

# EFEITO DE BIOPROTETORES EM PATÓGENOS DE SEMENTES E NA EMERGÊNCIA E RENDIMENTO DE GRÃOS DE MILHO

WILMAR C. LUZ\*

Embrapa Trigo, Cx. Postal 451, CEP 99001-970 Passo Fundo, RS, Brasil, e.mail:wilmar@cnpt.embrapa.br

(Aceito para publicação em 05/12/2000)

LUZ, W.C. da. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. *Fitopatologia Brasileira* 26:16-20. 2001.

## RESUMO

Um experimento de laboratório e dois de campo, conduzidos nas localidades de Passo Fundo, RS, e Pato Branco, PR, foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos da microbiolização de sementes sobre os patógenos de sementes e sobre a germinação e rendimento de grãos de milho (*Zea mays*). Em laboratório, a maioria dos bioprotetores reduziu significativamente o nível de patógenos de sementes. Nos experimentos de campo, no ano de 1997, em Passo Fundo, RS, somente *Trichoderma harzianum* (T-22) melhorou significativamente a emergência e o rendimento de grãos do milho. Todos os bioprotetores melhoraram significativamente a emergência em Pato Branco (PR). *Paenibacillus macerans* (144), *T. harzianum* (T-22), *Flavimonas oryzihabitans* e *Pseudomonas putida* biótipo B também proporcionaram aumento significativo no rendimento de grãos em relação à testemunha. O tratamento com *T. harzianum* proporcionou aumento significativo na emergência de plântulas e no

rendimento de grãos de milho. Esse aumento foi de 615 kg/ha acima do rendimento da testemunha, sem tratamento. Em 1998, em Passo Fundo, *P. macerans* (144), *F. oryzihabitans* e *Agrobacterium radiobacter* proporcionaram os melhores aumentos na germinação. Com exceção de *F. oryzihabitans* e de *Bacillus subtilis*, todos os bioprotetores proporcionaram aumentos significativos no rendimento de grãos. Em Pato Branco, *P. putida* biótipo B 63, *F. oryzihabitans* e *Pseudomonas putida* biótipo A (M 970841) proporcionaram as melhores germinações de sementes de milho. *Paenibacillus macerans* (144), *T. harzianum* (T-22), *F. oryzihabitans*, *A. radiobacter* e *B. subtilis* aumentaram significativamente o rendimento de grãos. A microbiolização de sementes apresenta-se como uma alternativa tecnológica para o tratamento de sementes de milho no Brasil.

**Palavras-chave:** bioproteção, sementes, *Zea mays*, microbiolização.

## ABSTRACT

### Effect of bioprotectors on seed pathogens, seed emergence, and corn yield

The use of plant bioprotectors constitutes a modern tactic of seed treatment for corn (*Zea mays*) disease control without environmental hazards. Experiments were carried out under laboratory and field conditions in Passo Fundo, RS, and in Pato Branco, PR, Brazil, aimed at evaluating the effects of seed microbiolization on seed pathogens, seed emergence, and corn yield. In the laboratory, most bioprotectants significantly reduced pathogen recovery from infected corn seeds. In field experiments, in 1997, in Passo Fundo, only *Trichoderma harzianum* (T-22) significantly increased seedling emergence and corn yield. All bioprotectors significantly improved seed emergence in Pato Branco. *Paenibacillus macerans* (144), *T. harzianum* (T-22), *Flavimonas oryzihabitans*, and *Pseudomonas putida* biotype B also

provided a significant yield increase over untreated control. *T. harzianum* treatment showed a yield increase of 615 kg/ha over the untreated check. In 1998, in Passo Fundo, *P. macerans* (144), *F. oryzihabitans*, and *Agrobacterium radiobacter* provided the highest increases in seedling germination. All biological treatments, except *F. oryzihabitans* and *Bacillus subtilis*, showed significant yield increases. In Pato Branco, *Pseudomonas putida* biotype B, *F. oryzihabitans*, and *P. putida* biotype A (M 970841) provided the best corn seed emergence. *Paenibacillus macerans* (144), *T. harzianum* (T-22), *F. oryzihabitans*, *A. Radiobacter*, and *B. subtilis* significantly increased grain yield. Seed microbiolization is a promising technological alternative for corn seed treatment in Brazil.

## INTRODUÇÃO

A necessidade da microbiolização de sementes na agricultura mundial tem sido defendida enfaticamente (Luz,

1993, 1996a). Restrições ao uso de fungicidas e os cuidados com o meio ambiente reforçam claramente a necessidade de estudar táticas alternativas, como o uso de bioprotetores. A microbiolização de sementes tem sido realizada com vários patógenos e em várias culturas (Harman, 1991; Kloepper, 1991; Luz, 1991, 1993, 1996a).

\* CNPq fellow

Na cultura de milho, alguns trabalhos foram realizados com resultados positivos (Callan *et al.*, 1990, 1991; Chang & Kommedahl 1968; Harman *et al.*, 1989; Kommedahl & Mew, 1975; Luz *et al.*, 1997a, 1997b) no controle de alguns patógenos. No Brasil, os trabalhos iniciais indicaram que alguns bioprotetores apresentam efeitos benéficos significantes na cultura de milho (Luz 1996 a,b, 1998a). O objetivo deste estudo foi examinar os efeitos da microbiolização de sementes no controle de patógenos, na emergência e no rendimento de grãos de milho (*Zea mays* L.).

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em Passo Fundo, RS (Embrapa Trigo), e em Pato Branco, PR (IAPAR). As sementes do híbrido XL 561, suscetível aos patógenos das sementes de milho, usadas neste estudo foram obtidas da empresa Braskalb.

Os tratamentos foram: *Paenibacillus macerans* (Embrapa Trigo 144), 7,5 g para 100 kg de sementes, *Trichoderma harzianum* (Rifai) (Bioworks T-22), 250 g para 100 kg de sementes, e *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) von Arx (Bioworks G-41), 250 g para 100 kg de sementes de trigo, *Pseudomonas putida* biótipo B (63), *Pseudomonas putida* biótipo A (M 953731 Bg e M 970841), *Flavimonas oryzihabitans* (M953711), *Agrobacterium radiobacter* (M953731c), *Bacillus subtilis* (M972511 e duas bactérias não identificadas (M961111 e M953921, usadas somente em 1997). Para os oito últimos bioprotetores (também da Embrapa Trigo), usaram-se culturas desenvolvidas em 1/4 BDA, por 24 h a  $23 \pm 2$  °C. As células foram removidas da superfície do meio de cultura com um pincel e colocadas em água esterilizada, e a concentração de cada antagonista foi de aproximadamente  $10^7$  unidades formadoras de colônias/ml. Uma suspensão foi, então, aplicada, mergulhando-se as sementes por 3 min e deixando-as secar em temperatura ambiente por 24 h. Uma testemunha sem tratamento, embebida somente em água destilada por 3 min e deixada secar da mesma maneira que as sementes tratadas com os bioprotetores, foi usada para comparação. Para o experimento de laboratório, cada tratamento foi replicado quatro vezes (100 sementes, cinco sementes por placa) e colocado sob luz negra sob fotoperíodo de 12 h a  $24 \pm 2$  °C. O arranjo experimental foi em desenho inteiramente casualizado. A presença de fungos patogênicos foi determinada cinco dias após o plaqueamento. Os dados foram expressos em percentagem de cada patógeno nas sementes.

Nos experimentos de campo, as parcelas foram compostas de quatro fileiras de cinco metros cada uma. O espaçamento entre fileiras foi de um metro, e entre sementes, de 20 centímetros. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições. A emergência de sementes foi avaliada 30 dias após a semeadura. Os grãos foram colhidos e pesados. Os dados dos tratamentos foram submetidos à análise de variância, e as médias foram separadas, usando-se

o teste de LSD de Fisher, ao nível de 0,05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos experimentos de laboratório, as sementes de milho apresentaram-se severamente contaminadas com os fungos *Fusarium graminearum* (Schw.), *Fusarium moniliforme* (Sheldon), *Diplodia maydis* (Beek) Sacc. e *Aspergillus* spp., principalmente de *A. glaucus* (Link ex Gray) e *A. flavus* (Lk. ex.Fr) (Tabela 1). A incidência de patógenos em 1997 foi superior à de 1998.

A maioria dos bioprotetores reduziu significativamente o nível de infecção de patógenos nas sementes, destacando-se *P. macerans* e *B. subtilis* e os biótipos A e B de *P. putida*, *Trichoderma harzianum* e *T. virens* foram particularmente eficientes no controle de *F. graminearum* e de *D. maydis*, mas não apresentaram eficiência contra *F. moniliforme* e contra *Aspergillus* spp.

Nos experimentos de campo, no ano de 1997, em Passo Fundo, RS, somente *T. harzianum* (T-22) aumentou significativamente a emergência e o rendimento de grãos da cultura de milho (Tabela 2). Todos os bioprotetores aumentaram significativamente a emergência de sementes em Pato Branco (PR) (Tabela 3). *Paenibacillus macerans* (144), *T. harzianum* (T-22), *F. oryzihabitans* e *P. putida* biótipo B proporcionaram também aumento significativo no rendimento de grãos em relação à testemunha. O tratamento com *T. harzianum* proporcionou aumento significativo na emergência de plantas e no rendimento de grãos de milho. Quando *P. macerans* (144) foi usado em Pato Branco, o aumento atingiu 723 kg/ha acima do rendimento da testemunha, sem tratamento.

Em 1998, em Passo Fundo, *P. macerans* (144), *F. oryzihabitans* e *A. radiobacter* proporcionaram os maiores aumentos de emergência (Tabela 2). Com exceção de *F. oryzihabitans* e de *B. subtilis*, os bioprotetores proporcionaram aumentos significativos no rendimento de grãos. Em Pato Branco, *P. putida* biótipo B, *F. oryzihabitans* e *P. putida* biótipo A (M970841) proporcionaram as melhores emergências de sementes de milho (Tabela 3). *P. macerans* (144), *T. harzianum* (T-22), *F. oryzihabitans*, *A. radiobacter* e *B. subtilis* aumentaram significativamente o rendimento de grãos. Nenhum sintoma de fitotoxidez foi observado no experimento. A ação desses bioprotetores está ligada ao controle de fungos patogênicos de sementes que causam má germinação, início ou aumento de inóculo de patógenos que facilitam o desenvolvimento de doenças em sementes, em plântulas e em planta adulta, reduzindo o rendimento de grãos de milho. Entretanto, o efeito de *F. oryzihabitans* parece estar ligado a fatores não relacionados com o controle direto de patógenos, uma vez que esse microrganismo não apresentou eficiência contra os fungos patogênicos (Tabela 1). Mecanismos de ação, tais como indução de resistência, fitohormônios, mineralização de nutrientes e outros, podem estar envolvidos (Boronin *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995 a,b; Kloepper *et al.*, 1992; Luz, 1996a). Esses mecanismos de ação também podem estar agindo em interação com o

**TABELA 1 - Efeito de bioprotetores aplicados em sementes de milho (*Zea mays*) sobre a redução de patógenos. Passo Fundo, RS**

Tratamento	Porcentagem de patógenos nas sementes *							
	<i>Fusarium graminearum</i> **		<i>Diplodia maydis</i>		<i>Fusarium moniliforme</i>		<i>Aspergillus</i> spp.	
	1997	1998	1997	1998	1997	1998	1997	1998
Testemunha	22 c	11 d	14 c	10 d	31 b	2 b	22 c	4 c
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	20 c	11 d	4 b	0 a	30 b	2 b	22 c	4 c
<i>Bacillus subtilis</i> (em 1998)	-	0 a	-	0 a	-	0 a	-	1 a
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	20 c	11 d	0 a	8 d	29 b	2 b	19 c	3 c
M 9611.1.1. B (em 1997)	22 c	-	2 b	-	30 b	-	22 c	-
M9539.2.1 lev (em 1997)	21 c	-	2 b	-	30 b	-	22 c	-
<i>Paenibacillus macerans</i> (144)	4 a	5 b	0 a	2 b	15 a	0 a	4 a	0 a
<i>Pseudomonas putida</i> biót A (M953731Bg)	6 b	7 c	0 a	8 d	15 a	0 a	11 b	4 c
<i>P. putida</i> biót A (M970841, em 1998)	-	7 c	-	4 c	-	2 b	-	2 b
<i>P. putida</i> biót B (63)	6 b	7 c	2 b	2 b	16 a	0 a	12 b	3 c
<i>Trichoderma harzianum</i> (T-22)	2 a	0 a	0 a	0 a	31 b	2 b	22 c	4 c
<i>T. virens</i> (G-41)	2 a	0 a	0 a	2 b	31 b	2 b	21 c	4 c
CV%	4.7	5.2	6.1	2.3	9.4	2.1	9.2	2.1

\*Média de 4 repetições. Dados seguidos por letras iguais nas colunas não diferem entre si, de acordo com o teste de LSD de Fisher, a p=0,05.

**TABELA 2 - Efeito do tratamento de sementes com bioprotetores na emergência (%) e no rendimento de grãos (kg/ha) de milho (*Zea mays*). Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS**

Tratamento	Emergência (%)*		Rendimento (kg/ha)*	
	1997	1998	1997	1998
Testemunha	78 b	89 c	7.268 b	4.966 c
<i>Agrobacterium radiobacter</i> (M953731C)	79 b	94 a	7.300 b	5.286 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (M952511, em 1998)	-	91 bc	-	5.141 bc
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> (M53711)	80 b	93 a	7.295 b	5.141 bc
M 961111 (em 1997)	78 b	-	7.275 b	-
M953921 lev (em 1997)	78 b	-	7.273 b	-
<i>Paenibacillus macerans</i> (144)	80 b	94 a	7.292 b	5.335 a
<i>Pseudomonas putida</i> biót A (M953731Bg)	80 b	90 c	7.340 b	5.283 ab
<i>Ps putida</i> biót A (M970841) (em 1998)	-	92 b	-	5.213 ab
<i>P. putida</i> biót B (63)	79 b	92 b	7.313 b	5.302 a
<i>Trichoderma harzianum</i> (T-22)	88 a	91 bc	7.883 a	5.318 a
<i>T. virens</i> (G-41)	83 b	91 bc	7.301 b	5.350 a
C.V.%	10,3	11,3	9,3	13,5

\*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de LSD de Fisher, a 5% de probabilidade.

controle direto de patógenos para os outros bioprotetores (Luz, 1996a).

Nos experimentos, alguns bioprotetores presentes controlaram os patógenos de sementes, melhoraram a emergência de plântulas e aumentaram o rendimento de grãos de milho. Outros estudos apresentaram evidências similares usando *P. macerans*, *P. putida* biótípico B e outros bioprotetores (Luz, 1996 a, b; Luz 1998a; Luz *et al.*, 1997 a,b). Benefícios semelhantes foram mostrados com *T. harzianum* (Harman *et al.*, 1989; Luz, 1998a) e com *B. subtilis* (Chang & Kommedahl, 1968).

O tratamento de sementes de milho com fungicidas no Brasil é uma prática usada para protegê-las contra as podridões de sementes, morte e tombamento de plantas induzidos por fungos na semente ou no solo (Luz, 1997a). A

maioria dos híbridos comercializados são previamente tratados com fungicidas.

Vários fungicidas têm sido investigados com resultados de eficiência contra os principais patógenos de milho (Luz 1996c,d, 1997a,b,c, 1998b; Luz & Pereira, 1998). Contudo, há necessidade de usar produtos biológicos que sirvam como alternativa e apresentem controle dos principais patógenos e aumento de rendimento de grãos da cultura. Por esse motivo, os resultados mostrados no presente estudo demonstraram que os bioprotetores apresentam-se como uma tecnologia alternativa para o tratamento de sementes de milho. Esses bioagentes poderão ter um importante impacto na redução do uso excessivo de fungicidas, no alcance da agricultura sustentável e na proteção do ambiente.

**TABELA 3 - Efeito do tratamento de sementes com bioprotetores na emergência (%) e no rendimento de grãos (kg/ha) de milho (*Zea mays*), Embrapa Trigo, Pato Branco, PR**

Tratamento	Emergência (%)*		Rendimento (kg/ha)*	
	1997	1998	1997	1998
Testemunha	70 d	83 cd	5.462 c	5.832 c
<i>Agrobacterium radiobacter</i> (M953731C)	82 b	85 bc	5.669 bc	6.632 a
<i>Bacillus subtilis</i> (M952511, em 1998)	-	83 cd	-	6.772 a
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> (M53711)	80 bc	86 ab	6.035 a	6.700 a
M 961111 (em 1996/97)	82 b	-	5.684 bc	-
M953921 lev (em 1997)	78 c	-	5.678 bc	-
<i>Paenibacillus macerans</i> (144)86 A	86 a	83 cd	6.185 a	6.542 ab
<i>Pseudomonas putida</i> biót A (M953731Bg)	77 c	85 bc	5.771 bc	5.911 c
<i>P. putida</i> biót A (M970841) (em 1998)	-	86 ab	-	5.892 c
<i>P. putida</i> biót B(63)	81 bc	88 a	5.875 b	6.100 c
<i>Trichoderma harzianum</i> (T-22)	79 c	83 cd	6.040 a	6.500 ab
<i>T. virens</i> (G-41)	79 c	84 cd	5.623 bc	5.832 c
C.V.%	12,4	10,8	12,3	14,4

\*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de LSD de Fisher, a 5% de probabilidade.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORONIN, A.M., KOCHETKOV, V.V., DUBEIKOVSKI, A.N. & MORDUKHOVA, E.A. Biological control of soilborne plant pathogens by PGPR *Pseudomonas* isolated in Russia. Resumos, 7º International Congress of Plant Pathology, Montreal, Canada, International Society of Plant Pathology. 1993. p. 276.
- CALLAN, N.W., MATHRE, D.E. & MILLER, J.B. Bio-priming seed treatment for biological control of *Pythium ultimum* preemergence damping-off in sh2 sweet corn. Plant Disease. 74:368-372. 1990.
- CALLAN, N.W., MATHRE, D.E. & MILLER, J.B. Field performance of sweet corn seed bio-primed and coated with *Pseudomonas fluorescens* AB254. HortScience 26:1163-1169. 1991.
- CHANG, I. & KOMMEDAHL, T. Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. Phytopathology 58:1395-1401. 1968.
- HARMAN, G.E. Deployment tactics for biocontrol agents in plant pathology. In: BAKER, R. & DUNN, P.E. (Eds.) New directions in biological control. Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. New York, Liss., 1989. pp.779-792.
- HARMAN, G.E. Seed treatments for biological control of plant disease. Crop Protection 10:166-71. 1991.
- KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents of soilborne diseases. In: The biological control of plant diseases. Ed. J. BAY-PETERSON (Ed.). Taiwan, Food and Fertilizer Technological Center. 1991. pp. 142-152.
- KOMMEDAHL, T. & MEW, I. C. Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonists. Phytopathology 65: 296-300. 1975.
- LIU, L., KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology 85:843-847. 1995a.
- LIU, L., KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology 85:695-698. 1995b.
- LUZ, W.C. da. Controle biológico das doenças na espermosfera. In: Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA, 1991. pp. 25-31.
- LUZ, W.C. da. Microbiolização de sementes para o controle das doenças das plantas. In: LUZ, W.C. da, FERNANDES, J.M.C., PRESTES, A.M. & PICININI, E.C. (Eds.). Revisão Anual de Patologia de Plantas, v.1, 1993. pp. 33-77.
- LUZ, W. C. da. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. In: LUZ, W.C. da, FERNANDES, J.M.C. & PRESTES, A.M. & PICININI, E.C. (Eds.). Revista Anual de Patologia de Plantas, v. 4. Passo Fundo, RS. 1996a. pp.1-47.
- LUZ, W.C. da. Efeito de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas de trigo e de milho. Fitopatologia Brasileira 21:434. 1996b.
- LUZ, W.C. da. Tratamento de sementes de milho com fungicidas. Circular Técnica nº 7. Embrapa Trigo. 1996c.
- LUZ, W.C. da. Espectro de ação de novos fungicidas para tratamento de sementes de milho e seus efeitos no rendimento. Fitopatologia Brasileira, 21:369. 1996d.
- LUZ, W.C. da. Espectro de ação de fungicidas contra fungos de sementes de milho. Resumo, 21º Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Londrina, PR. Resumos. Londrina: IAPAR, p.288. 1996a.
- LUZ, W.C. da. Tratamento de sementes de milho com fungicidas. Circular Técnica nº 7. 2ª edição. Embrapa

- Trigo. 24p. 1997a.
- LUZ, W.C. da. Evaluation of seed treatment fungicides for emergence and yield of corn. *Fungicide & Nematicide Tests* 52:303. 1997b.
- LUZ, W.C. da. Effect of seed treatment on corn pathogen control, stand, and yield. *Fungicide & Nematicide Tests*, 52:303. 1997c.
- LUZ, W.C. da. Efeito de bioprotetores na germinação e no rendimento de grãos de milho. *Anais, 21º Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Recife, PE.* 1998a. p.227.
- LUZ, W.C. da. Efficacy of chemical seed treatments in controlling seed decay of corn. *Fungicide & Nematicide Tests* 53:390. 1998b.
- LUZ, W.C. da & PEREIRA, L.R. Tratamento de sementes com fungicidas relacionado com o controle de patógenos e rendimento de milho. *Ciência Rural* 28:537-541. 1998.
- LUZ, W.C. da., BERGSTRON, G.C. & STOCKWELL, C.A. Seed microbiolization for control of *Fusarium* species in cereais. *Phytopathology* 87:522. 1997a. (Abstract).
- LUZ, W.C. da, BERGSTRON, G.C. & STOCKWELL, C.A. Seed bioprotectants for control of *Fusarium* on wheat and corn. *Proceedings of the First National Head Blight Forum.* St. Paul, Mn, USA. 1997b.