

## Biocontrole de *Fusarium verticillioides* a partir de microrganismos isolados do milho

### Biocontrol of *Fusarium verticillioides* from microorganisms isolated from corn

Tiago Santos Carmo Cabral<sup>1</sup>, Elisabete Hiromi Hashimoto<sup>2</sup>

#### RESUMO

*Fusarium verticillioides* é um importante contaminante de grãos, principalmente milho. Além de afetar a planta, o principal problema é a produção de fumonisina. Essa micotoxina pode causar diversos danos à saúde, tanto animal quanto humana. Em vista disso, a inibição deste fungo é uma alternativa para o controle da contaminação pelo fungo e consequentemente pela fumonisina. O presente trabalho teve por objetivo testar diferentes microrganismos, isolados do milho, em sua atividade antifúngica para o controle de *F. verticillioides*. Foram testados 21 microrganismos previamente isolados de quatro amostras de milho provenientes da região dos Campos Gerais (Ponta Grossa) e região Norte do Paraná (Londrina) de diferentes partes da espiga (folha, cabelo e grãos). Sendo isolados nove microrganismos do cabelo, cinco do grão, seis da folha, além de um isolado de uma contaminação laboratorial. Destes, sete apresentaram bons resultados de biocontrole, com taxas de inibição acima de 50%, com isso a pesquisa ainda deve continuar com mais testes para verificar o mecanismo de inibição de crescimento.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fumonisina. *Fusarium verticillioides*. Micotoxina.

#### ABSTRACT

*Fusarium verticillioides* is an important contaminant of grains, especially corn. In addition to affecting the plant, the main problem is the production of fumonisin. This mycotoxin can cause various harm to health, both animal and human. In view of this, the inhibition of this fungus is an alternative for controlling contamination by the fungus and consequently, fumonisin. The present work aimed to test different microorganisms, isolated from corn, for their antifungal activity for the control of *F. verticillioides*. 21 microorganisms previously isolated from four corn samples from the Campos Gerais region (Ponta Grossa) and the Northern region of Paraná (Londrina) were tested from different parts of the cob (leaf, hair and grains). Nine microorganisms were isolated from the hair, five from the grain, six from the leaf, in addition to one isolated from laboratory contamination. Of these, seven showed good biocontrol results, with inhibition rates above 50%, so research must continue with more tests to verify the growth inhibition mechanism.

**KEYWORDS:** Fumonisin. *Fusarium verticillioides*. Micotoxin.

## INTRODUÇÃO

O milho é uma das principais culturas agrícolas do Brasil e do mundo, tendo grande importância socioeconômica, servindo para fins de alimentação animal até para indústrias de alta tecnologia (EMBRAPA, 2021). Estima-se que os fungos são responsáveis por aproximadamente 65% das perdas nas safras (AZEEM et al., 2022) *Fusarium verticillioides*, um dos principais contaminantes do milho, afeta quase toda a planta, podendo causar diferentes sintomas de doença, como podridão de colmo e de espiga. Além dos danos à planta, o produto do metabolismo secundário desse fungo, a fumonisina (uma micotoxina), pode causar vários danos tanto à saúde humana quanto à animal. A contaminação por esse fungo se dá através das sementes e de lesões e feridas na planta adulta (DE FÁTIMA DIAS DINIZ, et al. 2021). Rocha et al. (2011) citados por

<sup>1</sup> Voluntário PIVIC. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. [tcabral@alunos.utfpr.edu.br](mailto:tcabral@alunos.utfpr.edu.br). ID Lattes: 2713185392649165.

<sup>2</sup> Docente no Departamento Acadêmico de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. [elisabete@utfpr.edu.br](mailto:elisabete@utfpr.edu.br). ID Lattes: 2913931020821513.

DEEPA et al.(2021) selecionaram amostras de grãos de milho do Brasil e detectaram quase 96% de frequência de *F. verticillioides* (ACHAR; SREENIVASA, 2021).

Várias instituições públicas, como o comitê de especialistas em aditivos alimentares da FAO/OMS, a Food and Drug Administration dos EUA e a Comissão Europeia, estabeleceram limites máximos tolerados de fumonisina em cereais. No Brasil, a regulação de micotoxinas é determinada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) estabelecendo um limite de 2000 ug/kg para milho de pipoca e 200 ug/kg de fumonisina em alimentos a base de cereais para alimentação infantil (BRASIL, 2011).

A principal ferramenta para controle de fungos fitopatógenos são os fungicidas sintéticos. Apesar de eficiente, essa alternativa se mostra prejudicial, podendo causar danos ao ambiente e à saúde. Uma alternativa para o uso dos agrotóxicos é o controle biológico, por meio da utilização de microrganismos que façam a inibição do crescimento do patógeno de forma natural (AZEEM et al., 2022). A utilização de antagonistas do ambiente natural facilita a eficácia do controle biológico, uma vez que esses já estão melhor adaptados às condições(DINIZ et al., 2021).

O presente trabalho teve como objetivo selecionar microrganismos presentes na espiga de milho com atividade antifúngica para controle de *F. verticillioides in vitro*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### AMOSTRAS

Para o isolamento de microrganismos foram utilizadas quatro amostras de milho verde composta por aproximadamente 10 espigas: uma amostra foi coletada da região dos Campos Gerais (Ponta Grossa- PR) e três do norte do Paraná (Londrina – PR).

### PREPARO DAS AMOSTRAS

Cada amostra de milho foi descascada, debulhada, e separado o cabelo, as folhas e os grãos de milho. Os grãos de milho foram homogeneizados e então foi realizado o quarteamento até um peso aproximado de 100 g. Os grãos desse quarteamento foram então triturados em um liquidificador industrial de forma asséptica. As folhas e os cabelos de milho foram cortados com faca de forma asséptica. As amostras trituradas e cortadas foram adicionadas em erlenmeyer contendo 225 mL de Água peptonada 0,1% (m/v) estéril. As amostras foram submetidas à diluição seriada em tubos contendo água peptonada até a diluição  $10^{-6}$ . Com o auxílio de uma micropipeta foi então inoculado *pour plate* 1 mL das diluições em placas de Petri estéreis e depois adicionado ágar batata dextrose (BDA, 39 g/L) estéril. As placas foram incubadas por 7 dias à 28 °C.

### ISOLAMENTO DE MICRORGANISMO

Após o crescimento das colônias foi realizado a seleção de colônias com características de leveduras. As colônias foram isoladas em BDA por estrias de esgotamento e incubadas em temperatura de aproximadamente 25 °C. Após crescimento foram conservadas sob refrigeração. Foram testados nove microrganismos diferentes do cabelo do milho, cinco do milho e seis da folha da planta, além de um isolado

posteriormente como contaminação em uma placa, que aparentava ter inibição de *Fusarium verticillioides*.

## CODIFICAÇÃO DE MICRORGANISMO TESTE

Os microrganismos isolados foram nomeados com códigos de acordo com a amostra e a parte de onde foi isolado. As amostras receberam um número referente a amostra, seguido por uma letra “G” quando isoladas dos grãos, letra “F” quando isoladas da folha e letra “C” quando isoladas do cabelo. A letra é seguida por um número linha (1’) que é o número do isolado. O isolado de uma contaminação recebeu código “ALE”.

## REATIVAÇÃO DE *Fusarium verticillioides*

*Fusarium verticillioides* cepa 103F reconhecido pela produção de fumonisina (MOREY et al., 2009) foi inoculado em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI 37 g/L) a 28 °C, por 3 dias. Após turbidez do caldo, uma alíquota foi inoculada em BDA para crescimento e isolamento. Após o isolamento do *F. verticillioides* esse foi conservado sob refrigeração e repiques periódicos. O crescimento foi testado em BDA e Ágar YM. Destaca-se que esse procedimento foi necessário, pois a cepa estava guardada há muito tempo sob refrigeração.

## TESTE DE ANTAGONISMO

Para verificar a atividade inibitória das cepas isoladas foi preparado placas de Petri estéreis e adicionada a essas ágar batata dextrose (BDA) estéril. Foi então inoculado no centro de cada placa, uma alçada de *F. verticillioides* previamente reativado em BDA. Em seguida foram inoculados uma alçada 4 microrganismos isolados, escolhidos de forma aleatória, em cada placa a uma distância de 2 cm do centro contendo *F. verticillioides*. As placas do teste, incluindo uma controle apenas com *F. verticillioies*, foram incubadas em estufa por 10 dias a uma temperatura de aproximadamente 28 °C (DINIZ et al., 2021).

Após 6 e 10 dias foram medidas o halo de crescimento do fungo e registradas imagens para comparação do crescimento morfológico do mesmo.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na tabela 1 é apresentado os isolados em cada amostra e de cada parte do milho, seguida pelos códigos dado a cada microrganismo.

Tabela 1 – Número de isolados de cada amostra e parte do milho

Amostra de milho	Quantidade de isolados em cada parte da espiga		
	Grão (G)	Folha (F)	Cabelo (C)
1	2	0	0
2	1	0	5
3	2	4	5
4	0	2	2
Codificação*	1G1', 1G2', 2G1', 3G1', 3G2'	3F1', 3F2', 3F3', 3F4', 4F1', 4F2',	2C1', 2C2, 2C3', 2C4', 2C5', 3C1', 3C2', 3C3', 3C4', 3C5', 4C1', 4C2'

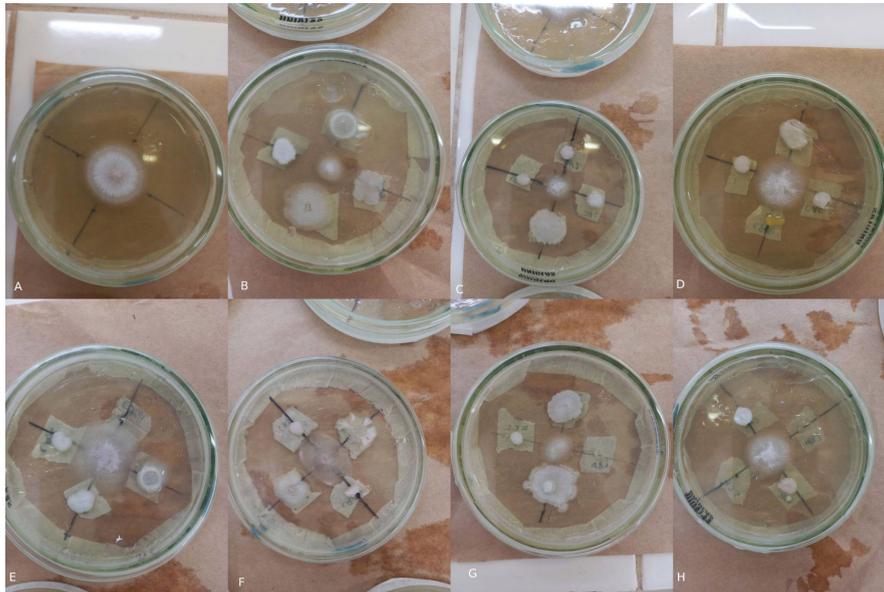
Fonte: Autoria própria (2023).

\* **codificação das amostras 1,2,3,4 (amostras de milho), G,F,C (parte da espiga) 1', 2',3'... (número do isolado)**

Após a primeira reativação foi encontrada grande dificuldade para a manutenção de *F. verticillioies*. Para enfrentar essa dificuldade foi pesquisado as condições de crescimento do fungo, encontrou-se a temperatura ideal de 25 °C (GARCIA et al., 2012) e muitos artigos utilizando BDA como meio. Após algumas tentativas conseguiu-se o crescimento em BDA em temperaturas de aproximadamente 28 °C, mostrando que, provavelmente, a dificuldade nos repiques anteriores foi de técnica, com dificuldade de transferir esporos, e outros erros procedimentais.

A figura 1 apresenta os resultados após 6 dias de inoculação, onde a primeira imagem mostra o controle, onde houve a inoculação apenas do fungo no centro da placa, e o restante das imagens apresenta os resultados de cada placa.

Figura 1 – Testes após 6 dias de crescimento

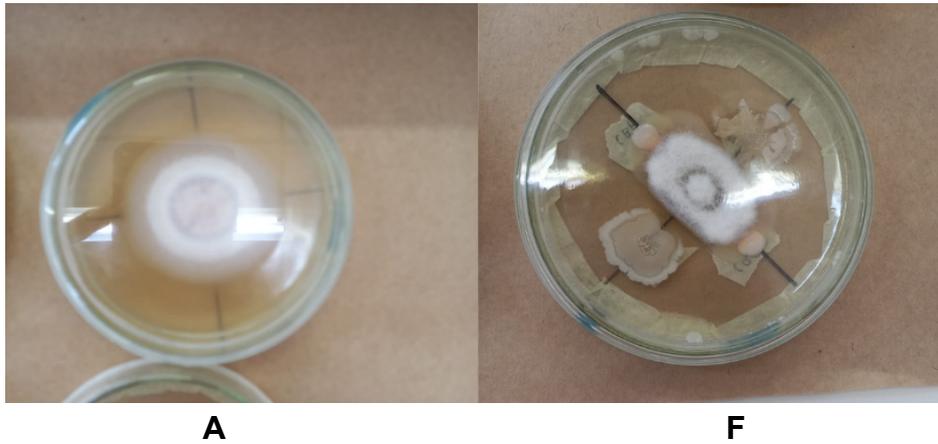


Fonte: Autoria própria (2023). **Legenda:** A (controle) B (3F2', 2G1', 4F1', 2C3') C (2C4', 2C5', 4C2', 3F3') D (3C1', 2C1', 1G1', 1G2') E (2C1', 4C1', 3C2', 3F1') F (3C5', ALE, 3C4', 3G2') G (3G1', 3C3', 4F2', 3F4') H (3C5', 2C2', 4F1', 2C2')

O controle apresentou um raio de aproximadamente 1.5 cm. A grande diferença notada foi na morfologia do crescimento, enquanto o controle cresceu de forma homogênea, com o centro mais denso e rosado, as placas tiveram um crescimento com pouca esporulação e partes mais densas do que outras.

Após 10 dias foi feito o mesmo procedimento, com isso observou-se grande atividade inibitória principalmente dos microrganismos de códigos ALE (isolado de contaminação), 3G1', 2G1', enquanto o branco teve crescimento de 2.6 cm, esses microrganismos inibiram o crescimento para 1 cm, 1 cm, e 0.8 cm, consecutivamente, além da visível mudança na morfologia.

Figura 2 – Testes após 10 dias de crescimento



Fonte: Autoria própria (2023).

Diniz et al. (2021) isolaram 4 microrganismos do cabelo do milho, destes 4, 1 apresentou inibição de 100% e foi identificado como *Aspergillus xylosoxidans*, uma bactéria, com colônias circulares e bem definidas e coloração bege, semi transparente. Os outros 3 apresentaram inibição de cerca de 60% (DINIZ et al., 2021).

Os resultados de inibição de cada microrganismo são descritos na tabela 2 pelo halo de crescimento.

Tabela 2 – Taxa de inibição

Diâmetro do halo de crescimento de <i>Fusarium verticillioides</i> (cm)	Microrganismo
2,60	Controle
Não detectado	3C2'
2,60 - 2,34	3C1'
2.35 - 1,82	1G1', 1G2'
1,83 - 1.56	2C1', 4C1', 3C4', 3F1', 4F2'
1.57- 1,30	2C2', 2C3', 3C3', 2C4', 3F2', 3F3', 3G2'
1,31 - 0,80	4C2', 4F1', 3F3', 2G1', 3G1', ALE

Fonte: Autoria própria (2023).

## CONCLUSÃO

A inibição do crescimento de *Fusarium verticillioides* foi observada em testes com os isolados de grãos do milho (3G1', 2G1') e de um contaminante laboratorial (ALE). No entanto, para a seleção de microrganismos antagonistas faz-se necessário mais etapas para caracterização da forma de antagonismo e confirmação dos resultados.

## Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

AZEEM, S. et al. **Characterization and survival of broad-spectrum biocontrol agents against phytopathogenic fungi**. Revista Argentina de Microbiología, v. 54, n. 3, p. 233–242, jul. 2022.

Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **RESOLUÇÃO Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011(\*)**. Brasília, 2011. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007\\_18\\_02\\_2011\\_rep.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html). Acesso em: 20 set 2023.

DEEPA, N.; ACHAR, P. N.; SREENIVASA, M. Y. **Current Perspectives of Biocontrol Agents for Management of Fusarium verticillioides and Its Fumonisin in Cereals—A Review**. Journal of Fungi, v. 7, n. 9, p. 776, 18 set. 2021.

DINIZ, G. F. D. et al. **Antifungal activity of bacterial strains from maize silks against Fusarium verticillioides**. Archives of Microbiology, v. 204, n. 1, 28 dez. 2021.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Importância Socioeconômica**. Portal EMBRAPA, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/milho/pre-producao/socioeconomia/importancia-socioeconomica>. Acesso em: 20 set. 2023.

GARCIA, D. et al. **Impact of cycling temperatures on *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins production in soybean**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 92, n. 15, p. 2952–2959, 4 maio 2012.

MOREY, A. T. et al. **Evaluation of carbon and nitrogen sources on fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* in defined culture medium**. Semina: Ciências Agrárias (Londrina) Vol.30 No.3 pp.647-654 ref.26, 3 set. 2009.