



MIKAELY SOUSA MARINS

**CONTROLE DE *Fusarium verticillioides* EM MILHO POR
*Paenibacillus polymyxa***

**LAVRAS-MG
2021**

MIKAELY SOUSA MARINS

CONTROLE DE *Fusarium verticillioides* EM MILHO POR *Paenibacillus polymyxa*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de
Mestre.

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

Dra. Christiane A.O. Paiva
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pela própria autora.

Marins, Mikaely Sousa.

Controle de *Fusarium verticillioides* em milho por
Paenibacillus polymyxa / Mikaely Sousa Marins. - 2021.
43 p.

Orientador: Ludwig H. Pfenning.

Coorientadora: Christiane Abreu de Oliveira Paiva.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Bactéria antagonica. 2. Enzimas de defesa. 3. Controle
biológico. I. Pfenning, Ludwig Heinrich. II. Paiva, Christiane Abreu
de Oliveira. III. Título.

MIKAELY SOUSA MARINS

CONTROLE DE *Fusarium verticillioides* EM MILHO POR *Paenibacillus polymyxa*

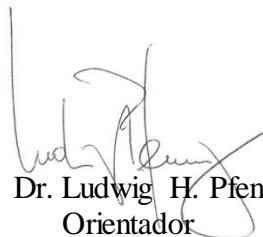
***Fusarium verticillioides* CONTROL BY *Paenibacillus polymyxa* IN MAIZE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de junho de 2021.

Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva – EMBRAPA

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista – DBI – UFLA



Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

Dra. Christiane A.O. Paiva
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2021**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais Vanda e Misael pelos valores que me ensinaram, por todo amor que me deram e por sempre estarem ao meu lado sendo apoio, motivação e abrigo.

Aos meus irmãos, Juliana, Tamires, Marlon e Michely e aos meus cunhados Maurício e Paulo por serem companheiros em todos os momentos, obrigada pelo carinho, suporte e amor.

Aos meus grandes amores Murilo e Heitor que preenchem meus dias. Obrigada por serem motivo de alegria e sinônimo de Vida.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade concedida e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Ludwig H. Pfenning pela confiança, atenção e pelos ensinamentos compartilhados. Obrigada pela disposição e dedicação na execução desta pesquisa.

À Embrapa Milho e Sorgo pelo suporte para o desenvolvimento deste trabalho, em especial à equipe Reinaldo, Dênio, Fabiane, Thales, Vitória, Victor e Felipe pela contribuição nos experimentos de campo e casa de vegetação.

À Dra. Christiane Paiva pelo incentivo na área acadêmica, por ser inspiração, acolhimento e amor. Obrigada por acreditar e confiar em mim e no meu trabalho.

Ao Dr. Ivanildo Marriel pelo conhecimento compartilhado e amparo. À Dra. Dagma Dionísia pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À minha amiga Gisele Diniz por ser minha rede de apoio, me ajudar a encontrar solução para os desafios e por me acolher nos momentos de dúvidas e desalento.

Às colegas do PPGMA Cristina, Sandra, Jullie e Clara pela parceria nos estudos e momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Ana Carolina, Ana Caroline, Arianna, Bárbara, Edson, Gabriel, Janaína e Marileide, obrigada pelo acolhimento e pela ajuda nas análises.

Aos colegas Iara Eleutéria, Rafaela Guimarães e Frederick Aguiar pela grande contribuição nas análises.

Às minhas amigas Ayla Grecco e Mariana Baldo pela amizade, pelos momentos de alegria e por todo carinho. Vocês são especiais.

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

Por fim, e não menos importante, agradeço a Deus por ser meu guia e por me dar forças pra não desistir.

RESUMO

A associação entre o milho e *Fusarium verticillioides* é praticamente constante, mas pode-se tornar indesejada quando o fungo causa doença na cultura ou produz fumonisinas nos grãos. A ação de *Paenibacillus polymyxa* como agente de controle biológico (BCA) e como rizobactéria promotora de crescimento de plantas (PGPR) é bem documentada na literatura. O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de *P. polymyxa* em reduzir a infecção do milho por *F. verticillioides* e acompanhar a produção de enzimas em resposta de defesa da planta à infecção do fungo. Nos experimentos foi utilizada uma cepa da bactéria previamente selecionada, com capacidade comprovada de inibir o crescimento do patógeno *in vitro*. Em um experimento no campo, com infecção de *F. verticillioides*, foi avaliado o efeito da aplicação de *P. polymyxa* sobre a taxa de infecção dos grãos pelo patógeno. Em outro experimento, conduzido em casa de vegetação, foi avaliada a incidência e a severidade da podridão do colmo, após inoculação com *F. verticillioides* e tratamentos com *P. polymyxa*. Nesse experimento, avaliou-se também a produção das enzimas de defesa fenilalanina amônia-liase (PAL) e glutationala redutase (GR) nas plantas de milho inoculadas com o fungo e o antagonista. Em campo, a pulverização com *P. polymyxa* reduziu a incidência de *Fusarium* em 16% em plantas naturalmente infectadas, e em 25% em plantas inoculadas. A pulverização de plantas com *P. polymyxa* em casa de vegetação reduziu a severidade da podridão do colmo em 33% em relação ao controle, e aumentou a atividade da enzima GR. O tratamento de microbiolização de sementes reduziu a severidade da podridão do colmo em 18%. Os resultados aqui obtidos abrem a perspectiva para o desenvolvimento de uma técnica para controle biológico da infecção causada por *F. verticillioides* em milho, e proporcionar menor dependência das aplicações de defensivos químicos.

Palavras-chave: Bactéria antagonica. Controle biológico. Enzimas de defesa. Podridão do colmo. Podridão da espiga. Resistência induzida.

ABSTRACT

The association of *Fusarium verticillioides* with maize is virtually constant, but can turn to be undesired when the fungus causes disease in the crop or produces mycotoxins in the grains. The beneficial action of *Paenibacillus polymyxa* as an agent of biological control or as a colonizer of the rhizosphere promoting plant growth is well documented in the literature. The objectives of this study were to evaluate the potential of *P. polymyxa* in reducing infection of *F. verticillioides* in maize and to follow the production of defense enzymes by the plant in response to infection. We used a bacterial strain previously selected from a collection, with a proven ability to inhibit the growth of *F. verticillioides* in axenic culture. In a field experiment, the effect of *P. polymyxa* application on the infection rate of maize kernels was evaluated. In another experiment, carried out in a greenhouse, we evaluated the incidence and severity of stalk rot of maize after inoculation with *F. verticillioides* and different treatments with *P. polymyxa*. In this experiment, we also evaluated the production of plant defense enzymes phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and glutathione reductase (GR) in maize plants, inoculated with the fungus and the antagonistic bacteria. Application of *P. polymyxa* reduced the incidence of *Fusarium* by 16% in plants naturally infected and 25% in inoculated plants. Spraying plants with *P. polymyxa* in greenhouse reduced the severity of stalk rot by 33% compared to the control, and increased the activity of GR enzyme. The seed microbiolization reduced the severity of stalk rot by 18%. The results obtained in this study open the perspective to developing a technique for biological control of infection caused by *F. verticillioides* in maize, and strategy less dependence on chemical pesticide applications.

Key Words: Antagonistic bacteria; Biological Control; Defense related enzymes; Ear rot; Stalk rot; Systemic Induced Resistance.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	9
1 INTRODUÇÃO GERAL	9
2 ESTADO DA ARTE	10
2.1 Cultura do milho no Brasil	10
2.2 <i>Fusarium verticillioides</i> e a produção de fumonisinas	11
2.3 Agentes de controle biológico e seus mecanismos de ação	12
2.4 <i>Paenibacillus polymyxa</i>	13
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2	21
Resumo	21
1 Introdução	23
2 Material e Métodos	24
2.1 Avaliação do antagonismo de <i>Paenibacillus polymyxa</i> a <i>Fusarium verticillioides</i> <i>in vitro</i>	24
2.2 Efeito de <i>Paenibacillus polymyxa</i> sobre a incidência e frequência de <i>Fusarium verticilloides</i> em grãos de milho em condição de campo	25
2.3 <i>Blotter test</i>	25
2.4 Efeito de <i>Paenibacillus polymyxa</i> na severidade da podridão do colmo induzida por <i>Fusarium verticillioides</i>	26
2.5 Quantificação da atividade de enzimas de defesa	27
3 Análise de estatística	28
4 Resultados	28
5 Discussão	36
Agradecimentos	39
REFERÊNCIAS	41

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Na produção mundial de cereais, o milho (*Zea mays* L.) é qualificado como a terceira maior produção depois do arroz e do trigo, sendo que seu alto valor nutritivo justifica a sua integração à alimentação humana e animal (Aguado et al., 2019; Yigermal et al., 2019). Entretanto, alguns fitopatógenos causam perdas significativas na produção do milho ou comprometem a qualidade do produto, como por exemplo *Fusarium verticillioides*. Esse fungo atinge a planta na fase pré- e pós-colheita, induzindo a podridão do colmo, espiga e raízes. Também, produz metabólitos secundários altamente tóxicos como as fumonisinias, micotoxinas que causam doenças em humanos e animais (Aguado et al., 2019; Franco et al., 2019; Chulze, 2010).

Os métodos químicos de controle da doença podem agredir o meio ambiente e podem poluir o solo e recursos hídricos (Bressan e Figueiredo, 2003). Dentre os defensivos agrícolas utilizados no manejo de *Fusarium* na cultura milho pode-se destacar o Thiram e Captam, que são aplicados como tratamento de sementes antes do plantio. De acordo com os fabricantes destes produtos, Thiram pode causar toxicidade aos seres humanos e ao ambiente, quando utilizados de forma inadequada (Crompton FISPQ 2021). Em seres humanos pode causar hepatotoxicidade por exposição repetida ou prolongada e no ambiente é considerado um produto altamente persistente e tóxico para organismos aquáticos (ANVISA 2021). Captam é classificado como extremamente tóxico e pode apresentar efeitos carcinogênicos em animais. No ambiente possui persistência curta, porém pode causar contaminação em rios e no lençol freático (Arysta LifeScience FISPQ 2021). A aplicação de fungicidas na planta ou como tratamento de sementes pode prejudicar a diversidade biológica do solo, apresentando um efeito negativo sobre os organismos do gênero *Rhizobium* e *Azospirillum*, que são responsáveis pela fixação de nitrogênio (Bressan e Figueiredo, 2003; Osman et al., 2012). Nesse contexto, a utilização de antagonistas microbianos para controle de *Fusarium* em campo surge como uma alternativa promissora.

A bactéria gram-positiva *Paenibacillus polymyxa* encontrada na rizosfera de plantas é conhecida por sua capacidade de produzir uma variedade de metabólitos de interesse industrial e agrícola, sendo as fusaricidinas A-F compostos com ação antibacteriana e antifúngica comprovada, específica a espécies do gênero *Fusarium* (Qiu et al., 2019; Raza et al., 2015). *Paenibacillus polymyxa* auxilia no desenvolvimento vegetal e na indução da resistência

sistêmica. Ensaios *in vitro* demonstraram um aumento de 60% da área de superfície foliar em plantas *Arabidopsis thaliana*, que foram cultivadas a 2 cm da cultura bacteriana. Atribui-se a indução do crescimento à liberação de compostos voláteis pela bactéria (Lee et al., 2012). O cultivo de mudas de arroz com inoculação de *P. polymyxa* reduziu em 83% a severidade da doença causada por *Xanthomonas oryzae*, e ainda observou-se um aumento significativo da parte aérea do vegetal e comprimento de raízes, quando comparadas ao controle (Abdallah et al., 2019). Isolados de *P. polymyxa* podem produzir hormônios promotores de crescimento e enzimas relacionadas com a fixação de nitrogênio e absorção de fósforo pela planta (Raza et al., 2015).

O presente projeto foi conduzido no intuito de avaliar se a aplicação de *P. polymyxa* em plantas de milho pode reduzir a incidência de *F. verticillioides* nos grãos e diminuir a severidade da podridão do colmo. Avaliamos também se *P. polymyxa* induz a resistência sistêmica no milho aumentando a produção de enzimas como glutatona redutase e fenilalanina amonialiase. A pesquisa foi realizada em quatro etapas: I triagem de cepas *in vitro*; II avaliação do efeito da cepa em relação a sanidade de grãos em campo; III avaliação da podridão do colmo induzida por *F. verticillioides* em plantas submetidas a tratamentos com o antagonista; e IV quantificação de enzimas relacionadas a defesa. Com os resultados aqui obtidos será possível auxiliar no desenvolvimento de uma técnica para controle biológico da infecção causada por *F. verticillioides* em milho, e proporcionar menor dependência das aplicações de defensivos químicos.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 Cultura do milho no Brasil

O milho é uma das principais culturas produzida pelo país, a safra de grãos 2020/21 tem uma estimativa de ganho de produtividade de 6,5%, crescimento recorde de produção (CONAB, 2021). A cadeia produtiva do milho é economicamente estratégica pois oferece aplicação na alimentação humana e animal sob diversas formas por ser considerado um alimento de alto valor nutritivo (Cicolin e Oliveira, 2016; Oliveira et al., 2020). A produção total de milho, safra 2020/21, está estimada em 109 milhões de toneladas (CONAB, 2021).

No entanto, o cultivo de milho enfrenta desafios que interferem diretamente na produtividade e na sanidade dos grãos, fatores que podem promover perdas econômicas significativas (Lanza et al., 2017). O Brasil é o terceiro maior produtor de milho, com rendimento médio de 5,52 t.ha⁻¹, porém possui grande discrepância quando comparado com os

EUA, que ocupam o primeiro lugar do ranking, com produtividade média de 10,79 t.ha⁻¹ (CONAB, 2021; USDA, 2021). Esta diferença ocorre devido a fatores climáticos, emprego de tecnologias no plantio, período de plantio, fatores nutricionais do solo e ocorrência de doenças (Rong et al., 2021).

2.2 *Fusarium verticillioides* e a produção de fumonisinas

Dentre as doenças causadas por fungos que acometem a cultura, espécies de *Fusarium* atingem as plantas em diversos estágios de desenvolvimento causando podridão de raízes, caule e espigas (Costa et al., 2019; Fingstag et al., 2019; Rosa Junior et al., 2019). *Fusarium verticillioides* afeta o milho causando sintoma de doença, pode colonizar a planta como endófito, ou colonizar os resíduos das culturas como saprófita. Em geral, esse fungo tende a comprometer os tecidos das plantas, como por exemplo as raízes laterais, que são as mais afetadas. Os macro e microconídios podem ser disseminados pelo ar e contaminar as espigas por penetração do estigma (Wu et al., 2011, 2013). O crescimento do patógeno nos tecidos vasculares induz podridão do colmo e compromete a translocação de água e nutrientes ocasionando menor rendimento ou até mesmo perda prematura das plantas (Costa et al., 2019). Nos grãos, o fungo pode produzir fumonisinas, micotoxinas prejudiciais à saúde humana e animal (Gaije et al., 2020; Leggieri et al., 2019).

Fatores abióticos como temperatura, pH e disponibilidade de água influenciam na biossíntese de fumonisinas no campo, mas também na fase pós colheita quando as medidas de armazenamento não são adequadas (Chulze, 2010; Wu et al., 2013). A produção de micotoxinas ocorre em plantas sintomáticas e assintomáticas a doença (Leyva-Madrigal et al., 2017). As fumonisinas representam uma família de metabólitos, sendo classificados em grupos A, B, C e P. São consideradas moléculas carcinogênicas que podem causar em humanos câncer esofágico e hepático, e em suínos provocar danos no tubo neural e edema pulmonar. Em equinos induz um processo degenerativo do sistema nervoso central conhecido como leucoencefalomalácia (ELEM) (Galletti et al., 2020; Nguyen et al., 2018).

Devido aos riscos apresentados por estes compostos, agências como Anvisa, FDA e EFSA regulamentam os limites máximos permitido desse contaminante nos produtos e derivados do milho, havendo variação de acordo com o país, a finalidade e o tipo do produto (Rosa Junior et al., 2019; Oliveira et al., 2020). Não existem processos eficientes para descontaminação de grãos contaminados com fumonisinas, pois estas apresentam resistência e estabilidade a processos térmicos, físicos e químicos (Reis et al., 2020).

Pelos motivos expostos, o ideal é controlar a colonização do patógeno no campo. Para isso recomenda-se a utilização de boas práticas agrícolas envolvendo plantio de sementes saudáveis, rotação de culturas, seguir a densidade recomendada de plantas, controle de pragas que possam danificar o tecido vegetal e favorecer a penetração do patógeno, e tratamentos químicos. Porém, o emprego de agentes químicos não é totalmente seguro, pois viabiliza a contaminação do ecossistema, como solo e recursos hídricos, além de serem inseguros para alimentação humana e animal e também pela possibilidade de resistência do patógeno ao químico (Nguyen et al., 2018; Reis et al., 2020).

2.3 Agentes de controle biológico e seus mecanismos de ação

O controle biológico de doenças utilizando microrganismos competidores e seus metabólitos ativos é uma estratégia para reduzir a densidade de inóculo na cultura do milho, garantindo a qualidade e abundância dos grãos, proteção do ecossistema e a segurança alimentar humana e animal. A adoção de práticas de controle biológico é uma alternativa viável e complementar às boas práticas agrícolas para a prevenção a fitopatógenos (Nguyen et al., 2018).

Os mecanismos de controle podem ser por métodos diretos como por exemplo a competição por espaço e/ou nutrientes, antibiose por metabólitos secundários e hiperparasitismo, ou métodos indiretos como a indução de resistência (Köhl et al., 2019). Alguns microrganismos possuem a capacidade de estimular o processo de indução de resistência sistêmica das plantas (ISR) onde as respostas de defesa são preparadas para hipersensibilizar as plantas à infecção de patógenos ou ataque de pragas, as vias de sinalização ativadas são as do ácido jasmônico, etileno e ácido salicílico (Galletti et al., 2020; Grady et al., 2016). Neste caso, o microrganismo de biocontrole secreta elicitores como compostos voláteis, enzimas, proteínas e/ou espécies reativas de oxigênio, que a planta reconhece e, em consequência, desencadeia o processo de ISR (Grady et al., 2016).

Em outros casos, antagonistas ativam a imunidade basal da planta aumentando a expressão de genes relacionados a produção de enzimas de defesa como catalase (CAT), peroxidase (POD), superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR) (Alquéres et al., 2013; Jiang et al., 2019). A alta atividade de POD pode interferir na produção de suberina, melanina e lignina, essas substâncias promovem fortalecimento da parede celular, perfazendo uma barreira mecânica que dificulta a penetração do patógeno (Choudhary et al., 2017). Durante o processo de infecção dos patógenos ocorre acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos tecidos vegetais. Essas moléculas são conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs) e

causam estresse oxidativo. Enzimas como CAT, POD, SOD e GR são responsáveis por manter o equilíbrio de EROs nos tecidos, protegendo as plantas ao estresse e desfavorecendo a fase necrótica induzida por patógenos (Maschietto et al., 2016).

Outro mecanismo de controle biológico utilizado por bactérias é a formação de biofilme nas raízes, a estrutura complexa cuja formação é regulada por *quórum sensing* é composta por exopolissacarídeos e proteínas e tem como função proteger as células de agressões físico-químicas (Camele et al., 2019; Timmusk et al., 2019). Bactérias do gênero *Streptomyces* são produtores de compostos antimicrobianos interessantes para o controle biológico. Entretanto, a multiplicação destes microrganismos em larga escala é complexa e limita a formulação de produtos comerciais (Zacchetti et al., 2018). *Pseudomonas* é um gênero de bactérias promotoras de crescimento de plantas, que contribui para a supressividade de doenças no solo e protege a planta contra patógenos. Uma limitação desse sistema é a vida curta de prateleira (Arriel-Elias et al., 2018; Lee et al., 2019; Wang et al., 2020).

Os antagonistas bacterianos mais utilizados no controle biológico são espécies do gênero *Bacillus*, devido à gama de compostos bioativos que produzem. Estes microrganismos sintetizam compostos antimicrobianos, fungitóxicos e induzem a resistência sistêmica no vegetal. Dentre os compostos produzidos, iturina, surfactina e fengicina são os relatados com maior frequência (Moreno-Velandia et al., 2019; Ntushelo et al., 2019). A capacidade destes microrganismos em produzir endósporos e por serem facilmente multiplicados em meio líquido representa uma vantagem comercial para formulação de produtos estáveis com capacidade de armazenamento por prazo prolongado (Khedher et al., 2021).

A pulverização de *Bacillus subtilis* em melão induziu a formação de biofilme no filoplano e protegeu as plantas contra doenças foliares, a capacidade de biocontrole neste caso está atribuída a produção de surfactina pela bactéria, o biofilme garante persistência da pulverização nas folhas (Zerriouh et al., 2013). *Paenibacillus polymyxa*, quando pulverizado em plantas de trigo induziu a formação de biofilme com polissacarídeos competentes ao antagonismo de *F. graminearum* nos grãos (Timmusk et al., 2019).

2.4 *Paenibacillus polymyxa*

Espécies do gênero *Paenibacillus* se apresentam em forma de bastonetes aeróbios ou anaeróbios facultativos e possuem capacidade de formar endósporos, devido a essas características morfológicas esses organismos foram anteriormente incluídos no gênero *Bacillus* (Grady et al., 2016). A proposta para criação do novo gênero foi baseado em características

fenotípicas e análises comparativas no gene 16S. O nome do gênero deriva do latim *paene* e significa “quase”, sendo *Paenibacillus* descrito como um microrganismo quase *Bacillus* (Ash et al., 1993). Este gênero é composto por aproximadamente 165 espécies (Grady et al., 2016; Langendries e Goormachtig, 2021), e tem como espécie tipo *P. polymyxa* (Judicial Commission Of The International Committee On Systematics Of Prokaryotes, 2005).

A espécie *P. polymyxa* é caracterizada como bactérias gram-positiva formadoras de esporos, que possuem flagelos peritríquios e podem ser encontradas no solo em associação com gramíneas como milho, sorgo, cevada e o trigo. Essa bactéria tem capacidade de se desenvolver como endófito e como epífita, e também já foi descrita em sedimentos marinhos e alimentos fermentados (Grady et al., 2016; Daud et al., 2019; Langendries e Goormachtig, 2021). Na rizosfera é capaz de auxiliar a planta na aquisição de nutrientes como fósforo (P), através da produção de ácido glucônico, nitrogênio (N), utilizando o mecanismo de transformação do N atmosférico (N₂) em amônia (NH₃) e ferro (Fe), pela produção de sideróforos. Devido a estes mecanismos, estas bactérias podem auxiliar o desenvolvimento de algumas plantas e são denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) (Grady et al., 2016; Langendries e Goormachtig, 2021).

Paenibacillus polymyxa não somente aumenta da biodisponibilidade de nutrientes, mas também consegue induzir o crescimento de plantas pela produção de fitohormônios como ácido indol-3-acético (AIA), citocinina e etileno (Daud et al., 2019; Langendries e Goormachtig, 2021). A inoculação de *Arabidopsis thaliana* com *P. polymyxa* E681 promoveu o crescimento da planta. Utilizando análise de proteômica foi possível identificar uma maior expressão de AIA em plantas inoculadas quando comparadas com o controle (Kwon et al., 2016). O emprego de técnicas biológicas utilizando *P. polymyxa* pode reduzir a dependência de fertilizantes químicos, que podem poluir o ambiente e ser tóxicos a humanos e animais (Grady et al., 2016; Daud et al., 2019).

Paenibacillus polymyxa é conhecida por sua capacidade de produzir uma variedade de metabólitos bioativos. Os compostos antimicrobianos polimixina e fusaricidina são produzidos exclusivamente por este microrganismo. A polimixina é um antibiótico específico para bactérias gram-negativas e as fusaricidinas são compostos com ação antibacteriana e antifúngica altamente específico ao gênero *Fusarium* (Qiu et al., 2019; Raza et al., 2015; Soni et al., 2021). A aplicação de *P. polymyxa* no solo promove a redução de *Fusarium* e favorece o crescimento de grupos de microrganismos benéficos como os gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Actinospica*, *Catenulispora* e *Pseudomonas*, auxiliando no crescimento do vegetal (Shi et al.,

2017). *Paenibacillus polymyxa* induz ISR em plantas aumentando a expressão de enzimas antioxidantes e enzimas relacionadas com o estresse. A inoculação desta rizobactéria aumentou a expressão de proteínas como a glutatona transferase e ascorbato peroxidase em plantas de *A. thaliana*. Estas enzimas sinalizam e ativam o metabolismo do ácido jasmônico, sensibilizando a planta a ataques de fitopatógenos (Kwon et al., 2016).

No entanto, a eficiência do controle biológico nem sempre dependerá apenas do antagonista, também interferem no resultado os métodos de aplicação, a concentração do inóculo, o momento ideal de aplicação e a formulação do inoculante. Algumas estratégias de preparo incluem encapsulamento em amido e adição de protetores UV, que criam um microclima ideal para proteger os microrganismos de condições adversas. Substâncias adesivas e umectantes também são utilizados com a finalidade de garantir aderência do inóculo e prevenir a evaporação, respectivamente (Feng et al., 2019; Herrera et al., 2020; Nayaka et al., 2010). Com isso, conhecimento sobre o *timing* ideal de aplicação do antagonista, bem como sobre formulações mais eficientes, podem contribuir para o sucesso da medida.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, Y., YANG, M., ZHANG, M., MASUM, M.M.I., OGUNYEMI, S.O., HOSSAIN, A., AN, Q., YAN, C. and LI, B. 2019. Plant growth promotion and suppression of bacterial leaf blight in rice by *Paenibacillus polymyxa* Sx3. *Letters in Applied Microbiology*. vol. 68, pp. 423-429. doi:10.1111/lam.13117.
- AGUADO, A., SAVOIE, J.M., CHÉREAU, S., DUCOS, C., AGUILAR, M., FERRER, N., AGUILAR, M., PINSON-GADAIS, L. and RICHARD-FORGET, F. 2019. Priming to protect maize from *Fusarium verticillioides* and its fumonisin accumulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. vol. 99, pp. 64-72. doi: 10.1002/jsfa.9142.
- ALQUÉRES, S., MENESES, C., ROUWS, L., ROTHBALLER, M., BALDANI, I., SCHMID, M. and HARTMANN, A. 2013. The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. vol. 26, pp. 937–945. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0286-R>.
- ANVISA, Índice monográfico – Thiram, acesso em 02/05/2021 < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/t/4529json-file-1>>
- ARRIEL-ELIAS, M.T., OLIVEIRA, M.I.S., SILVA-LOBO, V.L., FILIPPI, M.C.C., BABANA, A.H., CONCEIÇÃO, E.C. and CORTES, M.V.C.B. 2018. Shelf life enhancement of plant growth promoting rhizobacteria using a simple formulation screening method. *African Journal of Microbiology Research*. vol. 12, pp. 115-126. doi: 10.5897/AJMR2017.8787.

ARYSTA LIFESCIENCE - FISPQ, Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – Captan 750 TS, p 1-10 acesso em 02/05/2021 < <https://cloud.cnpqc.embrapa.br/igu/category/s12-administracao/c42-gestao/administracao/srh/fispq/laboratorios/Captan%20750%20TSRev04.pdf> >

ASH, C., PRIEST, F.G. and COLLINS, D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test - Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. vol. 64, pp. 253-260. doi: 10.1007/BF00873085

BRESSAN, W. and FIGUEIREDO, J.E.F. 2003. Controle de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho por actinomicetos. *Comunicado Técnico*. vol 65, pp. 1-4.

CAMELE, I., ELSHAFIE, H.S., CAPUTO, L., SAKR, S.H. and FEO, V. 2019. *Bacillus mojavenensis*: biofilm formation and biochemical investigation of its bioactive metabolites. *Journal of Biological Research*. vol. 92, pp. 39-45. doi:10.4081/jbr.2019.8296.

CHOUHARY, R.C., KUMARASWAMY, R.V., KUMARI, S., SHARMA, S. S., PAL, A., RALIYA, R., BISWAS P. and SAHARANV. 2017. Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.) *Scientific Reports*. vol. 7, artigo 9754. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08571-0>.

CHULZE, S.N. 2010. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. *Journal Food Additives & Contaminants: Part A*. vol. 27, pp. 651-657. doi: 10.1080/19440040903573032.

CICOLIN, L.O. M. and OLIVEIRA, A.R. 2016. Avaliação de desempenho do processo logístico de exportação do milho brasileiro: uma aplicação da análise envoltória de dados – DEA. *Journal of Transport Literature*. vol. 10, pp. 30-34. <https://doi.org/10.1590/2238-1031.jtl.v10n3a6>.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. 2021. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, safra 2020/21 - Sétimo levantamento, v. 8.

COSTA, R.V., SIMON, J., COTA, L.V., SILVA, D.D., ALMEIDA, R.E.M., LANZA, F.E., LAGO, B.C., PEREIRA, A.A., CAMPOS, L.J.M. and FIGUEIREDO, J.E.F. 2019. Yield losses in off-season corn crop due to stalk rot disease. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 54, pp. 1-10. doi:10.1590/s1678-3921.pab2019.v54.00283.

CROMPTON – FISPQ, Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – Vitavax Thiram 200 SC, p 1-9 acesso em 02/05/2021 < https://cloud.cnpqc.embrapa.br/igu/category/s12-administracao/c42-gestao/administracao/srh/fispq/campoexperimental/VITAVAX_FISPQ.pdf >

DAUD, N.S., MOHD DIN, A.R.J., ROSLI, M.A., AZAM, Z.M., OTHMAN, N.Z. and SARMIDI, M.R. 2019. *Paenibacillus polymyxa* bioactive compounds for agricultural and biotechnological applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. vol. 18, pp. 1-7. doi:10.1016/j.bcab.2019.101092.

FENG, J., DOU, J., WU, Z., YIN, D. and WU, W. 2019. Controlled release of biological control agents for preventing aflatoxin contamination from starch–alginate beads. *Molecules*. vol. 24, pp. 1-18. 1858. doi: 10.3390/molecules24101858.

FINGSTAG, M.D., CASA, R.T., BOGO, A., KUHNEM, P., SANGOI, L., VALENTE, J.B., BEVILAQUA, D. FIORENTIN, O.A. and GONÇALVES, M.J. 2019. Fungicide performance on *Fusarium meridionale* control, grain yield and grain damage in maize. *Summa Phytopathologica*. vol. 45, pp. 265-271. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/193255>.

FRANCO, L.T., PETTA, T., ROTTINGHAUS, G.E., BORDIN, K., GOMES, G.A. and OLIVEIRA, C.A.F. 2019. Co-occurrence of mycotoxins in maize food and maize-based feed from small-scale farms in Brazil: a pilot study. *Mycotoxin Research*. vol. 35, pp. 65-73. doi:10.1007/s12550-018-0331-4.

GAIGE, A.R., TODD, T. and STACK, J.P. 2020. Interspecific competition for colonization of maize plants between *Fusarium proliferatum* and *Fusarium verticillioides*. *Plant Disease*. vol. 104, pp. 1-9. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1964-RE>.

GALLETTI, S., PARIS, R. and CIANCHETTA, S. 2020. Selected isolates of *Trichoderma gamsii* induce different pathways of systemic resistance in maize upon *Fusarium verticillioides* challenge. *Microbiological Research*. vol. 233, pp. 1-15. doi: 10.1016/j.micres.2019.126406.

GRADY, E.N., MACDONALD, J., LIU, L., RICHMAN, A. and YUAN, Z. 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*. vol. 15, pp. 1-18. doi: 10.1186/s12934-016-0603-7.

HERRERA, W., VALBUENA, O. and PAVONE-MANISCALCO, D. 2020. Formulation of *Trichoderma asperellum* TV190 for biological control of *Rhizoctonia solani* on corn seedlings. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. vol. 30, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00246-9>.

JIANG, C.H., YAO, X-F., MI, D-D., LI, Z-J., YANG, B-Y, ZHENG Y., QI Y-J. and GUO, J-H. 2019. Comparative transcriptome analysis reveals the biocontrol mechanism of *Bacillus velezensis* F21 against *Fusarium* wilt on watermelon. *Frontiers in Microbiology*. vol. 10, pp. 1-17. doi: 10.3389/fmicb.2019.00652. eCollection 2019.

JUDICIAL COMMISSION OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATICS OF PROKARYOTES. 2005. The type species of the genus *Paenibacillus* Ash et al. 1994 is *Paenibacillus polymyxa*. Opinion 77. *Int J Syst Evol Microbiol*. vol.55, pp. 513–513. doi: 10.1099/ijs.0.63546-0.

KHEDHER, S.B., MEJDOUB-TRABELSI, B. and TOUNSI, S. 2021. Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. *Biological Control*. vol. 152, pp. 1-10, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104444>.

KÖHL, J., KOLNAAR, R. and RAVENSBERG, W.J. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*. vol. 10, pp. 1-19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>.

KWON, Y.S., LEE, D.Y., RAKWAL R., BAEK, S.B., LEE, J.H., KWAK, Y.S., SEO, J.S., CHUNG, W.S., BAE, D.W. and KIM, S.G. 2016. Proteomic analyses of the interaction between the plant-growth promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681 and *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics and Systems Biology*. vol, pp. 122-135 <https://doi.org/10.1002/pmic.201500196>.

LANGENDRIES, S. and GOORMACHTIG, S. 2021. *Paenibacillus polymyxa*, a jack-of-all-trades. *Environmental Microbiology*. doi: 10.1111/1462-2920.15450. Epub ahead of print. PMID: 33684235.

LANZA, F.E., ZAMBOLIM, L., COSTA, R.V., FIGUEIREDO, J.E.F., SILVA, D.D., QUEIROZ, V. A.V., GUIMARÃES, E.A. and COTA, L.V. 2017. Symptomatological aspects associated with fungal incidence and fumonisin levels in corn kernels. *Tropical. Plant Pathology*. vol. 42, pp. 304–308. DOI: 10.1007/s40858-017-0148-2.

LEE, B., FARAG, M.A., PARK, H.B., KLOEPPER, J.W., LEE, S.H. and RYU, C.M. 2012. Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS One*. vol. 7, pp. 1-11. doi:10.1371/journal.pone.0048744.

LEE, Y., LEE, N., JEONG, Y., HWANG, S., KIM, W., CHO, S., PALSSON, B.O. and CHO, B.K. 2019. The transcription unit architecture of *Streptomyces lividans* TK24. *Frontiers in Microbiology*. vol. 10, pp. 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02074>.

LEGGIERI, M.C., GIORNI, P., PIETRI, A. and BATTILANI, P. 2019. *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* interaction: modeling the impact on mycotoxin production. *Frontiers in Microbiology*. vol. 10, pp. 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02653>.

LEYVA-MADRIGAL, K.Y., SANDOVAL-CASTRO, E., CALDERÓN-VÁZQUEZ, C.L., LARRALDE-CORONA, C.P. and MALDONADO-MENDOZA, I.E. 2017. Pathogenic and genetic variability of *Fusarium verticillioides* from maize in northern Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*. vol. 39, pp. 486-496. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1378726>.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrostat – Estatística de comércio exterior do agronegócio brasileiro. Acesso em 23/04/2021, disponível em < <http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>>

MASCHIETTO, V., LANUBILE, A., LEONARDIS, S.D., MAROCCO, A. and PACIOLLA, C. 2016. Constitutive expression of pathogenesis-related proteins and antioxidant enzyme activities triggers maize resistance towards *Fusarium verticillioides*. *Journal of Plant Physiology*. vol. 200, pp. 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.06.006>.

MORENO-VELANDIA, C.A., IZQUIERDO-GARCÍA, L.F., ONGENA, M., KLOEPPER, J.W. and COTES A.M. 2019. Soil sterilization, pathogen and antagonist concentration affect biological control of *Fusarium* wilt of cape gooseberry by *Bacillus velezensis* Bs006. *Plant Soil*. vol. 435, pp. 39–55. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3866-4>.

NAYAKA, S.C., NIRANJANAA, S.R., SHANKARA, A.C.U., RAJA, S.N., REDDYB, M.S., PRAKASHA, H.S. and MORTENSENC, C.N. 2010. Seed biopriming with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the control of toxigenic *Fusarium verticillioides* and fumonisins in

maize. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. vol. 43, pp. 264–282. doi.org/10.1080/03235400701803879.

NGUYEN, P.A., STRUB, C., DURAND, N., ALTER, P., FONTANA, A. and SCHORR-GALINDO, S. 2018. Biocontrol of *Fusarium verticillioides* using organic amendments and their actinomycete isolates. *Biological Control*. vol. 118, pp. 55–66. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.12.006.

NTUSHELO, K., LEDWABA, L.K., RAUWANE, M.E., ADEBO, O.A. and NJOBEH, P.B. 2019. The mode of action of *Bacillus* species against *Fusarium graminearum*, tools for investigation, and future prospects. *Toxins*. vol. 11, pp. 1-14. doi:10.3390/toxins11100606.

OLIVEIRA, D.H., YAMAGUCHI, M.M., TONIAL, I.B. and COELHO, A.R. 2020. Ocorrência de fumonisinas em milho e derivados, destinados à alimentação humana. *Brazilian Journal of Development*. vol. 6, pp.31305-31321. doi:10.34117/bjdv6n5-550.

OSMAN, A.G., SHERIF, A.M., ELHUSSEIN, A.A. and MOHAMED, A.T. 2012. Sensitivity of some nitrogen fixers and the target pest *Fusarium oxysporum* to fungicide thiram. *Interdisciplinary toxicology*. vol. 5, pp. 25–29. https://doi.org/10.2478/v10102-012-0005-6.

QIU, S., AVULA, B., GUAN, S., RAO, R.R., WANG, M., ZHAO, J., KHAN, I.A., HINCHEE, M. and LI, X.C. 2019. Identification of fusaricidins from the antifungal microbial strain *Paenibacillus* sp. MS2379 using ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. vol. 1586, pp. 91-100. doi: 10.1016/j.chroma.2018.12.007.

RAZA, W., YUAN, J., WU, Y.C., RAJER, F.U. HUANG, Q. and QIRONG, S. 2015. Biocontrol traits of two *Paenibacillus polymyxa* strains SQR-21 and WR-2 in response to fusaric acid, a phytotoxin produced by *Fusarium* species. *Plant Pathology*. vol. 64, pp. 1041–1052. doi.org/10.1111/ppa.12354.

REIS, T.A., OLIVEIRA, T.D., ZORZETE, P., FARIA, P. and CORRÊA B. 2020. A non-toxicogenic *Aspergillus flavus* strain prevents the spreading of *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize - Short communication. *Toxicon*. vol. 181, pp. 6-8. doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.04.091.

RONG, L.B., GONG, K.Y., DUAN, F.Y., LI, S.K., ZHAO, M., HE, J., ZHOU, W.B. and YU, Q. 2021. Yield gap and resource utilization efficiency of three major food crops in the world – A review, *Journal of Integrative Agriculture*. vol. 20, pp. 349-362. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63555-9.

ROSA JUNIOR, O.F., DALCIN, M.S., NASCIMENTO, V.L., HAESBAERT, F.M., FERREIRA, T.P.S., FIDELIS, R.R., SARMENTO, R.A., AGUIAR, R.W.S., OLIVEIRA, E.E. and SANTOS, G.R. 2019. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in maize genotypes cultivated in different environments. *Toxins*, vol. 11, pp. 1-16. doi: 10.3390/toxins11040215.

SHI, L., DU, N., SHU, S., SUN, J., LI, S. and GUO, S. 2017. *Paenibacillus polymyxa* NSY50 suppresses *Fusarium* wilt in cucumbers by regulating the rhizospheric microbial community. *Scientific Reports*. vol. 7, pp. 1-13. doi: 10.1038/srep41234.

SONI, R., RAWAL, K. and KEHARIA, H. 2021. Genomics assisted functional characterization of *Paenibacillus polymyxa* HK4 as a biocontrol and plant growth promoting bacterium. *Microbiological Research*. vol. 248, pp. 1-14. doi.org/10.1016/j.micres.2021.126734.

TIMMUSK, S., COPOLOVICI, D., COPOLOVICI, L., TEDER, T., NEVO, E. and BEHERS, L. 2019. *Paenibacillus polymyxa* biofilm polysaccharides antagonise *Fusarium graminearum*. *Scientific Reports*. vol. 9, pp.1-11. doi.org/10.1038/s41598-018-37718-w.

USDA. United States Department of Agriculture. 2021. World Agricultural Production, Foreign Agricultural Service.

WANG, X., TANG, D. and WANG, W. 2020 Improvement of a dry formulation of *Pseudomonas protegens* SN15-2 against *Ralstonia solanacearum* by combination of hyperosmotic cultivation with fluidized-bed drying. *BioControl*. vol. 65, pp. 751–761. doi.org/10.1007/s10526-020-10042-x.

WU, L., WANG, X.-M., XU, R. and LI, H. 2013. Difference between resistant and susceptible maize to systematic colonization as revealed by DsRed-labeled *Fusarium verticillioides*. *The Crop Journal*. vol. 1, pp. 61-69. doi.org/10.1016/j.cj.2013.07.004.

WU, L., WANG, X.-M., XU, R.-Q. and LI, H.-J. 2011. Root infection and systematic colonization of dsred-labeled *Fusarium verticillioides* in maize. *Acta Agronomica Sinica*. vol. 37, pp. 793–802. doi.org/10.1016/S1875-2780(11)60023-0.

YIGERMAL, H., NAKACHEW, K. and ASSEFA, F. 2019. Effects of integrated nutrient application on phenological, vegetative growth and yield-related parameters of maize in Ethiopia: A review. *Journal Cogent Food & Agriculture*. vol. 5. pp. 2-13. doi: 10.1080/23311932.2019.1567998.

ZACCHETTI, B., SMITS, P. and CLAESSEN, D. 2018. Dynamics of pellet fragmentation and aggregation in liquid-grown cultures of *Streptomyces lividans*. *Frontiers in microbiology*. vol. 9, pp. 1-10. doi.org/10.3389/fmicb.2018.00943.

ZERIOUH, H., VICENTE, A., PÉREZ-GARCÍA, A. and ROMERO, D. 2013. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Society for applied microbiology*. vol. 16, pp. 2196-2211. doi: 10.1111/1462-2920.12271.

CAPÍTULO 2

Controle de *Fusarium verticillioides* em milho por *Paenibacillus polymyxa*

Manuscrito de artigo científico, preparado para submissão a revista “Brazilian Journal of Biology”

Resumo

A associação entre o milho e *Fusarium verticillioides* é praticamente constante, mas pode-se tornar indesejada quando o fungo causa doença na cultura ou produz fumonisinas nos grãos. A ação de *Paenibacillus polymyxa* como agente de controle biológico (BCA) e como rizobactéria promotora de crescimento de plantas (PGPR) é bem documentada na literatura. O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de *P. polymyxa* em reduzir a infecção do milho por *F. verticillioides* e acompanhar a produção de enzimas em resposta de defesa da planta à infecção do fungo. Nos experimentos foi utilizada uma cepa da bactéria previamente selecionada, com capacidade comprovada de inibir o crescimento do patógeno *in vitro*. Em um experimento no campo, com infecção de *F. verticillioides*, foi avaliado o efeito da aplicação de *P. polymyxa* sobre a taxa de infecção dos grãos pelo patógeno. Em outro experimento, conduzido em casa de vegetação, foi avaliada a incidência e a severidade da podridão do colmo, após inoculação com *F. verticillioides* e tratamentos com *P. polymyxa*. Nesse experimento, avaliou-se também a produção das enzimas de defesa fenilalanina amônia-liase (PAL) e glutatona redutase (GR) nas plantas de milho inoculadas com o fungo e o antagonista. Em campo, a pulverização com *P. polymyxa* reduziu a incidência de *Fusarium* em 16% em plantas naturalmente infectadas, e em 25% em plantas inoculadas. A pulverização de plantas com *P. polymyxa* em casa de vegetação reduziu a severidade da podridão do colmo em 33% em relação ao controle, e aumentou a atividade da enzima GR. O tratamento de microbiolização de sementes reduziu a severidade da podridão do colmo em 18%. Os resultados aqui obtidos abrem a perspectiva para o desenvolvimento de uma técnica para controle biológico da infecção causada por *F. verticillioides* em milho, e proporcionar menor dependência das aplicações de defensivos químicos.

Palavras-chave: Controle biológico. Podridão do colmo. Podridão da espiga. Enzimas de defesa. Resistência sistêmica induzida. Bactéria antagonista.

***Fusarium verticillioides* control by *Paenibacillus polymyxa* in maize**

Abstract

The association of *Fusarium verticillioides* with maize is virtually constant, but can turn to be undesired when the fungus causes disease in the crop or produces mycotoxins in the grains. The beneficial action of *Paenibacillus polymyxa* as an agent of biological control or as a colonizer of the rhizosphere promoting plant growth is well documented in the literature. The objectives of this study were to evaluate the potential of *P. polymyxa* in reducing infection of *F. verticillioides* in maize and to follow the production of defense enzymes by the plant in response to infection. We used a bacterial strain previously selected from a collection, with a proven ability to inhibit the growth of *F. verticillioides* in axenic culture. In a field experiment, the effect of *P. polymyxa* application on the infection rate of maize kernels was evaluated. In another experiment, carried out in a greenhouse, we evaluated the incidence and severity of stalk rot of maize after inoculation with *F. verticillioides* and different treatments with *P. polymyxa*. In this experiment, we also evaluated the production of plant defense enzymes phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and glutathione reductase (GR) in maize plants, inoculated with the fungus and the antagonistic bacteria. Application of *P. polymyxa* reduced the incidence of *Fusarium* by 16% in plants naturally infected and 25% in inoculated plants. Spraying plants with *P. polymyxa* in greenhouse reduced the severity of stalk rot by 33% compared to the control, and increased the activity of GR enzyme. The seed microbiolization reduced the severity of stalk rot by 18%. The results obtained in this study open the perspective to developing a technique for biological control of infection caused by *F. verticillioides* in maize, and strategy less dependence on chemical pesticide applications.

Key Words: Antagonistic bacteria; Biological Control; Defense related enzymes; Ear rot; Stalk rot; Systemic Induced Resistance.

1 Introdução

A cultura do milho (*Zea mays* L.) é afetada por várias doenças, que causam redução e perdas de produtividade, mas também comprometem a qualidade do produto e derivados. A podridão do colmo e da espiga causada pelo fungo *Fusarium verticillioides* é uma das doenças mais importantes na cultura. Este patógeno afeta a planta em todas as fases de desenvolvimento, causando morte prematura das mudas, sintomas de podridão no colmo e de espiga, e conseqüentemente, contaminação dos grãos por fumonisinas (Naz et al., 2021). O manejo químico é frequentemente utilizado para o controle desse patógeno em campo, no entanto, este tipo de manejo de forma isolada pode aumentar os níveis de fumonisinas nos grãos e prejudicar o meio ambiente causando poluição do solo e dos recursos hídricos (Bressan e Figueiredo, 2003; Guimarães et al. 2020 a, b).

A aplicação de microrganismos benéficos para controlar patógenos em campo representa uma alternativa viável e complementar aos métodos químicos. O tratamento de sementes e a pulverização com agentes de controle biológico podem proteger as plantas de milho contra a infecção de *F. verticillioides* e reduzir o conteúdo de fumonisinas nos grãos (Guimarães et al., 2020a; Pereira et al., 2012). Os mecanismos utilizados pelos antagonistas incluem competição com o patógeno por espaço e nutrientes, produção de metabólitos secundários que inibem o crescimento do patógeno e/ou indução de resistência da planta (Köhl et al., 2019). A bactéria *Paenibacillus polymyxa* produz uma gama de compostos interessantes ao controle biológico, dentre eles destacam-se a fusaricidina e a polimixina. A fusaricidina é um metabólito secundário que possui ação antifúngica a fungos filamentosos. A inibição de *F. verticillioides* por fusaricidina já foi comprovada (Han et al., 2017). A polimixina pode comprometer o desenvolvimento das hifas de *F. verticillioides* e reduzir a produção de fumonisina (Kim et al., 2010).

O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de *P. polymyxa* em reduzir a incidência e severidade de *F. verticillioides* em milho e avaliar a resposta de defesa da planta mediada por enzimas como fenilalanina amônia-liase (PAL) e glutatona redutase (GR). Nos experimentos foi utilizada uma cepa previamente selecionada, com capacidade comprovada em inibir o crescimento do patógeno *in vitro*. Em um experimento no campo, com infecção natural e artificial por *F. verticillioides*, foi avaliado o efeito da aplicação de *P. polymyxa* sobre a taxa de infecção dos grãos pelo patógeno. Em outro experimento, conduzido em casa de vegetação, foi avaliada a incidência e a severidade da podridão do colmo, após inoculação com *F. verticillioides* e tratamentos com a bactéria. As plantas de milho foram analisadas quanto à

concentração de enzimas relacionadas com a defesa da planta PAL e GR nas plantas de milho inoculadas com o fungo e o antagonista. Os resultados abrem a perspectiva de auxiliar no desenvolvimento de uma técnica para controle biológico da infecção causada por *F. verticillioides* em milho, e proporcionar menor dependência às aplicações de defensivos químicos.

2 Material e Métodos

2.1 Avaliação do antagonismo de *Paenibacillus polymyxa* a *Fusarium verticillioides* *in vitro*

Sete cepas bacterianas de *P. polymyxa* da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos (CMMF) da Embrapa Milho e Sorgo (Lis 01, Lis 02, Lis 03, Lis 04, Lis 06, Lis 07 e Lis 08) foram reativadas em meio batata ágar dextrose (BDA-Kasvi) e incubadas a 25 °C por 48 horas. A seguir, uma colônia pura de cada bactéria foi transferida para meio líquido caldo de soja tripticaseína (TSB-Kasvi) e incubada por 72 horas a 25 °C em agitação constante (120 rpm). A concentração do inóculo bacteriano foi ajustado para 10^8 UFC.mL⁻¹ por densidade ótica. O isolado de *Fusarium verticillioides* CML 2743 foi incubado em meio BDA a 25 °C por 7 dias. Para preparo do inóculo, dois discos de 5mm retirados da colônia foram transferidos para meio líquido de Batata Dextrose e incubados por 48h a 25 °C sob agitação de 150rpm para produção de conídios. A suspensão foi filtrada e a concentração de conídios ajustada em câmara de Neubauer para 10^5 conídios.mL⁻¹ (Guimarães et al., 2020a, modificado).

Antagonismo por confronto direto em meio batata dextrose ágar (BDA) e meio extrato de malte (EM). Foram plaqueados 10µL da suspensão de conídios do fungo no centro de cada placa de 9cm e em quatro pontos equidistantes foi posto o inóculo de 10µL das soluções padronizadas da cepa bacteriana. O ensaio foi montado em triplicata para cada uma das sete cepas bacterianas. O controle consistiu em apenas a inoculação do fungo. As placas foram incubadas na BOD a 25 °C e luz constante por 12 dias. O desenvolvimento da colônia do fungo e os halos de inibição foram monitorados e a porcentagem de inibição foi calculada utilizando a fórmula Abbott (1925) $(T-t)*100/T$, onde “T” é a área de crescimento do fungo na placa controle e “t” é a área de crescimento do fungo no confronto direto.

Antagonismo em grãos de milho triturado. 50 g de grãos de milho triturado foram distribuídos em frascos Erlenmeyers e autoclavados por duas vezes a 120 °C por 30 minutos (Costa et al.,

2012). Após o arrefecimento do substrato foi feito o inóculo de 2 mL da cultura bacteriana, o material foi incubado em BOD a 25 °C e luz constante por 24 h. Em seguida, foi adicionado o inóculo de 2 mL da suspensão de conídios de *F. verticillioides* (Abd El Daim et al., 2015 modificado). Os frascos foram mantidos em BOD por 7 dias. Posteriormente, 14 grãos foram transferidos para o meio ágar-água com adição de estreptomicina (20mg.L⁻¹) para inibir o crescimento da bactéria e verificar a viabilidade dos esporos inoculados. As placas foram mantidas em BOD por 7 dias e após esse período foi avaliado o desenvolvimento do fungo. O ensaio foi montado em triplicata para cada cepa bacteriana. A cepa que demonstrou melhor capacidade em inibir o crescimento do fungo foi selecionado para as etapas *in vivo*.

2.2 Efeito de *Paenibacillus polymyxa* sobre a incidência e frequência de *Fusarium verticilloides* em grãos de milho em condição de campo

O experimento de campo foi desenvolvido na estação experimental da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas – MG, utilizando o milho híbrido DKB 390. O experimento foi organizado em quatro tratamentos sendo (i.) aplicação somente da bactéria; (ii.) aplicação da bactéria, depois o fungo; (iii.) somente o fungo; e (iv.) somente água. O ensaio foi montado em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições por tratamento. As parcelas foram constituídas de seis linhas de 6 metros (0,8 metros entre linhas e 5 plantas/metro). A adubação de plantio foi realizada com 500 kg por hectare de NPK (8-28-16) e após 7 e 14 dias de plantio foi feita a adubação de cobertura com 200 kg por hectare de ureia (45% de nitrogênio).

O concentrado bacteriano e a suspensão de conídios do fungo foram preparadas como descrito no item 1. Na calda de pulverização foi adicionado 1 mL.L⁻¹ de espalhante adesivo Energic (Syngenta). Dez dias após a emissão dos estilo estigmas (estágio fenológico R1) foi realizado o tratamento com antagonista em quatro linhas centrais da parcela útil, no qual 4 mL do inóculo de *P. polymyxa* (Lis 03) foi pulverizado por planta. A inoculação do fungo foi realizada com a injeção de 5 mL da suspensão de conídios em cada espiga 7 dias após a pulverização do antagonista. No final do ciclo da cultura foram coletadas as espigas de duas linhas de cada parcela para o teste de sanidade dos grãos e para avaliar a produtividade.

2.3 Blotter test

A incidência de *Fusarium verticillioides* nos grãos de milho foi determinada pelo método de *blotter test* (Michail, 1985). No total, 100 grãos provenientes de cada tratamento, 25 grãos por parcela, foram submetidos ao processo de desinfestação superficial. Os grãos foram imersos em álcool 70% por 30 seg e hipoclorito 2% por 2 min, em seguida lavados em água

esterilizada e secos em papel filtro. Os grãos desinfestados foram distribuídos em placas de 20 cm contendo três folhas de papel filtro estéreis umedecido e embebido em solução ágar-água (15 g.L^{-1}). As placas foram mantidas em BOD a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h com fotoperíodo de 12 h. Em seguida, foi realizado o congelamento a $-5 \text{ }^\circ\text{C}$ dos grãos por 24h para inibição da germinação. Por fim, as placas foram transferidas para a BOD nas mesmas condições descritas anteriormente por 7 dias. A identificação dos morfotipos foi feita em microscópio óptico, comparando a morfologia observada com a descrita na literatura para as espécies de *Fusarium* (Leslie e Summerell, 2006). As características e estruturas avaliadas foram formato e origem de microconídios, produção de microconídios em cadeias ou apenas em falsas cabeças, tipos de fálides e origem da formação de macroconídio.

2.4 Efeito de *Paenibacillus polymyxa* na severidade da podridão do colmo induzida por *Fusarium verticillioides*

O experimento foi instalado na casa de vegetação da Embrapa Milho e Sorgo utilizando vasos de 5 kg contendo solo de cerrado horizonte B. Trinta dias antes do plantio foi feito a calagem do solo com calcário dolomítico 2t.ha^{-1} . No solo foi adicionado adubação convencional NPK (08-28-16) e adubação de cobertura 1g de ureia por vaso 15 e 30 dias após o plantio. Foram semeadas 5 sementes do híbrido DKB 390 por vaso de acordo com os tratamentos, sendo seis vasos por tratamento (Tabela 1). As sementes dos tratamentos 1, 2, 3 e 4 foram submetidas a um processo de microbiolização com a cepa Lis 03. A bactéria foi multiplicada como citado anteriormente, a proporção de inóculo foi $7,5 \text{ mL.kg}^{-1}$ de sementes e adição de 0,5 g de adesivo Bioma Fix (Bioma).

Tabela 1 - Tratamentos utilizados no ensaio de casa de vegetação

Tratamento	Descrição
1	Semente microbiolizada + pulverização Lis 03
2	Semente microbiolizada + pulverização Lis 03 + fungo
3	Semente microbiolizada
4	Semente microbiolizada + fungo
5	Pulverização Lis 03
6	Pulverização Lis 03 + fungo
7	Controle negativo (água)
8	Controle positivo (fungo)

Fonte: Da autora (2021)

Quinze dias após a germinação foi feito o desbaste deixando três plantas por vaso. A pulverização da cepa Lis 03 ocorreu após as plantas atingirem o estágio fenológico V4,

utilizando os mesmos parâmetros para preparo da calda e pulverização descritos anteriormente. Cinco dias após a aplicação do antagonista foi feita a inoculação no colmo das plantas com 2 mL da suspensão de esporos do fitopatógeno utilizando seringa estéril. Para a avaliação da expressão enzimática, foram feitas coletas de material vegetal a cada três dias após inoculação do patógeno. As lesões do colmo foram avaliadas 25 dias após a inoculação em notas de um a oito de acordo com a escala diagramática desenvolvida por Nicoli et al. (2015). A porcentagem de redução da podridão foi calculada pela fórmula proposta por Abbott (1925) $(T-t)*100/T$, onde “T” representa a porcentagem da podridão do colmo no tratamento controle e “t” a porcentagem da podridão do colmo dos tratamentos com o antagonista.

2.5 Quantificação da atividade de enzimas de defesa

Os tecidos vegetais foram macerados em almofariz com adição de nitrogênio líquido para obtenção de um pó fino, este foi transferido para tubos Eppendorfs volume 2 mL preenchendo ¼ do volume, os extratos enzimáticos (EE) foram obtidos através da adição de 40 µL de Polivinilpirrolidona (PVP) e tampão de extração Tris HCl 50 mM pH 7,6 até completar o volume do tubo. As amostras foram agitadas em vórtex a 3000 rpm por 1 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 9300 g por 5 min, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e utilizado para quantificação de proteínas totais (Bradford, 1976), fenilalanina amonialiase (PAL) e glutathione redutase (GR). A reação para quantificação de proteínas totais consistiu em 10 µL de EE, 20 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 e 170 µL do reagente Bradford. A quantificação das proteínas ocorreu em espectrofotômetro Epoch (Biotek) a λ 595 nm utilizando o software Gen5 Data Analysis (Biotek).

O ensaio para quantificação da PAL foi montado em um volume final de 200 µL, sendo 10 µL do EE, 50 µL de L-fenilalanina a 50 mM e 140 µL de tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,6). A hidrólise do substrato L-fenil gera como produto o ácido trans-cinâmico que foi quantificado no comprimento de onda λ 280 nm como descrito por Alunni et al. (2003). A atividade da GR foi determinada através do método descrito por Schaedle e Bassham (1977) onde a oxidação de NADPH é monitorada em espectrofotômetro no comprimento λ 340 nm. As reações consistiram de 40 µL de EE, 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,6), NADPH 0,15 mM, MgCl₂ 3 mM e glutathione (GSSG) 1 mM. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) onde foi obtida uma curva padrão de proteínas totais com albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 U_g de proteína. Essa curva padrão foi utilizada para transformar as leituras das amostras correspondentes aos EE na

leituras do espectrofotômetro em dados de concentração de proteína solúvel. Assim, os valores foram transformados em unidades de enzimas (U) para cada enzima estudada.

3 Análise de estatística

Os dados foram testados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade pelo teste de Bartlett e submetidos a análise de variância (ANOVA). Quando os tratamentos foram significativos e atenderam aos pressupostos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises foram desenvolvidas utilizando o software R studio versão 1.4.1106.

4 Resultados

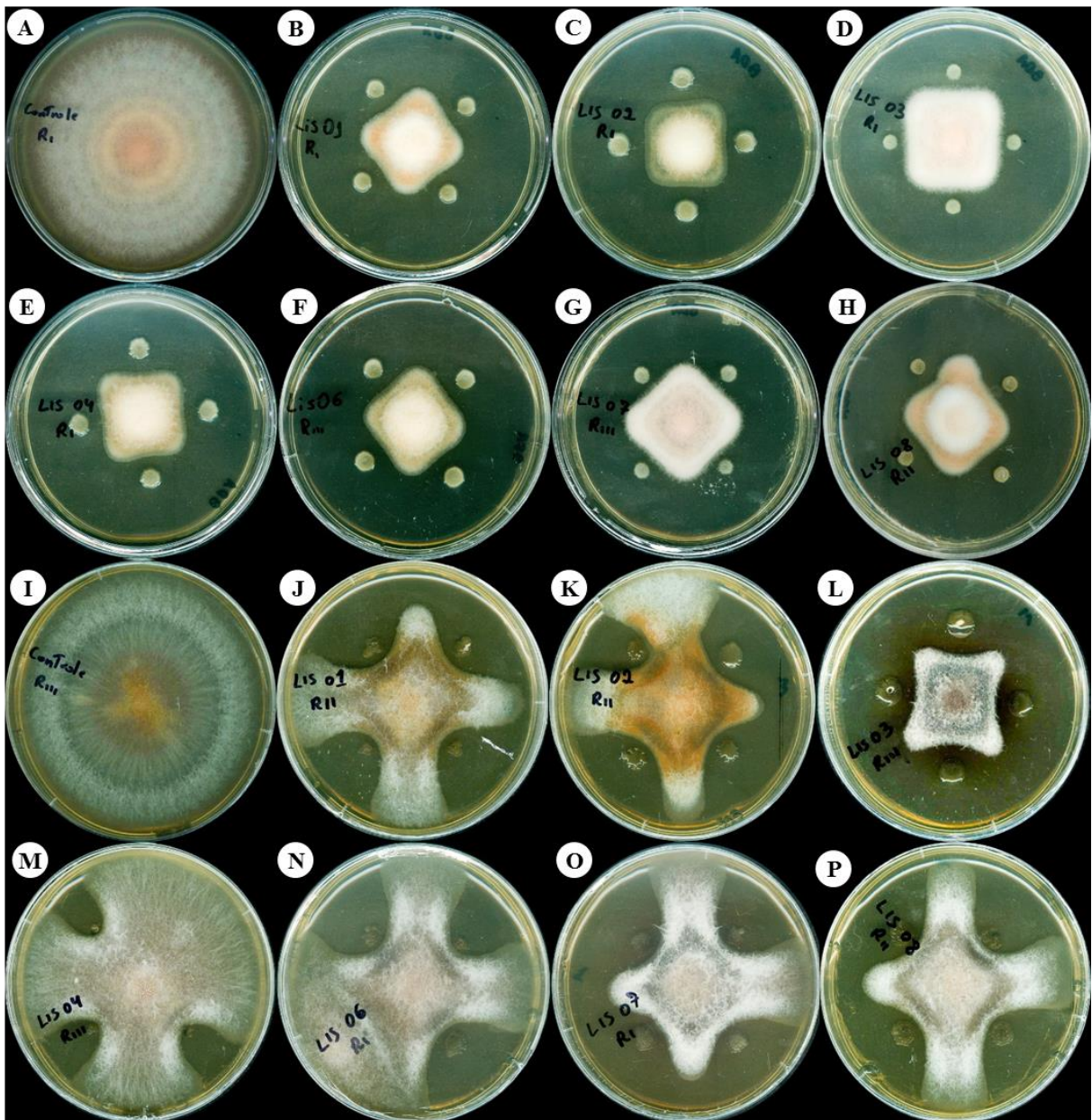
No ensaio de confronto direto entre as cepas de *P. polymyxa* e *F. verticillioides* (CML 2743) em meio BDA todas as cepas testadas apresentaram capacidade em antagonizar o fungo (Figura 1). As porcentagens de inibição oscilaram entre 81,22 a 72,68, no entanto os valores não foram diferentes estatisticamente quando comparados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (Tabela 2). Em meio malte, a cepa Lis 03 manteve a porcentagem de inibição ao patógeno enquanto as demais cepas apresentaram um decréscimo no antagonismo (Figura 1; Tabela 2). Isto indica que ao mudar a fonte de carbono algumas cepas podem reduzir a capacidade de produção de metabólitos secundários.

Tabela 2 - Inibição de *Fusarium verticillioides* CML 2743 por cepas de *Paenibacillus polymyxa* no confronto direto em diferentes meios de cultura. Letras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos através do teste de Tukey.

Isolado	Meio BDA		Meio Malte	
	Área fungo (cm ²)	Inibição (%)	Área fungo (cm ²)	Inibição (%)
CML 2743	43,51	.-	54,39	.-
Lis 01	8,17	81,22 a	36,22	33,41 b
Lis 02	10,49	75,88 a	36,10	33,63 b
Lis 03	10,23	76,48 a	12,82	76,42 a
Lis 04	9,28	78,67 a	46,95	13,69 b
Lis 06	11,88	72,68 a	43,39	20,23 b
Lis 07	11,40	73,79 a	33,78	37,90 b
Lis 08	10,29	76,35 a	29,74	45,33 ab

Fonte: Da autora (2021)

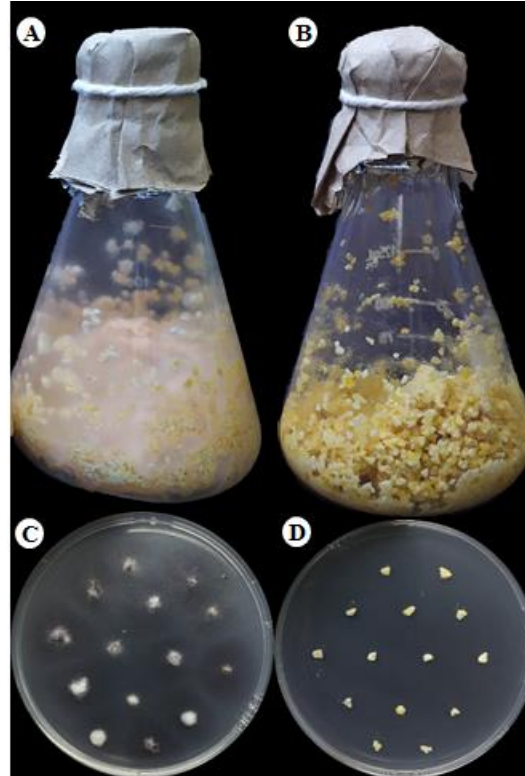
Figura 1 - Inibição de crescimento de *F. verticillioides* CML 2743 por *P. polymyxa* em meio BDA (A-H) e Malte (I-P). A e I: controle *F. verticillioides*. B e J: Lis 01. C e K: Lis 02. D e L: Lis 03. E e M: Lis 04. F e N: Lis 06. G e O: Lis 07. H e P: Lis 08.



Fonte: Da autora (2021)

Após sete dias das inoculações das bactérias e de *F. verticillioides* no milho triturado não foi possível identificar crescimento micelial do fungo na presença das sete cepas antagonistas (Figura 2B), no frasco controle (Figura 2A) houve crescimento micelial de *F. verticillioides*. Este resultado foi repetido e confirmado quando os grãos de milho triturado foram transferidos para o meio ágar-água (Figura 2 C-D).

Figura 2 - A - Milho triturado inoculado com *F. verticillioides* CML 2743. **B** - Milho triturado inoculado com cepas de *P. polomyxa* e *F. verticillioides* CML 2743. **C** - Milho triturado inoculado com *F. verticillioides* por sete dias e transferida para ágar-água. **D** - Milho triturado inoculado com cepas de *P. polomyxa* e *F. verticillioides* CML 2743 por sete dias transferidas para ágar-água.



Fonte: Da autora (2021)

Devido aos resultados obtidos no ensaio com meio malte, a cepa Lis 03 foi selecionada para os testes em campo e em casa de vegetação. Na avaliação da frequência de *Fusarium* em grãos das amostras obtidas no experimento em campo pelo método *blotter test*, identificamos os morfotipos *F. verticillioides*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* e *F. semitectum*. No morfotipo *F. verticillioides* foi observada a presença de cadeias longas de microconídios produzidas em monofiálides e em *F. proliferatum* a produção de microconídios em cadeias curtas a partir de polifiálides. Como marcador para o morfotipo *F. solani* foi observada a produção de conídios em falsas cabeças a partir de fiálides longas, enquanto para *F. oxysporum*, a produção de microconídios em falsas cabeças a partir de fiálides curtas. O morfotipo de *F. semitectum* foi reconhecido pela formação de macroconídio no micélio aéreo, disposto em um arranjo chamado “orelha de coelho”. A maior frequência de *F. verticillioides* ocorreu no tratamento 3 ($p \leq 0,05$). A pulverização das plantas de milho com o antagonista *P. polomyxa* Lis 03 reduziu a frequência do patógeno de origem natural (T1) e inoculado (T2) (Tabela 3).

Tabela 3 - Morfotipos de *Fusarium* (%) associados ao milho sob diferentes tratamentos.

Morfotipos	T1	T2	T3	T4
<i>F. verticillioides</i>	50 b	62 ab	83 a	60 ab
Sem <i>Fusarium</i>	6	8	0	9
Outros morfotipos	44	30	17	31
<i>F. proliferatum</i>	7	12	15	16

T1: pulverização com Lis 03 e infecção natural de *F. verticillioides*. **T2:** pulverização com Lis 03 e inoculação artificial de *F. verticillioides*. **T3:** inoculação artificial de *F. verticillioides*. **T4:** controle sem inoculação artificial. Letras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos através do teste Tukey.

Fonte: Da autora (2021)

No ensaio em casa de vegetação, utilizando a escala diagramática para podridão do colmo do milho (Nicoli et al., 2015) foi possível identificar redução da podridão do colmo nas plantas submetidas aos tratamentos 2 e 6, ambos com a presença da pulverização da bactéria. Os tratamentos 2 e 6 foram estatisticamente semelhantes, inibindo a podridão do colmo em 32,7% (Tabela 4). O controle negativo (T7), sem infecção com o fungo, recebeu nota 1 devido ao ferimento causado pela seringa (Figura 3 e 4). Houve menor crescimento de micélio no lado externo das lesões dos tratamentos 2 e 6 quando comparado com o controle (Figura 4). Os tratamentos 1, 3 e 5 não foram submetidos a inoculação do fungo, logo eles não foram avaliados quanto a lesão do colmo.

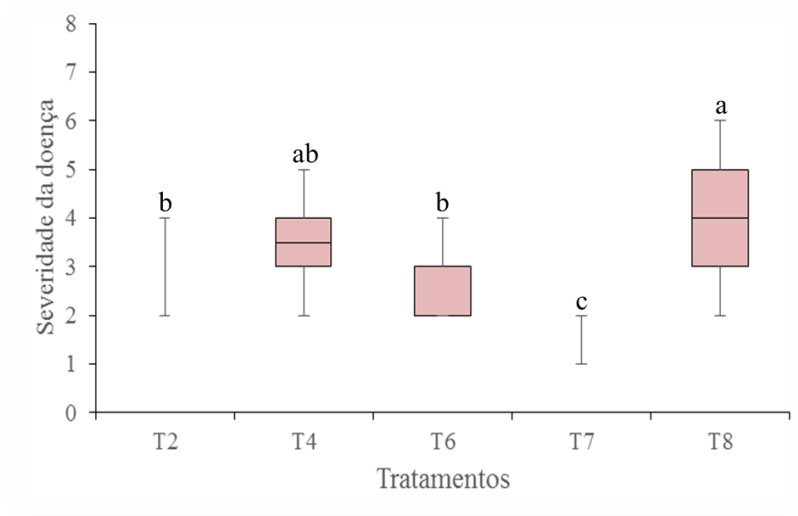
Tabela 4 - Severidade da podridão do colmo em milho causada por *F. verticillioides* sob diferentes tratamentos após 25 dias de infecção.

Trat.	Severidade da doença (%)	Redução da podridão (%)
2	29,94 b	32,72
4	36,16 ab	18,73
6	29,91 b	32,77
7	6,2 c	n.a.
8	44,5 a	n.a.

T2: microbiolização + pulverização com Lis 03 + fungo. **T4:** microbiolização + fungo. **T6:** pulverização com Lis 03 + fungo. **T7:** injeção de dH₂O autoclavada. **T8:** controle positivo (fungo). Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos através do teste de Tukey. n.a.: não se aplica.

Fonte: Da autora (2021)

Figura 3 - Notas de severidade da podridão do colmo de milho 25 dias após a inoculação com *F. verticillioides*. **T2**: microbiolização de semente + pulverização com Lis 03 + fungo. **T4**: microbiolização com Lis 03 + fungo. **T6**: pulverização com Lis 03. **T7**: controle negativo. **T8**: controle positivo.



Fonte: Da autora (2021)

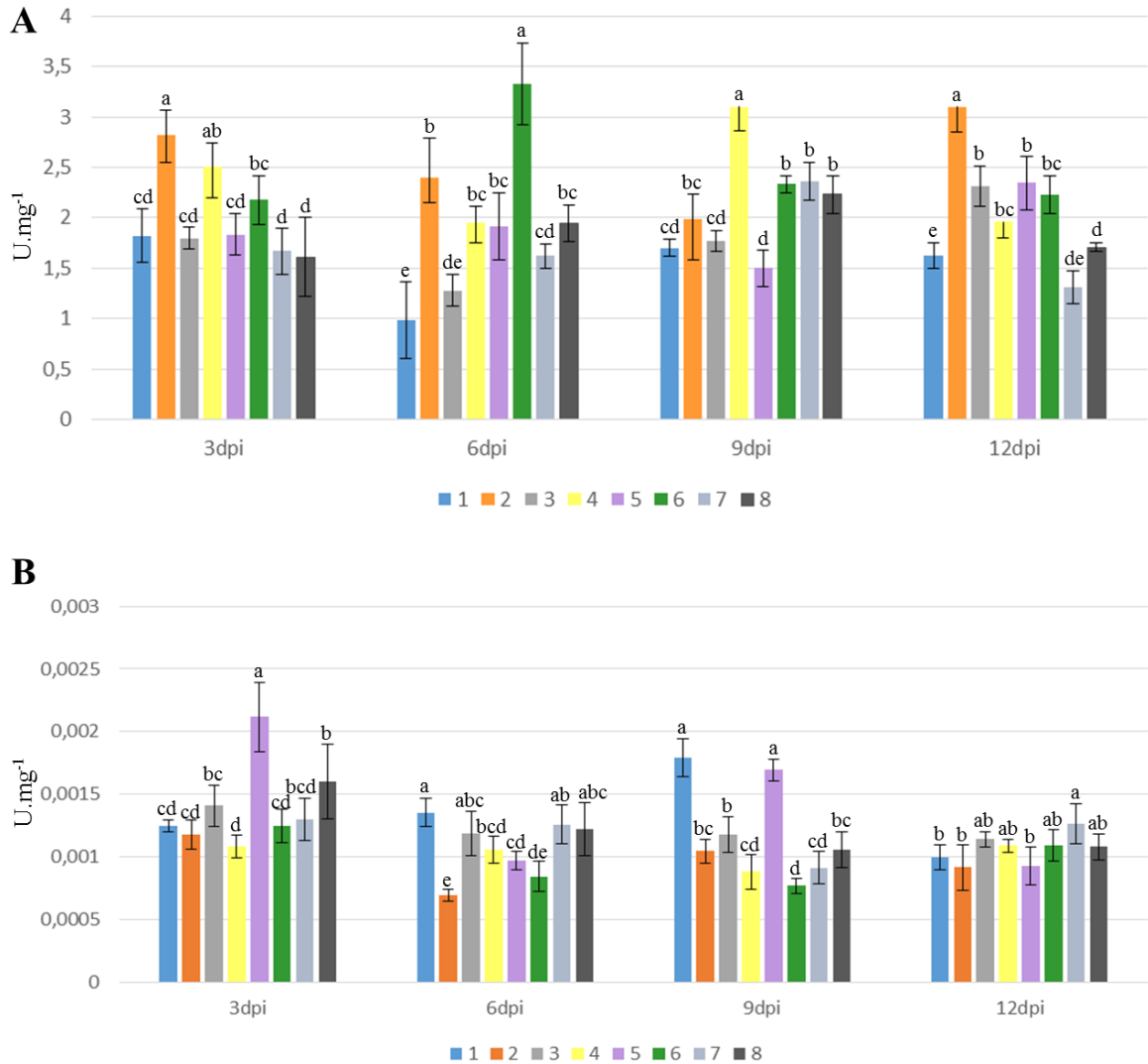
Figura 4 - Lesões do colmo induzidas pela inoculação de *F. verticillioides*. **A-D:** (T8) controle positivo (fungo). **E-H:** (T2) microbiolização de semente com Lis 03 + pulverização de Lis 03 + infecção com fungo. **I-L:** (T4) microbiolização com Lis 03 + infecção com fungo. **M-P:** (T6) pulverização de Lis 03 + infecção com fungo. **Q-T:** (T7) controle negativo (água).



Fonte: Da autora (2021)

A microbiolização de sementes com adição de pulverização de Lis 03 aumentou a atividade da enzima GR em até 82 % (T2-12 dias pós-inoculação - dpi) em comparação com o controle positivo (T8). A utilização da pulverização (T6) de forma isolada aumentou a atividade da enzima GR em cerca de 71% aos seis dias após a inoculação do patógeno. Quando utilizado apenas a microbiolização das sementes (T4) o aumento da GR (39%) aconteceu aos nove dias após a inoculação de *F. verticillioides* (Figura 5 - A). No entanto, para a PAL os tratamentos utilizados não foram eficientes em aumentar a atividade da enzima nas plantas desafiadas com *F. verticillioides*, mas apenas nos tratamentos 1 e 5 (3, 6 e 9 dpi), que não foram submetidos a inoculação artificial do patógeno (Figura 5 - B).

Figura 5 - Atividade de enzimas de defesa em plantas de milho submetidas a tratamentos com Lis 03 e *F. verticillioides*. **A** – Glutaciona redutase; **B** – Fenilalanina amônialiase. (1) Microbiolização + pulverização. (2) Microbiolização + pulverização + fungo. (3) Microbiolização. (4) Microbiolização + fungo. (5) Pulverização. (6) Pulverização + fungo. (7) Controle negativo (água). (8) Controle positivo (fungo). Letras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos através do teste de Tukey. dpi: dias pós-inoculação



. Fonte: Da autora (2021)

5 Discussão

Neste estudo evidenciamos que a aplicação de *P. polymyxa* Lis 03 pode ser eficiente na redução da incidência e severidade de *F. verticillioides*, tanto *in vitro*, quanto em casa de vegetação e em campo. A pulverização da bactéria em campo reduziu de 25% da frequência de *F. verticillioides* nos grãos e em casa de vegetação reduziu 33% da podridão do colmo. A pulverização de plantas de milho em condição de casa de vegetação também aumentou a atividade da enzima glutatona redutase, que desempenha um papel fundamental no equilíbrio de metabólitos reativos de oxigênio produzidos pelo estresse oxidativo (Gill et al., 2013).

Paenibacillus polymyxa Lis 03 teve efeito antagonista a *F. verticillioides in vitro*. Essa ação está relacionada com a produção dos metabólitos microbianos produzidos pela bactéria, evidente pela formação do halo de inibição nas placas. Lis 03 manteve sua capacidade inibitória em meio BDA e Malte, fato que indica que esta bactéria não é seletiva quanto aos nutrientes e consegue produzir seus metabólitos ativos utilizando diferentes fontes de carbono. Em um ensaio de confronto direto com uma cepa de *P. polymyxa* e os fungos *F. verticillioides* e *F. solani* foi possível observar inibição dos fungos testados com formação de halos maiores que três centímetros (Tupinambá et al., 2008). No Brasil, esta bactéria foi encontrada no alimento de larvas de abelhas e produziu fusaricidina *in vitro* com eficiência evidenciada contra fungos entomopatogênicos, os autores indicam a possibilidade de *P. polymyxa* estar atrelada a proteção das colônias de abelhas aos entomopatogênicos (Menegatti et al., 2018). A análise do genoma da cepa *P. polymyxa* E681 confirmou a presença de genes biossintéticos de substâncias antimicrobianas como a polimixina e fusaricidina. E681 também produz compostos voláteis que induzem o crescimento e a resistência sistêmica em plantas (Kim et al., 2010). O metabólito fusaricidina produzido por *P. polymyxa* JSa-9 foi capaz de atingir a parede celular, a membrana plasmática e o citoesqueleto de *F. verticillioides* gerando irregularidades e distorções, o conteúdo de quitina das hifas foi reduzido significativamente quando expostas a este composto. Houve menor produção de fumonisina B1 *in vitro* na presença deste composto (Han et al., 2017). *Paenibacillus polymyxa* tem sua capacidade antagônica comprovada no controle de *F. graminearum* e *F. culmorum in vitro* em grãos de trigo como substrato. A inoculação da bactéria inibiu o desenvolvimento dos dois patógenos avaliados. Após o período de incubação não foi possível quantificar o DNA dos fungos inoculados, micotoxinas também não foram encontradas (Abd El Daim et al., 2015).

A pulverização de *P. polymyxa* Lis 03 resultou na redução da frequência de *F. verticillioides*, tanto natural quanto inoculado em condição de campo. A frequência de *F.*

verticillioides foi 25% menor nas plantas pulverizadas com o antagonista e inoculadas (T2) do que nas plantas que foram apenas inoculadas com o patógeno (T3). Estes padrões positivos na redução da colonização dos grãos pelo patógeno podem melhorar a qualidade dos grãos representando menor quantidade de grãos ardidos e menor produção de fumonisinas. A área utilizada para instalação do experimento possui um histórico de plantio sucessivo de milho nos últimos anos e, provavelmente a palhada dos plantios anteriores serviu de fonte de inóculo para a infecção natural por *F. verticillioides*. A alta pressão de inóculo no campo, em conjunto com a inoculação artificial, dificultou a ação da bactéria. Outros fatores que podem favorecer a infecção natural por *F. verticillioides* são as condições ambientais e ataque de insetos que geram lesões nos tecidos (Munhoz et al., 2015). A presença de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* nos grãos não indica necessariamente a podridão ou a produção de micotoxinas, visto que as condições ambientais interferem diretamente na produção de metabólitos pelo fungo e que a produção destes metabólitos não é restrita apenas aos grãos sintomáticos (Munhoz et al., 2015; Pinto, 2005).

A pulverização de antagonistas em plantas de milho em condição de campo pode diminuir a população de *F. verticillioides* e sua produção de fumonisinas. A substituição da segunda pulverização de fungicida pela pulverização de uma bactéria antagonista (*Bacillus subtilis*) reduziu o teor de fumonisinas nos grãos (Guimarães et al., 2020a). O tratamento de sementes de milho com cepas antagonistas a *F. verticillioides* pode reduzir a infecção pelo fungo e o conteúdo de fumonisina B1 nos grãos, mas não modificaram o desempenho produtivo do milho em um estudo realizado na Argentina (Pereira et al., 2012). Os tratamentos utilizados neste estudo também não interferiram na produtividade do milho (dados não apresentados).

Em casa de vegetação, a pulverização de plantas de milho com *P. polymyxa* Lis 03 conferiu redução de 32,7% da severidade da podridão do colmo (T2 e T6). Estes resultados consorciaram com o aumento expressivo da atividade da enzima GR nesses tratamentos. A redução das lesões pode ser explicada por essa alta atividade da GR, o que permite inferir que *P. polymyxa* regula positivamente a atividade da GR tendendo a eliminar espécies reativas de oxigênio (EROs) e suprimir a fase necrófila de *F. verticillioides*.

A GR atua convertendo glutationa oxidada (GSSG) em glutationa reduzida (GSH) utilizando NADPH como co-fator. O equilíbrio de GR e GSH nas células determina a tolerância das plantas ao estresse abiótico. GSH é essencial na prevenção da oxidação e alterações no metabolismo do tiol durante a penetração de fungos (Gill et al., 2013; Maschietto et al., 2016). O processo de conversão de GSSG em GSH é fundamental para o ciclo glutationa-ascorbato

responsável pela eliminação de moléculas oxidativas como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o acúmulo dessas moléculas induz a morte celular da planta hospedeira e favorece a infecção. No entanto, o êxito da infecção depende da velocidade da modulação da resposta de defesa da planta (Maschietto et al., 2016). Com isso, a aplicação de microrganismos que melhorem as respostas de defesa antioxidativas pode reduzir a infecção das plantas por patógenos.

Genótipos de milho resistentes a *F. verticillioides*, quando desafiados com o patógeno, demonstraram um incremento significativo na atividade de GR. Este padrão destaca o papel dessa enzima na desintoxicação de metabólitos produzidos por *F. verticillioides* e uma possível difusão de micotoxinas (Maschietto et al., 2016). Em tomate, o tratamento de sementes com *Burkholderia gladioli* para controle biológico de nematóides aumentou em 65% a atividade de GR e reduziu a capacidade de infecção do patógeno em 54% (Khanna et al., 2019). Não houve aumento significativo na expressão da enzima PAL nas plantas tratadas com a bactéria e desafiadas com o patógeno. Entretanto, num estudo realizado com *Pseudomonas fluorescens* e *Trichoderma harzianum* foi observado um aumento dessa enzima após o tratamento de sementes de milho e pulverização foliar com a combinação desses organismos. O tratamento foi eficiente em suprimir a doença causada por *Rhizoctonia solani* e promoveu o crescimento das plantas (Madhavi et al., 2018).

A utilização de microrganismos com multi-mecanismos de controle biológico pode demonstrar efeitos aditivos e sinérgicos ao antagonismo e apresentar resultados melhorados quando comparados aos antagonistas de mecanismo único. Essa estratégia se encaixa na definição de manejo integrado de pragas, onde são utilizados vários mecanismos para a supressão da doença. Este efeito multi-mecanismo pode ser alcançado utilizando combinações de microrganismos antagônicos ou utilizando apenas um que possui diferentes mecanismos de ação (Guetsky et al., 2002; Gull, 2016; Sharon et al., 2011). Neste trabalho demonstramos a capacidade de Lis 03 em produzir metabólitos ativos com ação antagônica a *F. verticillioides in vitro* e a capacidade desse microrganismo em modular resposta de defesa eficiente para a redução da podridão do colmo em plantas de milho induzida por *F. verticillioides*.

Os resultados aqui obtidos demonstram a capacidade de *P. polymyxa* Lis 03 em antagonizar *F. verticillioides* em plantas milho, que ainda pode reduzir a contaminação nos grãos e diminuir a severidade da podridão do colmo. Podemos inferir que aplicação de *P. polymyxa* Lis 03 em plantas de milho pode melhorar a defesa da planta pela enzima GR, mas não pela enzima PAL. Dentre as formas de aplicação, a pulverização se destaca e apresenta resultados mais satisfatórios na ativação da rota enzimática quando comparado com a

microbiolização de semente. O êxito do controle biológico é dependente de uma série de variáveis que precisam ser consideradas (Timmusk et al., 2017). As condições do campo ainda podem oferecer limitações para o uso de agentes controle biológico. Diversos fatores podem influenciar negativamente a viabilidade do inóculo, como por exemplo o momento ideal de aplicação e a formulação do inoculante. A adição de protetores UV e substâncias adesivas podem proteger o antagonista de condições adversas (Herrera et al., 2020). Como a inserção de uma bactéria desprotegida em um nicho ecológico bem adaptado pode dificultar o estabelecimento da mesma, é importante fornecer um microambiente adequado para garantir a adaptação e sobrevivência do agente de controle biológico (Bashan et al., 2014). As condições fornecidas para o inóculo de *P. polymyxa* Lis 03 em condição de campo podem ter influenciado nos resultados obtidos, com isso é necessário compreender melhor as formas de aplicações bem como as formulações para aprimorar o desempenho desta cepa em campo.

Agradecimentos

A primeira autora deste trabalho recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e suporte da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

Legendas de Tabelas e Figuras

Tabelas

Tabela 1: Tratamentos utilizados no ensaio de casa de vegetação

Tabela 2: Inibição de *Fusarium verticillioides* CML 2743 por cepas de *Paenibacillus polymyxa* no confronto direto em diferentes meios de cultura. Letras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos através do teste de Tukey

Tabela 3: Incidência de diferentes morfotipos de *Fusarium* (%) associados ao milho sob diferentes tratamentos

Tabela 4: Severidade da podridão do colmo em milho causada por *F. verticillioides* sob diferentes tratamentos após 25 dias de infecção

Figuras

Figura 1: Inibição de crescimento de *F. verticillioides* CML 2743 por *P. polymyxa* em meio BDA (**A-H**) e Malte (**I-P**). **A e I:** controle *F. verticillioides*. **B e J:** Lis 01. **C e K:** Lis 02. **D e L:** Lis 03. **E e M:** Lis 04. **F e N:** Lis 06. **G e O:** Lis 07. **H e P:** Lis 08. 29

Figura 2: **A** - Milho triturado inoculado com *F. verticillioides* CML 2743. **B** - Milho triturado inoculado com cepas de *P. polymyxa* e *F. verticillioides* CML 2743. **C** - Milho triturado inoculado com *F. verticillioides* por sete dias e transferida para ágar-água. **D** - Milho triturado inoculado com cepas de *P. polymyxa* e *F. verticillioides* CML 2743 por sete dias transferidas para ágar-água. 30

Figura 3: Notas de severidade da podridão do colmo de milho 25 dias após a inoculação com *F. verticillioides*. **T2:** microbiolização de semente + pulverização com Lis 03 + fungo. **T4:** microbiolização com Lis 03 + fungo. **T6:** pulverização com Lis 03. **T7:** controle negativo. **T8:** controle positivo. 32

Figura 4: Lesões do colmo induzidas pela inoculação de *F. verticillioides*. **A-D:** (**T8**) controle positivo (fungo). **E-H:** (**T2**) microbiolização de semente com Lis 03 + pulverização de Lis 03 + infecção com fungo. **I-L:** (**T4**) microbiolização com Lis 03 + infecção com fungo. **M-P:** (**T6**) pulverização de Lis 03 + infecção com fungo. **Q-T:** (**T7**) controle negativo (água). 33

Figura 5: Atividade de enzimas de defesa em plantas de milho submetidas a tratamentos com Lis 03 e *F. verticillioides*. **A** – Glutathione redutase; **B** – Fenilalanina amônia-liase. **(1)** Microbiolização + pulverização. **(2)** Microbiolização + pulverização + fungo. **(3)** Microbiolização. **(4)** Microbiolização + fungo. **(5)** Pulverização. **(6)** Pulverização + fungo. **(7)** Controle negativo (água). **(8)** Controle positivo (fungo). Letras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos através do teste de Tukey. dpi: dias pós-inoculação. 35

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economic Entomology*. vol. 18, no. 1, pp. 265-267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>.
- ABD EL DAIM ISLAM, A., HÄGGBLÖM, P., KARLSSON, M., STENSTRÖM, E. and TIMMUSK, S. 2015. *Paenibacillus polymyxa* A26 Sfp-type PPTase inactivation limits bacterial antagonism against *Fusarium graminearum* but not of *F. culmorum* in kernel assay. *Frontiers in Plant Science*. vol. 6, pp. 368. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00368>.
- ALUNNI, S., CIPICIANI, A., FIORONI, G. and OTTAVI, L. 2003. Mechanisms of inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by phenol inhibitors and phenol/glycine synergistic inhibitors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. vol. 412, pp. 170–175. doi:10.1016/S0003-9861(03)00007-9.
- BASHAN, Y., DE-BASHAN, L.E., PRABHU, S.R. and HERNANDEZ, J.P. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil*. vol. 378, pp. 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye-binding. *Analytical Biochemistry*. vol. 72, pp. 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- BRESSAN, W. and FIGUEIREDO, J.E.F. 2003. Controle de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho por actinomicetos. *Comunicado Técnico*. vol 65, pp. 1-4.
- COSTA, R., DA SILVA, D., VIANA, L. and LANZA, F. 2012. Metodologia para inoculação de *Fusarium verticillioides* em milho, via solo, em casa de vegetação. *Circular Técnica*. vol. 179, pp. 496-503.
- GILL, S.S., ANJUM, N.A., HASANUZZAMAN, M., GILL, R., TRIVEDI, D.K., AHMAD, I., PEREIRA, E. and TUTEJA, N. 2013. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*. vol. 70, pp. 204-212, ISSN 0981-9428. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.032>.
- GUETSKY, R., SHTIENBERG, D., ELAD, Y., FISCHER, E. and DINOOR, A. (2002). Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology*. vol. 92, pp. 976–985. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2002.92.9.976>.
- GUIMARÃES, R.A., PERRYNY, P.E.P., MÜLLER, H., BERG, G., DE MEDEIROS, F.H. and CERNAVA, T. 2020b. Microbiome-guided evaluation of *Bacillus subtilis* BIOUFLA2 application to reduce mycotoxins in maize kernels. *Biological Control*, v. 150, p. 104370. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104370>.
- GUIMARÃES, R.A., ZANOTTO, E., PERRYNY, P.E.P., ZANOTTO, L.A.S., SILVA, L.J., MACHADO, J.C., PINTO, F.A.M.F., MEDEIROS, H.N., PINHO, R.G.V., MELO, I.S., SILVA, J.C.P., MEDEIROS, F.C.L. and MEDEIROS, F.H.V. 2020a. Integrating a chemical fungicide and *Bacillus subtilis* BIOUFLA2 ensures leaf protection and reduces ear rot

(*Fusarium verticillioides*) and fumonisin content in maize. *Journal of Phytopathology*. vol. 169, pp. 139-148. <https://doi.org/10.1111/jph.12968>.

GULL, M. (2016). Plant Health, Plant Growth, Everlon Cid Rigobelo, IntechOpen, DOI: 10.5772/64869.

HAN, J., WANG, F., GAO, P., MA, Z., ZHAO, S., LU, Z., LV, F., and BIE, X. 2017. Mechanism of action of AMP-jsa9, a LI-F-type antimicrobial peptide produced by *Paenibacillus polymyxa* JSa-9, against *Fusarium moniliforme*. *Fungal Genetics and Biology*. vol. 104, pp. 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.05.002>.

HERRERA, W., VALBUENA, O. and PAVONE-MANISCALCO, D. 2020. Formulation of *Trichoderma asperellum* TV190 for biological control of *Rhizoctonia solani* on corn seedlings. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, vol. 30, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00246-9>.

KHANNA, K., JAMWAL, V.L., KOHLI, S.K., GANDHI, S.G., OHRI, P., BHARDWAJ, R., WIJAYA, L., ALYEMENI, M.N. and AHMAD, P. 2019. Role of plant growth promoting Bacteria (PGPRs) as biocontrol agents of *Meloidogyne incognita* through improved plant defense of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Soil*. vol. 436, pp. 325–345. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-03932-2>.

KIM, J.F., JEONG, H., PARK, S.Y., KIM, S.B., PARK, Y.K., CHOI, S.K., RYU, C.M., HUR, C.G., GHIM, S.Y., OH, T.K., KIM, J.J., PARK, C.S. and PARK, S. H. 2010. Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681. *Journal of bacteriology*. vol. 192, pp. 6103–6104. <https://doi.org/10.1128/JB.00983-10>.

KÖHL, J., KOLNAAR, R., and RAVENSBERG, W.J. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*. vol. 10, pp. 1-19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>.

LESLIE, J.F. and SUMMERELL, B.A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. 1. ed. USA: Blackwell Publishing, 388 p.

MADHAVI, G., DEVI, G., KUMAR, K., BABU, T.R., and NAIDU, T. 2018. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* isolates in inducing systemic resistance (ISR) in maize against *Rhizoctonia solani* f. sp. *sasakii*. *International Journal of Chemical Studies*. vol. 6, pp. 628-632. P-ISSN: 2349–8528 E-ISSN: 2321–4902.

MASCHIETTO, V., LANUBILE, A., LEONARDIS, S.D., MAROCCO, A. and PACIOLLA, C. 2016. Constitutive expression of pathogenesis-related proteins and antioxidant enzyme activities triggers maize resistance towards *Fusarium verticillioides*. *Journal of Plant Physiology*. vol. 200, pp. 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.06.006>.

MENEGATTI, C., DA PAIXÃO MELO, W.G., CARRÃO, D.B., OLIVEIRA, A.R.M., NASCIMENTO, F.S., LOPES, N.P. AND PUPO, M.T. 2018. *Paenibacillus polymyxa* associated with the stingless bee *Melipona scutellaris* produces antimicrobial compounds against entomopathogens. *Journal of Chemical Ecology*. vol. 44, pp. 1158–1169. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-1028-z>.

- MICHAIL, S.H., MATHUR, S.B. and NEERGAARD, P. 1985. Infections of jute, maize and rice ot revealed by the standard blotter method of seed health testing. *Journal of Phytopathology*. vol. 113, pp. 193–199. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1985.tb00077.x>.
- MUNHOZ, A.T., DE CARVALHO, R.V., QUERALES, P.J., GONÇALVES, F.P. and CAMARGO, L.E.A. 2015. Relação entre resistência de linhagens tropicais de milho à podridão de espiga e ao acúmulo de fumonisinhas provocados por *Fusarium verticillioides*. *Summa Phytopathologica* [online]. v. 41, n. 2, pp. 144-148 ISSN 0100-5405. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1962>.
- NAZ, R., BANO, A., NOSHEEN, A., YASMIN, H., KEYANI, R., SHAH, S.T.A., ANWAR, Z. and ROBERTS, T.H. 2021. Induction of defense-related enzymes and enhanced disease resistance in maize against *Fusarium verticillioides* by seed treatment with *Jacaranda mimosifolia* formulations. *Scientific Reports*. v. 11, pp. 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79306-x>.
- NICOLI, A., COSTA, R.V., COTA, L.V., SILVA, D.D., ZAMBOLIM, L., LANZA, F.E., GUIMARÃES, D.P., and LANDAU, E.C. 2015. Validação de escala diagramática para quantificação da severidade da antracnose do colmo do milho. *Ciência Rural*. vol. 45, pp. 1720-1726. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141510>.
- PEREIRA, P., NESCI, A., CASTILLO, C. and ETCHEVERRY, M. 2012. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize, *Biological Control*, vol 53, pp. 258-266, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.02.001>.
- PINTO, N.F.J.A. 2005. Grãos ardidos em Milho. *Circular técnica*. vol. 66, Embrapa. ISSN 1679-1150.
- SCHAEDLE M. 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant physiology*. vol. 59, pp. 1011–1012. <https://doi.org/10.1104/pp.59.5.1011>.
- SHARON, E., CHET, I. and SPIEGEL, Y. (2011). *Trichoderma* as a biological control agent. *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes*. pp. 183–201. doi:10.1007/978-1-4020-9648-8_8.
- TIMMUSK, S., BEHERS, L., MUTHONI, J., MURAYA, A. and ARONSSON, A.C. 2017. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*. vol. 8, pp. 1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>.
- TUPINAMBÁ, G., DA SILVA, A.J., ALVIANO, C.S., SOUTO-PADRON, T., SELDIN, L., and ALVIANO, D.S. 2008. Antimicrobial activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE2 against some mycotoxin-producing fungi. *Journal of Applied Microbiology*. vol. 105, pp. 1044–1053. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03844.x>.