**, 12 (2): e0171534, 2017.

KIM, K.; LEE, Y.; HA, A.; KIM, JI-IN; PARK, A. R.; YU, N. H.; SON, H.; CHOI, G. J.; PARK, H. W.; LEE, C. W.; LEE, T.; LEE, Y. W.; KIM, J. C. Chemosensitization of *Fusarium graminearum* to Chemical Fungicides Using Cyclic Lipopeptides Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Strain JCK-12. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.

KIM, K. J.; YANG, Y. J.; KIM, J. G. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p.185-189, 2003.

LANZA, F. E.; FIGUEIREDO, J. E. F.; COSTA, R. V.; MOURA, L. O. MARCONDES, M. M.; SILVA, D. D.; COTA, L. V.; CORRÊA, C. L.; NICOLI, A. N.; RAMOS, T. C. D. A. Efeito do tratamento de sementes com o biofungicida bacteriano CNPMS22 na sobrevivência e desenvolvimento de plantas de milho em solo infestado com *Fusarium verticillioides*. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29, 2012, Águas de Lindóia. **Anais**. Campinas: Instituto Agrônomo, Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012. p. 555-562.

LANZA, F. E.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, R. V.; FIGUEIREDO, J. E. F.; SILVA, D. D.; QUEIROZ, V. A. V.; GUIMARÃES, E. A.; COTA, L. V. Symptomatological aspects associated with fungal incidence and fumonisin levels in corn kernels. **Tropical plant pathology**, v. 42, p. 304-308, 2017.

LANZA, F. E.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, R. V.; QUEIROZ, V. A. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; SOUZA, A. G. C.; FIGUEIREDO, J. E. F. Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. **Crop Protection**, v. 65, p. 232-237, 2014.

LI, X.; QUAN, C. S.; YU, H. Y.; HUA, WANG, J. H.; FAN, S. D. Assessment of antifungal effects of a novel compound from *Burkholderia cepacia* against *Fusarium solani* by fluorescent staining. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 151-154, 2009.

LIAN, B.; WANG, B.; PAN, M.; LIU, C.; TENG, H. H. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 72, p. 87-98, 2008.

LINS, J. L. F.; SILVA, J. M.; SILVA, L. P.; SANTOS, T. M. C.; SANTOS, E. L. Ocorrência de fungos de campo e armazenamento em ingredientes e rações para suínos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n.2, p. 14-20, 2014.

LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ, G. J.; LEYVA-MADRIGAL, K. Y.; SÁNCHEZ-PEÑA, P.; QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; MALDONADO-MENDOZA, I. E. *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 controls maize stalk and ear rot in Sinaloa, Mexico. **Field Crops Research**, v. 176, p. 11-21, 2015.

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

MAKUN, H. A.; ANJORIN, S. T.; MORONFOYE, B.; ADEJO, F. O.; AFOLABI, O.A.; FAGBAYIBO, G.; BALOGUN, B. O.; SURAJUDEEN, A. A. Fungal and aflatoxin contamination of some human food commodities in Nigeria. **African Journal of Food Science**, v. 4, p. 127-135, 2010.

MARCIA, B. A.; LAZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18(4), p. 363-367, 1998.

MATTOSO, M. J.; FILHO, G. A. M. **Cultivo do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. 8p. (Sistema de Produção, 2).

MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2001. 368p.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000, 295 p.

MILIUTE, I.; BUZAITE, O.; BANIULIS, D.; STANYS, V. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. **Zemdirbyste-Agriculture**, v. 102, p. 465-478, 2015.

MINERDI, D.; FANI, R.; GALLO, R.; BOARINO, A.; BONFANTE, P. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 725-732, 2001.

- MORETTI, M.; GILARD, G.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Biological Control Potential of *Achromobacter xylosoxydans* for Suppressing *Fusarium* wilt of Tomato. **International Journal of Botany**, v. 4, p. 369-375, 2008.
- MOTA, M. S.; GOMES, C. B.; JÚNIOR, I. T. S.; MOURA, A. B. Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 62-70, 2017.
- MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v. 81, p. 556-564, 1997.
- MUNKVOLD, G. P.; MCGEE, D. C.; CARLTON, W. M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, v.87, n.2, p. 209-217, 1997.
- NGUYEN, P. A.; STRUB, C.; DURAND, N.; ALTER, P.; FONTANA, A. SCHORR-GALINDO, S. Biocontrol of *Fusarium verticillioides* using organic amendments and their actinomycete isolates. **Biological control**, v. 118, p. 55-66, 2017.
- NICOLI, A. N.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; ZAMBOLIM, L.; LANZA, F. E.; GUIMARÃES, D. P.; LANDAU, E. C. Diagrammatic scale validation to quantify the severity of anthracnose stalk in corn. **Ciência Rural**, v.45, p.1720-1726, 2015.
- NIELSEN, P.; SORENSEN. Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, p. 183-192, 1997.
- OERKE, E. C. Centenary review: crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.144, p. 31-43, 2006.
- ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v.16, p. 115-125, 2008.
- ONO, E. Y.; SUGIURA, Y.; HOMECHIM, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Parana, Brazil. **Mycopathologia**, v. 147, p. 139-148, 1999.
- OREN, L.; EZRATI, S.; COHEN, D.; SHARON, A. Early events in the *Fusarium verticillioides* maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1695-1701, 2003.
- PAES, M. C. D. **Aspectos físicos químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6p. (Circular Técnica, 75).
- PALAZZINI, J. M.; DUNLAP, C. A.; BOWMAN, M. J.; CHULZE, S. N. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. **Microbiological Research**, v. 192, p. 30-36, 2016.

PALUMBO, J. D.; O'KEEFFE, T. L.; ABBAS, H. K. Isolation of maize soil and rhizosphere bacteria with antagonistic activity against *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Journal of Food Protection**, v. 70, p.1615-21, 2007.

PASSARI, A. K.; LALSAMTHARI, P. C.; ZOTHANPUIA; LEO, V. V.; MISHRA, V. K.; YADAV, M. K.; GUPTA, V. K.; SING, B. P. Biocontrol of *Fusarium* wilt of *Capsicum annuum* by rhizospheric bacteria isolated from turmeric endowed with plant growth promotion and disease suppression potential. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1-16, 2017.

PEZZINI, V.; VALDUGA, E.; CANSIANI, R. L. Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64(1), p. 91-6, 2005.

PINTO, N. F. J. DE A. **Grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005, 6p. (Circular Técnica, 66).

PLIEGO, C.; CAZORLA, F. M.; GONZALÉZ-SÁNCHEZ, M. A.; PÉREZ-JIMÉNEZ, R. M.; DE VICENTE, A.; RAMOS, C. Selection for biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. **Research in Microbiology**, v.158, p. 463-470, 2007.

POMERANZ, Y. Biochemical, functional and nutritive changes during storage. In: D. B. SAUER (Ed.). **Storage of cereal grains and their products**. St. Paul, MN: AACC International, 1982. p. 55-141.

PORITSANOS, N.; SELIN, C.; FERNANDO, W. G. D.; NAKKEERAN, S.; KIEVIT, T. R. A GacS deficiency does not affect *Pseudomonas chlororaphis* PA23 fitness when growing on canola, in aged batch culture or as a biofilm. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 1177-1188, 2006.

RAAIJMAKERS, J. M.; MAZZOLA, M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, p. 403-424, 2012.

RAUDALES, I. M.; RODRÍGUEZ, Y. DE LA C.; GUTIÉRREZ, A. A.; ARREGUÍN, J. V.; MAYORGA, A. F.; RODRÍGUEZ, M. A.; HERNÁNDEZ, V. B.; VELÁZQUEZ, S. F. Draft genome sequence of *Bacillus velezensis* 2A-2B strain: a rhizospheric inhabitant of *Sporobolus airoides* (Torr.) Torr., with antifungal activity against root rot causing phytopathogens. **Standards in Genomic Sciences**. 12:73, 2017.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**, Passo Fundo/RS, Aldeia Norte, 2004. 141p.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F.; VISMER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2101-2105, 2002.

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

ROCHA, L. O. **Distribuição de fungos e micotoxinas em grãos de milho recém-colhidos e variabilidade genética das cepas de *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus flavus* isoladas.** 2010. 174p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SAGAHÓN, I. P.; REYES, M. A. A.; ROJAS, H. V. S.; CUENCA, A. A.; JURADO, A. T.; ALVAREZ, I. O. C.; FLORES, Y. M. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella Maydis* and *Stenocarpella macrospora*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, n.9, p. 5522-5537, 2011.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 21, p. 1-30, 2011.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma spp.* no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 3, p. 203-208, 2009.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; GARBOGGINI, F. F.; NOGUEIRA, N. L.; DA SILVEIRA, A. P. D. *Achromobacter insolitus* and *Zooglyphus ramigera* associated with wheat plants (*Triticum aestivum*). **Biology and fertility of soils**, Berlin, v. 44, p. 1107-1112, 2008.

SAMSUDIN, N. I.; MAGAN, N. Efficacy of potential biocontrol agents for control of *Fusarium verticillioides* and fumonisin B1 under different environmental conditions. **World Mycotoxin Journal**, v. 9, p. 205-213, 2015.

SAVITHA, J.; SRIVIDYA, S.; JAGAT, R.; PAYAL, P.; PRIYANKI, S.; RASHMI, G. W. Identification of potential fungal strains for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 564-568, 2007.

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

SILVA, M. C. S. **Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum spp.*).** 2015. 76p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SOMEYA, N.; KATAOKA, N.; KOMAGATA, T.; HIRAYAE, K.; HIBI, T.; AKUTSU, K.; Biological control of cyclamen soil borne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. **Plant Disease**, v. 84, p. 334-340, 2000.

SONENSHEIN, A. L.; LOSICK, R.; HOCK, J. A. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: From genes to cells. **American Society for Microbiology Press**, 2002.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2007.

SOUZA, M. L. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 21, p. 28-31, 2001.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉIA, M. M. **Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29p. (Documentos, 42).

STACEY, G.; KEEN, N. **Plant-Microbe Interactions.** Chapman & Hall, Nova York, 1996.

SYDENHAM, E. W.; GELDERBLUM, W. C. A.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O. Evidence for the natural occurrence of Fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p. 285-290, 1990.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p. 777-780, 1982.

TERZI, V.; TUMINO, G.; STANCA, A. M.; MORCIA, C. Reducing the incidence of cereal head infection and mycotoxins in small grain cereal species. **Journal of Cereal Science**, v. 59, p. 284-293, 2014.

THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. **Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites.** Edited by G. Stacey and N.T. Keen. Chapman & Hall Inc., New York, 1996, p. 187–235.

TURNER, P. C.; NIKIEMA, P.; WILD, C. P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research**, v.443, p. 81-93, 1999.

TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, p. 327–338, 1999.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Grain: World Markets and Trade. Junho, 2017.** Disponível em:

< <https://www.fas.usda.gov/data/grain-world-marketsand-trade>>.

Acesso em: dez. 2017.

VAIDYA, R. J.; SHAH, I. M.; VYAS, P.R.; CHHATPAR, H. S. Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans*: Potential in antifungal biocontrol. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 691-696, 2001.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; De VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407-438, 1996.

VILLA, P. M. **Producción de metabolitos a partir de *Pseudomonas fluorescentes* para su uso en el control biológico de hongos fitopatógenos.** 1999. 60p. Dissertação (Mestrado) - Universidad de La Habana, Cuba.

VINCELLI P.; PARKER, G. **Fumonisin, Vomitoxin, and Other Mycotoxins in Corn Produced by *Fusarium* Fungi.** The Cooperative Extension Service (CES) publications, University of Kentucky, College of Agriculture, 2008.

WALKER, R., EMSLIE, K. A.; ALLAN, E. J. Bioassay methods for the detection of antifungal activity by *Pseudomonas antimicrobica* against the grey mould pathogen *Botrytis cinerea*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 531-537, 1996.

WALKER, R.; INNES, C. M. J.; ALLAN, E. J. The potential biocontrol agent *Pseudomonas antimicrobial* inhibits germination of conidia and outgrowth of *Botrytis cinerea*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 346-348, 2001.

WANG, K.; YAN, P.; CAO, L.; DING, Q.; SHAO, C.; ZHAO, T. Potential of Chitinolytic *Serratia marcescens* Strain JPP1 for Biological Control of *Aspergillus parasiticus* and Aflatoxin. **BioMed Research International**, 7 p., 2013.

WARFIELD, C.Y.; DAVIS, R. M. Importance of the husk covering on the susceptibility of corn hybrids to *Fusarium* ear rot. **Plant Disease**, v. 80, p. 208-210, 1996.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. **PCR protocols: A guide to methods and applications and applications**, eds. Academic Press, Inc., New York, 1990. p. 315-322.

WORDELL FILHO, J. A. Micotoxinas na cultura do milho. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.23, p. 46-48, 2010.

XU, S. J.; KIM, B. S. Biocontrol of *Fusarium* Crown and Root Rot and Promotion of Growth of Tomato by *Paenibacillus* Strains Isolated from Soil. **Mycobiology**, v. 42(2), p. 158-166, 2014.