

EMURIELA DA ROCHA DOURADO

**MICROORGANISMOS EFICIENTES (EM) NO TRATAMENTO DE SEMENTES
DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

D739m
2018 Dourado, Emuriela da Rocha, 1987-
Microrganismos eficientes (EM) no tratamento de sementes
de milho / Emuriela da Rocha Dourado. – Viçosa, MG, 2018.
ix, 51f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: João Carlos Cardoso Galvão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Milho - Semente - Qualidade. 2. Agroecologia.
3. Micro-organismos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em
Agroecologia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.1521

EMURIELA DA ROCHA DOURADO


**MICROORGANISMOS EFICIENTES (EM) NO TRATAMENTO DE SEMENTES
DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2018.


Marliane de Cássia Soares da Silva


Paulo Prates Júnior


João Carlos Cardoso Galvão
(Orientador)

DEDICO

Ao meu pai, Honório Dourado Neto
e à minha mãe, Anailde Pinheiro da Rocha Dourado, com carinho.

OFEREÇO

Aos meus avós:

Adevaldo da Rocha Prates e Inês Pinheiro Rocha;
Maria da Glória Dourado de Castro e Manoel Dourado de Castro (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmãos, em primeiro lugar, pelo apoio, amor e dedicação. Ao meu pai por me inspirar e minha mãe por me incentivar. Aos meus irmãos, Maurício e Vitor, que eu amo e admiro cada dia mais.

A Matheus pelo companheirismo e força em muitos momentos dessa caminhada.

Ao meu orientador, prof. João Carlos C. Galvão pela orientação, paciência, todas as palavras amigas e ensinamentos.

Às minhas colegas de orientação Silvane, Beatriz, Steliane e, em especial, ao colega Jefferson pelo apoio enriquecedor neste texto e ajuda na condução dos experimentos.

Aos que contribuíram no essencial, tornando possível este trabalho, o assistente de laboratório Wander e o técnico José Custódio (Laboratório de Análise de Rotina de Sementes), o pós-doutorando André, que contribuiu enormemente, Athus, Deco, Priscilla e à técnica Bianca (Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas), Tomas, Camila, Paulo, Manu e ao funcionário Antônio Carlos (Laboratório de Associações Micorrízicas). Um agradecimento especial ao amigo Alan Emanuel pelo apoio na condução dos experimentos, dicas e conselhos fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Às amigas que a vida me trouxe e levo sempre comigo no coração, Rosiellen, Diana e Maíra. Vocês são as melhores do mundo.

Aos meus coorientadores Maria Catarina Megumi Kasuya e Olinto Liparini Pereira pelos ensinamentos.

À empresa Ambiem Ltda. Brasil, ao Programa Milho e aos Departamentos de Microbiologia e Fitotecnia, pelo fornecimento do material necessário aos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

A Deus por me conceder vida e capacidade de realizar. Agradeço.

RESUMO

DOURADO, Emuriela da Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Microrganismos Eficientes (EM) no tratamento de sementes de milho.** Orientador: João Carlos Cardoso Galvão. Coorientadores: Maria Catarina Megumi Kasuya e Olinto Liparini Pereira.

A produção de alimentos orgânicos vem crescendo nos últimos anos, entretanto, estes sistemas requerem insumos isentos de pesticidas químicos e que possibilitem benefícios ambientais, sociais e econômicos. A obtenção de sementes orgânicas no Brasil é um dos principais entraves desse setor e são necessárias pesquisas que apontem insumos adequados a este sistema de cultivo. Entre as ferramentas para a busca de sistemas mais sustentáveis estão os microrganismos eficientes (EM). Entretanto, são escassas literaturas sobre os mecanismos de ação deste produto e sua utilização para o tratamento de sementes. Considerando a hipótese de que os EM podem ser utilizados para a produção orgânica do milho (*Zea mays* L.), este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos das formulações de EM no tratamento de sementes de milho visando sua melhoria da qualidade sanitária e fisiológica. Foram testadas EM de três origens distintas, sendo um comercial (EMCOM) e dois de agricultores familiares, um de Montes Claros – MG (EMCE) e outro de Viçosa – MG (EMMA). Os EM foram filtrados, de forma a excluir os microrganismos, fazendo-se o uso apenas dos metabólitos secundários produzidos no processo fermentativo. No primeiro experimento os EM foram testados separadamente, onde sementes de milho foram embebidas por 30 min em quatro concentrações (1%, 2%, 5%, 100%) de EM em duas versões (filtrado e não filtrado), além da testemunha embebidas em água destilada, totalizando nove tratamentos dispostos em delineamento inteiramente casualizado. Após cinco dias de incubação, foi quantificada a presença de fungos fitopatogênicos nas sementes. No segundo experimento as sementes de milho foram embebidas por 30 min nos três EM e suas versões filtradas, sem diluição, além do tratamento adicional fungicida Derosal Plus e a testemunha, totalizando oito tratamentos em delineamento inteiramente casualizado. As sementes seguiram para teste de sanidade “blotter test”, teste de germinação e primeira contagem, teste de emergência em areia e índice de velocidade de emergência, peso de massa fresca e seca de plântulas. No terceiro experimento, 42 fungos isolados de sementes de milho tratadas com EM foram avaliados em teste de cultura pareada com *Fusarium verticillioides*, avaliando-se o diâmetros das colônias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com em três repetições. Menores incidências de fungos fitopatogênicos foram observadas nas

concentrações sem diluição dos EM, demonstrando que o mecanismo de ação dos microrganismos da cultura mista advém também da produção dos metabólitos secundários que contém substâncias antimicrobianas. Nos experimentos comparativos ao fungicida, todos os EM demonstraram eficiência equivalente ao Derosal Plus, sem prejudicar a qualidade fisiológica das sementes, não interferindo na germinação ou emergência do milho. Entretanto, as sementes tratadas com EM apresentaram plântulas com maiores massa fresca e seca, comparadas à testemunha e ao fungicida. Dos 42 isolados obtidos das sementes de milho, 21 mostraram capacidade de inibir do crescimento micelial do *F. verticillioides* com porcentagens de inibição entre 46 e quatro por cento. Foram observados diferentes mecanismos de antagonismo, mas principalmente por competição e antibiose. De forma geral, todos os EM testados foram eficientes no controle de patógenos de sementes de milho, sem prejudicar sua qualidade fisiológica. O EM tem mecanismo de ação intimamente ligado aos metabólitos secundários produzidos via fermentação anaeróbica e pode potencialmente substituir produtos químicos no tratamento de sementes de milho.

ABSTRACT

DOURADO, Emuriela da Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Effective Microorganisms (EM) on seed treatment of maize.** Advisor: João Carlos Cardoso Galvão. Co-advisors: Maria Catarina Megumi Kasuya and Olinto Liparini Pereira.

Organic food production has been growing in recent years; however, these systems require inputs that are free of chemical pesticides and provide environmental, social and economic benefits. Obtaining organic seeds in Brazil is one of the main obstacles in this sector, and research is needed that points out suitable inputs to this cropping system. Among the tools for the search for more sustainable systems are Effective Microorganisms (EM). However, there are few literature about mechanisms of action of this product and its use for the treatment of seeds. Considering the hypothesis that EM can be used for the organic production of maize (*Zea mays* L.), this work had the objective of studying the effects of EM formulations in the treatment of maize seeds with a view to improving sanitary and physiological quality. Three different sources were tested: one commercial (EMCOM) and two from family farmers, one from Montes Claros - MG (EMCE) and another from Viçosa - MG (EMMA). EM were filtered in order to exclude the microorganisms, using only the secondary metabolites produced in the fermentation process. In the first assay the EM were tested separately, where corn seeds were soaked for 30 min in four concentrations (1%, 2%, 5%, 100%) of EM in two versions (filtered and unfiltered), besides the embedded control in distilled water, totaling nine treatments arranged in a completely randomized design. After five days of incubation, the presence of phytopathogenic fungi in the seeds was quantified. In the second experiment the maize seeds were soaked for 30 min in the three EM and their filtered versions, without dilution, besides the additional fungicide treatment Derosal Plus and the control, totaling eight treatments in a completely randomized design. Seeds were followed for blotter test, germination test and first count, emergency sand test and emergency speed index, fresh and dry weight of seedlings. In the third treatment, 42 fungi isolated from corn seeds treated with EM were evaluated in a culture test paired with *Fusarium verticillioides*, evaluating the diameters of the colonies. The experiment was conducted in a completely randomized design, with three replications. Corn seeds with lower incidences of phytopathogenic fungi were observed at concentrations without dilution of EM, demonstrating that the mechanism of action of mixed - culture microorganisms also results from the production of secondary metabolites containing antimicrobial substances. In the comparative experiments to the fungicide, all EM

showed efficiency equivalent to Derosal Plus, without affecting the physiological quality of the seeds, without interfering in the germination nor the emergence of the corn. However, the seeds treated with EM presented seedlings with higher fresh and dry mass, compared to the control and the fungicide. Of the 42 isolates obtained from corn seeds, 21 showed the ability to inhibit the mycelial growth of *F. verticillioides* with percentages of inhibition between 46 and four percent. Different mechanisms of antagonism were observed, but mainly by competition and antibiosis. In general, all EM tested were efficient in the control of maize seed pathogens and without impairing their physiological quality. EM has a mechanism of action closely linked to secondary metabolites produced via anaerobic fermentation and may potentially replace chemicals in the treatment of maize.

SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	1
Referências Bibliográficas.....	3
CAPÍTULO I.....	5
2. Microrganismos eficientes (EM) no tratamento de sementes visando melhoria da sanidade.....	5
RESUMO.....	5
2.1. Introdução.....	7
2.2. Material e Métodos.....	8
2.2.1. Lote de sementes de milho.....	9
2.2.2. Obtenção dos Microrganismos Eficientes (EM).....	9
2.2.3. Determinação dos tratamentos.....	10
2.2.3.1. Concentrações de EM no tratamento de semente.....	10
2.2.3.2. Filtragem.....	10
2.2.4. Tratamento de sementes e arranjo experimental.....	11
2.3. Resultados e Discussão.....	12
2.3.1. Escolha do lote.....	12
2.3.2. Tratamento das sementes com EM.....	12
2.4. Conclusões.....	19
Referências bibliográficas.....	20
CAPÍTULO II.....	23
3. Controle de Patógenos de Sementes de Milho com Microrganismos Eficientes.....	23
RESUMO.....	23
3.1. Introdução.....	25
3.2. Material e Métodos.....	27
3.2.1. Obtenção dos Microrganismos Eficientes (EM).....	27
3.2.2. Sanidade de sementes.....	28
3.2.3. Germinação e primeira contagem.....	28
3.2.4. Emergência em areia e Índice de Velocidade de Emergência (IVE).....	28
3.2.5. Massa seca e massa fresca de plântulas.....	29
3.2.6. Análise estatística.....	29
3.3. Resultados e Discussão.....	29
3.4. Conclusões.....	34
Referências bibliográficas.....	35
CAPÍTULO III.....	40

4. Potencial de microrganismos isolados de sementes tratadas com Microrganismos Eficientes (EM) no biocontrole de <i>Fusarium verticillioides</i>	40
RESUMO.....	40
4.1. Introdução.....	41
4.2. Material e Métodos.....	42
4.2.1. Obtenção das culturas puras dos isolados	42
4.2.2. Obtenção do <i>Fusarium verticillioides</i>	43
4.2.3. Ensaio de cultura pareada.....	43
4.3. Resultados e discussão.....	44
4.4. Conclusão.....	46
Referências Bibliográficas.....	47
5. Conclusão Geral.....	51

1. Introdução Geral

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de grande importância no Brasil e no mundo, é um alimento de alto valor energético e de custo relativamente baixo, estando presente em uma vasta gama de produtos (GALVÃO et al., 2017). O milho é cultivado em todo o território nacional e a safra de 2017/2018 está estimada em 82 milhões de toneladas (CONAB, 2018). No contexto da agricultura familiar, o milho se destaca como alimento essencial para os agricultores, pois também compõe a alimentação de animais, principalmente suínos e aves, ou seja, a base para o consumo da carne, ovos, entre outros (GALVÃO et al., 2017).

O milho orgânico ganhará espaço no mercado de alimentos, pois é utilizado em toda a cadeia produtiva e a produção orgânica de milho tende a crescer com a utilização de tecnologias novas e metodologia participativa (OLIVEIRA et al., 2007). A produção orgânica de alimentos vem crescendo em nosso país e, em 2013, o número de unidades produtivas aumentou 22 %, em relação a 2012 (BRASIL, 2014). A obtenção de sementes orgânicas no Brasil é um dos principais entraves do setor e são necessárias pesquisas que apontem insumos adequados a este sistema de cultivo, preservando a saúde do produtor, do consumidor e do meio ambiente.

A qualidade do milho pode ser influenciada por diversos fatores (SANDINI e FANCELLI, 2000; GALVÃO et al., 2017), e, dentre eles, destacam-se as doenças associadas às sementes (MACHADO, 2006). A proteção das sementes é fator primordial nos sistemas de cultivo, porém, tem sido feita, predominantemente, com o uso de agrotóxicos e neste caso, mais especificamente fungicidas e inseticidas. Os impactos negativos sobre o meio ambiente e a saúde humana causados pelos agrotóxicos têm sido extensivamente documentados tanto por organizações internacionais como na literatura científica (SCHMITZ et al., 2014; GONZÁLEZ-ALZAGA et al., 2014), o que promove uma repercussão no sentido de desenvolver alternativas que venham a substituir estes produtos químicos.

Entre as ferramentas para a busca de sistemas mais sustentáveis para o cultivo do milho, orgânicos e agroecológicos, enquadram-se os chamados microrganismos de regeneração, eficazes ou eficientes (EM) que são formulações que, quando utilizados como inoculantes, podem promover rapidamente o aumento da diversidade e número de microrganismos benéficos aos solos e às plantas, integrando o equilíbrio microbiológico do meio (BONFIM et al., 2011; PEREIRA et al., 1994). O conceito de EM foi iniciado

pelo Professor Teruo Higa da Universidade de Ryukyus em Okinawa (Japão), com o objetivo de melhorar a utilização da matéria orgânica na produção agrícola (BONFIM et al., 2011).

O EM é uma tecnologia social baseada no processo de inoculação de culturas mistas de microrganismos de solo de matas, propiciando condições favoráveis para o desenvolvimento das plantas. A utilização do EM na cultura do milho como alternativa de melhoria da produção e das condições de cultivo já apresenta resultados satisfatórios, (TEIXEIRA et al., 2017; MEGALI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2011) porém, para o tratamento de sementes, ainda são escassas as informações. Além disso, há um número reduzido de trabalhos científicos e grande parte dos trabalhos são de difícil acesso e também muitos deles se constituem de relatos de produtores.

Assim, objetivou-se estudar os efeitos das formulações de EM no tratamento de sementes de milho visando sua melhoria da qualidade sanitária e fisiológica.

Esta pesquisa foi dividida em três capítulos em que, para cada capítulo, uma hipótese diferente foi testada. No primeiro capítulo, foi avaliada a eficiência de diferentes concentrações do EM no tratamento de sementes de milho, a hipótese levantada foi que o EM é pode diminuir infestação de fungos patogênicos nas sementes de milho. A melhor concentração, resultante do primeiro experimento, foi comparada no segundo capítulo ao fungicida recomendado para o tratamento de sementes na cultura do milho, a hipótese foi a de que o EM tem o efeito semelhante ao fungicida. Por fim, o terceiro capítulo se ateve à investigação da atividade microbiana antagonica de isolados do EM, em relação ao patógeno *Fusarium verticillioides* e a hipótese foi a de que os metabólitos secundários produzidos pelos microrganismos isolados dos experimentos tem efeito antibiótico sobre os patógenos nas sementes de milho.

Referências Bibliográficas

BONFIM, F. P. G.; HONÓRIO, I. C. G.; REIS I. L.; PEREIRA A. J.; Souza, D. B. **Caderno dos microrganismos eficientes (EM):** instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM. Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Fitotecnia; 2011. 32p.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)** 2014. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/ministerio/desenvolvimento-sustentavel/orgânicos> Acesso em 5 de junho de 2018.

CONAB – Companhia Nacional Abastecimento, Acompanhamento da safra brasileira: grãos. **Monitoramento agrícola - Safra 2017/18.** Brasília. v. 10, 2018, 178p.

GALVÃO, J. C. C.; BORÉM, A.; PIMENTEL, M. A. **Milho:** do plantio à colheita. 2.ed. Viçosa (MG): Ed. UFV, 2017. 382 p.

GONZÁLEZ-ALZAGA B.; LACASA, M.; AGUILAR-GARDU, C.; RODRÍGUEZ-BARRANCO, M.; BALLESTER, F.; REBAGLIATO, M.; HERNÁNDEZ, A.F. A systematic review of neurodevelopmental effects of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p.104-121, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.11.019>

MACHADO, J.C.; WAQUIL, J.M.; SANTOS, J.P.; REICHENBACH, J.W. Tratamento de sementes no controle de fitopatógenos e pragas. **Informe Agropecuário**, v.27, n.232, p.76-87, 2006. Disponível em <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489541/1/Tratamentosementes.pdf> Acesso em 17 de julho de 2018.

MEGALI, L.; SCHLAU, B.; RASMANN, S. Soil microbial inoculation increases corn yield and insect attack. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 4, p 1511–1519, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0323-0>

OLIVEIRA, L. R.; MIRANDA, G. V.; SANTOS, I. C.; GALVÃO, J. C. C.; LIMA, J. S. MENDES, F. F.; FONTANETTI, A.; SOUZA, L. V.; MELO, A. V. Desempenho e seleção de cultivares de milho em sistema orgânico de cultivo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, p. 1369-1372, 2007. Disponível em <http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/rbagroecologia/article/view/6556> Acesso em 17 de julho de 2018.

OLIVEIRA, S. A. S.; STARK, E. M. L. M.; FREITAS, J. A. E.; BERBARA, R. L.; SOUZA, S. R. Partição de nitrogênio em variedades de milho (*Zea mays* L.) com a aplicação foliar de microorganismos eficazes e nitrato. **Revista Universidade Rural**. Série Ciências da Vida, Seropédica, v. 31, n. 1, p. 57-69, 2011. Disponível em <https://tede.ufrj.br/jsppui/handle/tede/241> Acesso em 17 de Julho de 2018.

PEREIRA, T. G.; SILVA, S.; MORAES, E. G.; LOPES, M. A. P.; PEREIRA, J. G.; GONÇALVES, L. S. Utilização de Microrganismos eficientes (EM) na produção de alimentos orgânicos. **Anais da VII Semana de Ciência e Tecnologia**. IFMG – Bambuí, 1994.

SANDINI, I. E.; FANCELLI, A. L. **Milho**: estratégias de manejo para a região sul. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. 209 p.

SCHMITZ J.; HAHN M.; BRUHL, C. A. Agrochemicals in field margins – An experimental field study to assess the impacts of pesticides and fertilizers on a natural plant community. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 193, p. 60-69, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.04.025>

TEIXEIRA, N. T.; de WITT, L.; SILVA FILHO, P. R. R. Microrganismos de Regeneração nas Propriedades Químicas do Solo, Desenvolvimento e Produção de Milho. Em: **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 14, n. 2, p. 72-80, 2017. Disponível em:

<http://ferramentas.unipinhal.edu.br/engenhariaambiental/viewarticle.php?id=1499>

Acesso em: 17 07 2018.

CAPÍTULO I

Microrganismos eficientes (EM) no tratamento de sementes visando melhoria da sanidade

RESUMO

Os Microrganismos Eficientes (*Effective Microorganisms* – EM) consiste em culturas mistas de microrganismos benéficos existentes na natureza, e que são capturados e utilizados como inoculantes para incrementar a diversidade microbiana no solo e nas plantas. As aplicações com altas diluições de EM são empregadas visando a melhoria da qualidade dos solos e em áreas de cultivo e podem contribuir para um ganho de qualidade nos cultivos de cereais de grande valor econômico e social, como é o caso do milho. Este cereal tem papel importante na cadeia de produtos orgânicos e é componente básico na produção para autoconsumo para os agricultores familiares em função do seu alto valor energético. Há a necessidade de se desenvolver produtos que atendam as demandas de sistemas orgânicos e agroecológicos, que necessitam de insumos adequados às suas demandas, que não sejam poluentes e apresentem resultados consistentes em campo. Na literatura é possível encontrar resultados satisfatórios empregando-se as culturas mistas para melhorar a qualidade dos solos, mas são escassas as informações referentes ao uso do EM para tratamento de sementes, bem como de informações que elucidem os mecanismos de ação dessas formulações. Objetivou-se com este trabalho determinar a melhor concentração de EM que pode ser utilizado na melhoria da qualidade sanitária de sementes de milho e identificar ao que se associa seu efeito. Foram testados três EM de origens distintas, sendo um comercial e dois de agricultores familiares de Montes Claros (MG) e Viçosa (MG). Além disto, estes EM foram também filtrados, de forma a excluir os microrganismos, mantendo-se compostos produzidos no processo fermentativo. Cada EM foi testado separadamente. Desse modo, para cada teste, duzentas sementes foram embebidas por 30 minutos em quatro concentrações (1%, 2%, 5%, 100%) de EM em duas versões (filtrado e não filtrado), além da testemunha, água destilada esterilizada, totalizando 9 tratamentos dispostos em delineamento inteiramente casualizado. As sementes inoculadas seguiram para o teste de sanidade tipo “blotter”, permanecendo incubadas por cinco dias. Após o período de incubação, foi quantificada a presença de fungos fitopatogênicos nas sementes pelo teste de sanidade. Todos os EM sem diluição foram eficientes, independentemente da sua

origem, na redução da incidência dos fungos fitopatogênicos avaliados, promovendo um decréscimo entre 67% e 21%, incluindo os resultados referentes às versões filtradas. Os metabólitos provenientes da fermentação anaeróbica tem íntima relação com os resultados obtidos para os testes realizados. Os Microrganismos Eficientes podem auxiliar na melhoria da qualidade sanitária das sementes de milho, reduzindo a incidência de fungos causadores de doenças nas sementes.

2.1. Introdução

Dentre os diversos fatores que afetam a qualidade das sementes de milho, os fungos são considerados um dos mais importantes, além de estarem relacionados à qualidade sanitária, podem afetar a germinação e o vigor, bem como acelerar o processo de deterioração, principalmente, em condições de armazenamento (MENTEN, 1995). Agentes etiológicos da maioria das doenças que afetam a cultura do milho podem ser disseminados e transmitidos por sementes contaminadas (BARBA, 2001).

As principais medidas para evitar podridões de sementes e morte de plântulas são o uso de sementes sadias e tratadas, no entanto, o tratamento de sementes, no Brasil, é feito majoritariamente com o uso de fungicidas (PEREIRA et al., 2005). O uso de agrotóxicos nos cultivos vem causando diversos problemas à saúde humana e para o meio ambiente. Métodos de controle alternativo de doenças são considerados como uma opção viável para diminuir a contaminação ambiental causada pelos agrotóxicos (LONDRES, 2011) e são uma alternativa para os agricultores que praticam a agricultura orgânica e a agroecológica. Dentre as alternativas para substituir o controle químico, os microrganismos eficientes (EM) são importantes para o desenvolvimento de sistemas agrícolas mais sustentáveis, com redução do uso de insumos químicos.

O EM (*Effective Microorganisms*) foi desenvolvido por Teruo Higa, na Universidade de Ryukyus, Okinawa, Japão, na década de 1970 e consiste de culturas mistas de microrganismos benéficos formadas basicamente por bactérias produtoras de ácido láctico, bactérias fotossintetizantes, actinomicetos, leveduras, fungos filamentosos, entre outros, e que ocorrem naturalmente no ambiente (HIGA e WIDIDANA, 1989). Esses produtos são utilizados como inoculantes, para aumentar a diversidade e o número de microrganismos naturais benéficos do solo e da planta, integrando o equilíbrio microbiológico.

Experiências com estas formulações nas áreas de produção agrícola como inoculante de solo têm demonstrado diminuição do potencial de muitos patógenos de plantas (HIGA e WIDIANA, 1989). O EM é comercializado no Brasil e em diversos países, entretanto, é produzido por agricultores que conhecem o método de captura dos microrganismos e de preparo com composto microbiano fermentado de uso em solos e plantas. Estas formulações tem composição e combinação microbiana complexa, isolada de matas e que coexistem em meio líquido fermentativo enriquecido com fonte de açúcar. Esta estratégia caracteriza a tecnologia social do EM (BONFIM et al., 2011).

Na Agricultura Natural os microrganismos eficientes são utilizados para promover a decomposição da matéria orgânica e tornarem os nutrientes e os minerais do solo disponíveis para a planta. É possível encontrar na literatura uma vasta gama de dosagens recomendadas para o uso do produto. Em aplicações foliares em milho, foi utilizado um volume equivalente a 20 mL por planta em duas aplicações intervaladas e constatou aumento nos teores de proteína bruta dos grãos (OLIVEIRA et al. (2011). Aplicações de EM (10 L ha⁻¹) em áreas de plantio de milho doce ocasionaram o aumento significativo do peso de espigas, sem alterar o número de espigas em relação à testemunha (DALY e STEWART, 1999). Em plantio de milho com adubação orgânica, foi aplicado EM (0,1% (v/v)) por seis vezes nas plantas, da época de implantação ao estágio R4, e verificaram o aumento do peso das espigas de milho, em comparação com o controle (TEIXEIRA et al. 2017)

As aplicações com altas diluições de EM são empregadas visando a melhoria da qualidade dos solos e em áreas de cultivo. O consórcio de microrganismos pode ter seu uso expandido, por exemplo, para o tratamento de sementes. O tratamento de sementes de trigo com EM (150 mL/kg de semente) e a mesma concentração do produto autoclavado, alcançaram os mesmos resultados, indicando que o efeito foi proveniente também dos metabólitos presentes no composto (BORGEM, 1999). As informações sobre essa tecnologia e seu mecanismo de ação ainda são escassas na literatura. O processo de separação dos metabólitos secundários do composto, para esta pesquisa, tem em vista, sobretudo, a melhor compreensão da atividade microbiana e seu efeito quando da utilização dos Microrganismos Eficientes.

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho determinar a melhor concentração e identificar se o efeito se deve aos microrganismos ou aos metabólitos produzidos.

2.2. Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Associações Micorrízicas pertencente ao Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Micologia e Etiologia de doenças Fúngicas de Plantas do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

2.2.1. Lote de sementes de milho

O lote de sementes de milho utilizado no experimento foi cedido pelo Programa Milho da Universidade Federal de Viçosa. Foram disponibilizadas UFVM100, UFVM200, AL Bandeirante, Sol da Manhã e BR105; e duas variedades de milho crioulo, denominadas Maia e Amarelão. Os lotes foram submetidos ao teste de sanidade (BRASIL, 2009) pelo método do papel de filtro “blotter test”, empregando-se 200 sementes de cada lote, divididas em oito repetições de 25 sementes, colocadas em caixas “gerbox” previamente sanitizadas, contendo duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada duas vezes e meia o seu peso seco. A incubação em câmara tipo “Biochemical Oxygen Demand” (BOD), a 25 ± 2 °C, com regime de 12 horas de luz, durante 24 h e posterior transferência para a câmara a -16 °C por 24 h, para inibição da germinação. Decorrido esse período, as sementes retornaram às condições iniciais de incubação, permanecendo por cinco dias. Após este procedimento, as sementes foram analisadas, com o auxílio de microscópio estereoscópico e óptico, para a observação das estruturas morfológicas dos fungos (NEERGAARD, 1979), os quais foram identificados ao nível de gênero, sendo os resultados expressos em percentagem de incidência de fungos em sementes.

2.2.2. Obtenção dos Microrganismos Eficientes (EM)

Foram utilizados três inoculantes EM (Microrganismos Eficientes) de origens distintas, sendo dois obtidos de agricultores familiares e um EM comercial (Tecnologia EM•1[®]), tendo sido o último, doado pela empresa Ambiem Brasil Ltda. Os EM obtidos de agricultores familiares, denominados EMCE e EMMA foram produzidos a partir de microrganismos obtidos de área de Cerrado (município de Montes Claros-MG) e Mata Atlântica (município de Viçosa-MG), respectivamente, utilizando-se como isca arroz cozido (700 g) colocado ao solo e coberto com material vegetal em decomposição. Após a captura, o arroz colonizado com microrganismos de cores claras (excluindo-se os microrganismos de cor escura) foi colocado em garrafa juntamente com melão (200 mL) e água (1800 mL) e submetido ao processo fermentativo por cerca de cinco dias e resultou em EM pronto para uso (BONFIM et al., 2011). Quanto ao EM comercial (Tecnologia EM•1[®]), denominado EMCOM, foram seguidas as normas do fabricante para a “ativação”, utilizando-se para tal, o melão enviado pela empresa juntamente com o produto e, para o tratamento de sementes, preconizadas as instruções de uso.

2.2.3. Determinação dos tratamentos

2.2.3.1. Concentrações de EM no tratamento de semente

Foram estabelecidas quatro concentrações (1%, 2%, 5% e 100% (v/v)) empregadas para todos os EM testados, além do controle, água destilada esterilizada. Cada um dos três EM (EMCE, EMMA e EMCOM) foi filtrado para avaliar o efeito dos compostos metabolizados. O processo consistiu na separação por filtração dos microrganismos dos metabólitos por eles produzidos durante o processo de fermentação.

2.2.3.2. Filtração

A filtração foi realizada no Laboratório de Associações Micorrízicas e Genética Molecular de Microrganismos pertencentes ao Departamento de Microbiologia, localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), foi efetuada para os três EM (EMCE, EMMA e EMCOM) e procedeu-se através das seguintes etapas:

Coagem: A coagem do material visou separar a parte líquida do composto. Utilizou-se, inicialmente uma peneira comum, com malha de tela de 2,75 mm. Em seguida, fez-se passar o líquido resultante da etapa anterior em peneira de 75 µm (nº 200). A parte consistente foi descartada e partir daí, apenas a parte líquida prosseguiu para as outras etapas.

Primeira filtração: Foi realizada com uso de aparato apropriado composto de filtro de papel comum em funil de Büchner acoplado a um kitassato esterilizado, que por sua vez conectava-se à bomba de sucção vácuo à pressão de 500 mm Hg, fazendo-se passar o líquido pelo filtro no aparato.

Centrifugação: O líquido resultante da etapa anterior possuía uma espessura que não permitia passagem em membrana filtrante de 22 µm (etapa final) e houve a necessidade de se recorrer a uma centrifugação das amostras de EM. Procedeu-se a centrifugação a 6.000 g durante 10 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi armazenado em recipiente esterilizado.

Membrana filtrante: O líquido sobrenadante de cada amostra, resultante da etapa anterior, foi passado em membrana Millipore® de filtração esterilização de 0,45 µm de diâmetro do poro e em seguida, por duas vezes, em membrana Millipore® de filtração esterilização de 0,22 µm de diâmetro de poro. Ambas as membranas citadas foram

instaladas em aparato apropriado composto por kitassato estéril conectado à bomba de sucção vácuo à pressão de 500 mm Hg. Após a filtragem, o composto foi armazenado a -20 °C e utilizado mediante demanda, ao longo do experimento. Uma amostra de 0,1 mL de cada EM filtrado foi retirada e plaqueada, com três repetições, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) enriquecido de 1% de Extrato de Levedura e incubada em BOD a 25±2 °C para análise da efetividade da filtragem.

2.2.4. Tratamento de sementes e arranjo experimental

Foi conduzido um ensaio para cada EM separadamente. Em cada ensaio, foi analisada a versão filtrada e a não filtrada, e quatro diferentes concentrações (1%, 2%, 5% e 100% (v/v)), além do controle (água destilada esterilizada). Dessa forma, o delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado (DIC), com 9 tratamentos e oito repetições, totalizando 72 unidades experimentais em cada ensaio (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações e *status* de filtragem dos EM utilizados no tratamento de sementes.

Experimento		Concentrações				Controle
1 - EMCE	Filtrado	1%	2%	5%	100%	0
	Não Filtrado					
2 - EMMA	Filtrado	1%	2%	5%	100%	0
	Não Filtrado					
3 - EMCOM	Filtrado	1%	2%	5%	100%	0
	Não Filtrado					

EMCE (EM feito por agricultores familiares em mata de Cerrado); EMMA (EM feito por agricultores familiares em mata da Zona da Mata Mineira); EMCOM (EM Tecnologia EM•1[®], produto comercial).

Duzentas sementes não desinfestadas de cada tratamento (Tabela 1) foram embebidas por 30 minutos (NCUBE, 2008) em 100 mL de solução (de acordo com as concentrações estabelecidas) e, em seguida, incubadas pelo método de papel de filtro “blotter test” (BRASIL, 2009). Após este procedimento, as sementes foram analisadas, com o auxílio de microscópio, para a observação das estruturas morfológicas dos fungos (NEERGAARD, 1979), os quais foram identificados ao nível de gênero, sendo os resultados expressos em percentagem de incidência de fungos em sementes.

As análises de variância foram realizadas no programa Sisvar para o teste de Dunnett ($P \leq 0,05$), e também pelo programa SAEG, no caso dos teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Escolha do lote

A maior incidência de fungos patogênicos foi no lote avaliado da variedade BR105 sendo identificados os gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* em maior ocorrência, e os gêneros *Acremonium* e *Cladosporium* em menor ocorrência. O lote apresentou 47,5% de incidência geral de patógenos nas sementes de milho, a maior entre os lotes avaliados, e por isso foi o lote mais adequado para o experimento, visto que, para este estudo, a escolha de um lote com alta incidência de patógenos nas sementes visou eliminar o fator resistência (natural) intrínseco a muitas variedades de milho (COSTA et al., 2003).

2.3.2. Tratamento das sementes com EM

Os testes de média Dunnett e Tukey mostraram que a aplicação do EM teve um efeito significativo na incidência dos patógenos em sementes de milho. Os tratamentos sem diluição, tanto o filtrado quanto o não filtrado, promoveram a diminuição significativa da quantidade de patógenos nas sementes em relação à testemunha, como foi demonstrado pelos testes de Dunnett e Tukey (Tabela 2).

Tabela 2. Incidência geral de fungos observados em sementes tratadas com três EM, sob diferentes concentrações.

Concentração	Filtragem	EMCE	EMMA	EMCOM
0% (Testemunha)		87a	92a	95a
1%	F	90a	96a	94a
	NF	88a	97a	89ab
2%	F	85a	85a	98a
	NF	92a	92a	90a
5%	F	89a	92a	97a
	NF	80a	90a	86ab
100%	F	20b*	43b*	74b*
	NF	26b*	33b*	39c*
CV(%)		12,9	10,5	11,9

¹As médias seguidas de * na coluna são diferentes a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett em comparação com a testemunha água destilada esterilizada.

²Médias seguidas pela mesma letra na coluna não se diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

³Considera-se “F” para EM filtrado e “NF” para EM não filtrado.

Não houve diferença entre os tratamentos que sofreram diluição e a testemunha pelo teste de Dunnett (Tabela 2). O EMCE promoveu uma significativa diminuição da

incidência dos patógenos nas sementes e este resultado foi observado no composto filtrado e o não filtrado. O mesmo ocorreu nos tratamentos com EMMA e EMCOM.

Observou-se que o EMCE reduziu em 67% a incidência geral de fungos nas sementes em relação à testemunha (Figura 1A), a maior porcentagem de redução entre todos os tratamentos. O EMCE filtrado (Figura 1B) foi 6% melhor que a não filtrada (Figura 1D), ainda que não houve diferença. Os resultados indicam que, aparentemente, os microrganismos eficientes e os compostos metabolizados por eles são capazes de promover ação inibitória no crescimento dos fungos fitopatogênicos. BORGEM (1999) verificou que o tratamento de sementes de trigo com EM•1[®] (150 mL do produto por quilo de semente) apresentou 87,6% de redução de cárie (*Tilletia tritici*). A aplicação da mesma concentração do produto autoclavado proporcionou os mesmos resultados, indicando que o efeito foi proveniente, além dos microrganismos, pelos metabólitos secundários presentes no produto.

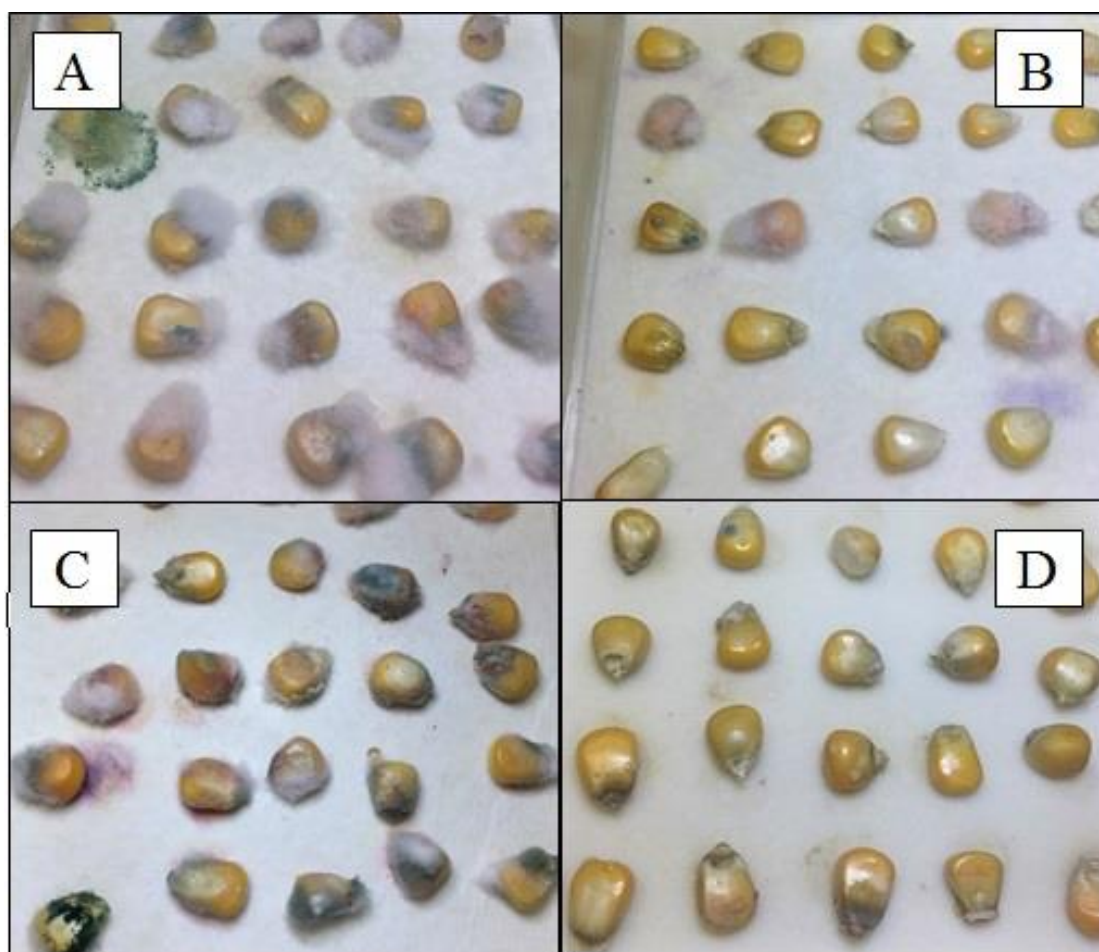


Figura 1. Sementes de milho tratadas com EMCE e avaliadas após período de incubação em câmara tipo BOD. (A) Sementes embebidas apenas em água destilada esterilizada. (B) Sementes embebidas no EMCE filtrado sem diluição. (C) Sementes embebidas em EMCE não filtrado e a 5% de diluição. (D) Sementes embebidas em EMCE não filtrado e sem diluição

Para os três EM empregados foi observado o efeito significativo na inibição do *Fusarium* spp., seguindo a tendência da incidência geral e analisado pelo teste de Dunnett (Tabela 3). O melhor tratamento foi o EMCE filtrado e sem diluição, que reduziu a incidência do patógeno em 67%, em relação à testemunha sem, contudo, diferir da versão não filtrada. O crescimento dos fungos pode ter sido afetado pela presença dos microrganismos provenientes do EM assim como pela influência de seus metabólitos. MELLONI et al. (1995) observaram menor crescimento de *Fusarium* spp. em meio de cultura conforme aumentou-se a concentração do produto comercial em experimento *in vitro*. FLORES et al. (2012), comprovou que o EM inoculado juntamente com o *Trichoderma* spp. demonstrou ser eficiente na diminuição da incidência dos patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Fusarium* spp. em plantas de pimentão.

Tabela 3. Incidência de *Fusarium* spp. em sementes tratadas com EM, sob diferentes concentrações.

Concentração	Filtragem	EMCE	EMMA	EMCOM
0% (Testemunha)	-	81a	61a	64ab
1%	F	83a	64a	64ab
	NF	75a	50ab	60abc
2%	F	82a	32bc*	80a
	NF	87a	32bc*	61abc
5%	F	83a	66a	72ab
	NF	72a	56a	52bc
100%	F	14b*	32bc*	36cd*
	NF	23b*	22bc*	23d*
CV(%)		17,7	28,5	30,0

¹As médias seguidas de * na coluna são diferentes a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett em comparação com a testemunha água destilada esterilizada.

²Médias seguidas pela mesma letra na coluna não se diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

³Considera-se “F” para EM filtrado e “NF” para EM não filtrado.

Para o tratamento EMMA na concentração de 2%, tanto o filtrado como o não filtrado, diferiram da testemunha pelo teste de Dunnett, o que não ocorreu com os outros EM na mesma concentração (Tabela 3). Este resultado pode ter relação com a produção de algum metabólito prejudicial ao crescimento do *Fusarium* spp., uma vez que o filtrado e o não filtrado mostram resultados similares. Isto pode acontecer em

decorrência da variedade de microrganismos encontrada nos EM, uma vez que cada formulação é composta por diferentes grupos (HIGA e PARR, 1994).

As concentrações 1% e 5% não promoveram ação inibitória significativa sobre o *Fusarium* spp. (Tabela 3), exceto nas sementes tratadas com EMCOM a 5% que não diferiu da versão filtrada sem diluição, o que é comprovado pelo teste de Tukey. Na literatura é possível encontrar trabalhos publicados que validam o emprego de altas diluições para o uso do EM, porém esses relatos são de aplicações no solo ou nas plantas (ELANGO et al., 1999; DALY e STEWART, 1999; HUANG et al., 1998). Para aplicação diretamente em sementes, há o indício de que concentrações mais altas favorecem a diminuição da incidência de patógenos.

Além do *Fusarium* spp., os fungos como *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp., e *Cladosporium* spp. foram identificados nas análises de sanidade das sementes. A ocorrência está relatada em três tabelas (Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6), que apresentam, individualmente, a incidência dos fungos conforme o EM utilizado nos tratamentos. Os resultados tem relação com aqueles apresentados anteriormente (Tabela 2), em que os tratamentos sem diluição ocasionaram decréscimo da porcentagem de fungos observados nas sementes de milho.

Tabela 4. Fungos fitopatogênicos observados e sua incidência em porcentagem nas sementes de milho tratadas com EMCOM, sob diferentes concentrações.

Conc.	Filtragem	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Acremonium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.
0%	-	95 ±4,1	5 ±4,0	2 ±4,3	6 ±5,6	5 ±5,0
1%	F	93 ±7,2	3 ±2,8	1 ±1,4	8 ±7,5	6 ±6,4
	NF	90 ±11,5	6 ±3,0	2 ±2,1	11 ±9,5	3 ±4,7
2%	F	96 ±6,9	4 ±3,3	0 ±0,0	5 ±6,2	0 ±0,0
	NF	91 ±7,7	11 ±4,2	2 ±4,3	6 ±9,3	0 ±0,0
5%	F	97 ±4,7	2 ±4,3	3 ±3,0	3 ±3,0	10 ±13,3
	NF	86 ±18,1	5 ±5,4	1 ±1,9	8 ±10,6	1 ±1,4
100%	F	72 ±16,6	10 ±6,0	1 ±1,9	2 ±3,0	2 ±4,3
	NF	29 ±13,1	15 ±23,0	1 ±1,4	11 ±6,7	2 ±3,0

¹Média±desvio padrão

²Considera-se “F” para EM filtrado e “NF” para EM não filtrado.

Tabela 5. Fungos fitopatogênicos observados e sua incidência em porcentagem nas sementes de milho tratadas com EMCE, sob diferentes concentrações.

Conc.	Filtragem	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Acremonium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.
0%	-	85 ±8,7	7 ±4,7	2 ±2,1	2 ±3,0	1 ±1,4
1%	F	80 ±13,8	8 ±7,4	1 ±1,4	0 ±0,0	0 ±0,0
	NF	82 ±15,3	16 ±13,1	2 ±2,1	2 ±5,7	0 ±0,0
2%	F	79 ±8,8	9 ±3,3	2 ±3,0	0 ±0,0	1 ±1,4
	NF	86 ±11,7	8 ±8,3	9 ±7,2	1 ±1,4	0 ±0,0
5%	F	87 ±9,5	5 ±9,7	1 ±1,4	1 ±1,9	0 ±0,0
	NF	78 ±17,0	16 ±13,3	3 ±4,2	1 ±1,4	1 ±1,4
100%	F	6 ±6,8	12 ±14,5	0 ±0,0	3 ±4,8	0 ±0,0
	NF	7 ±6,7	13 ±17,2	0 ±0,0	1 ±1,9	0 ±0,0

¹Média±desvio padrão.

²Considera-se “F” para EM filtrado e “NF” para EM não filtrado.

Tabela 6. Fungos fitopatogênicos observados e sua incidência em porcentagem nas sementes de milho tratadas com EMMA, sob diferentes concentrações.

Conc.	Filtragem	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Acremonium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.
0%	-	92 ±6,4	1 ±2,8	36 ±10,3	0 ±0,0	0 ±0,0
1%	F	96 ±3,7	2 ±2,1	34 ±15,4	0 ±0,0	0 ±0,0
	NF	97 ±3,5	5 ±6,3	26 ±11,7	1 ±1,4	0 ±0,0
2%	F	85 ±11,3	6 ±6,8	22 ±6,7	1 ±1,9	0 ±0,0
	NF	93 ±5,4	10 ±6,4	28 ±16,1	51 ±12,0	0 ±0,0
5%	F	93 ±12,0	7 ±10,2	47 ±8,8	0 ±0,0	0 ±0,0
	NF	91 ±11,3	7 ±6,7	38 ±19,6	0 ±0,0	0 ±0,0
100%	F	29 ±14,8	38 ±12,6	8 ±8,6	11 ±6,7	0 ±0,0
	NF	11 ±10,0	9 ±12,0	2 ±3,0	25 ±11,9	0 ±0,0

¹Média±desvio padrão.

²Considera-se “F” para EM filtrado e “NF” para EM não filtrado.

Nas sementes tratadas com EM sem diluição e não filtrado foram observadas colônias microbianas em suas superfícies. Estas estruturas (Figura 2) que se formaram apresentavam diferentes características morfológicas e sua incidência está apresentada na Tabela 7. A presença desses organismos pode estar associada ao controle de patógenos nas sementes, além da evidência da ação substâncias antagonistas presentes nos EM. Não foi o objetivo desta pesquisa a identificação dos microrganismos mencionados, mas sim de estudar a eficiência da cultura mista no controle dos fungos fitopatogênicos.

Tabela 7. Estruturas microbianas observadas e sua incidência em porcentagem nas sementes de milho tratadas com EM de origens diferentes.

Conc.	Filtragem	EMCE	EMMA	EMCOM
0%	-	0 ±0	0 ±0	0 ±0
1%	F	0,5 ±1,4	0 ±0	0 ±0
	NF	0,5 ±1,4	0 ±0	0 ±0
2%	F	0,5 ±1,4	0 ±0	0 ±0
	NF	0,5 ±1,4	0 ±0	0 ±0
5%	F	0 ±0	0 ±0	0,5 ±1,4
	NF	1 ±1,9	0 ±0	0 ±0
100%	F	41 ±34,4	0 ±0	6 ±6,8
	NF	47 ±11,1	84 ±12,8	1,5 ±2,1

¹Média±desvio padrão.

²Considera-se “F” para EM filtrado e “NF” para EM não filtrado.

Bactérias e leveduras são amplamente estudadas para fins de controle biológico (GRIGOLETTI JÚNIOR et al., 2000; PICCININ et al., 2005). Em sua pesquisa, SANTOS (2016), por meio de sequenciamento em Illumina MiSeq, avaliou a diversidade e caracterizou taxonomicamente a microbiota de EM de diferentes origens (comercial e também produzidos por agricultores familiares) e os filos comuns aos três EM incluíram Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Synergistetes. Algumas das bactérias presentes nos filos são produtoras de substâncias antimicrobianas (BARKA et al. 2015). A análise do resultado (Tabela 7) permite inferir que, mesmo em sementes tratadas com EM filtrado, as colônias puderam ser observadas. A presença de microrganismos podem ser provenientes do EM, indicando que o produto tem a capacidade de promover o desenvolvimento organismos endofíticos (uma vez que as sementes sofreram desinfestação superficial) que aparentemente competem com os fungos fitopatogênicos.

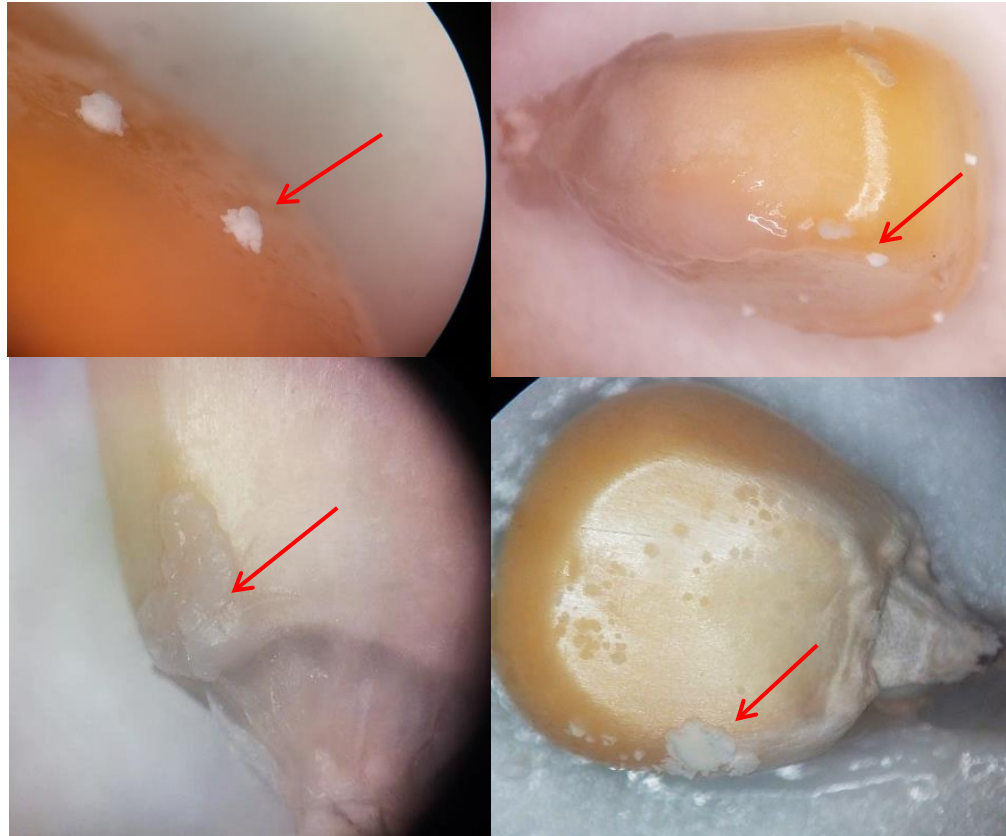


Figura 2. Sementes de milho tratadas com EM sem diluição e não filtrado cobertas por colônias microbianas (setas) em sua superfície.

2.4. Conclusões

Os três EM testados são capazes de diminuir a incidência de fungos fitopatogênicos nas sementes de milho, quando aplicados sem diluição e em contato com a semente.

É possível admitir que os compostos produzidos através da fermentação anaeróbica dos EM possuem substâncias antimicrobianas que contribuem para diminuição da incidência de fungos fitopatogênicos.

Referências bibliográficas

- BARBA, J. T. **Bipolaris sorokiniana (*Cochliobolus sativus*) em sementes de cevada: detecção, transmissão e controle.** 2001. 196 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia). Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2001.
- BARKA, E. A. et al. Taxonomy, physiology and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2015. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- BONFIM, F. P. G.; HONÓRIO, I. C. G.; REIS I. L.; PEREIRA A. J.; SOUZA, D. B. **Caderno dos microrganismos eficientes (EM):** instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM. Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Fitotecnia; 2011. 32p.
- BORGEN, A. Effect of seed treatments with E.M. in control of common bunt (*Tilletia tritici*) in wheat. In: **International Conference On Kyusei Nature Farming**, 5, 1997, Bangkok. Proceedings... Bangkok: APNAN, p. 201-206, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes.** Brasília: MAPA, 2009. 200p.
- COSTA, R. S. et al . Relação entre características morfológicas da cariopse e fusariose em milho. **Pesq. agropec. bras.**, v. 38, n. 1, p. 27-33, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2003000100004>.
- DALY, M. J.; STEWART, D. P. C. Influence of Effective Microorganisms (EM) on vegetable production and carbon mineralization – a preliminary investigation. **Journal of Sustainable Agriculture**, v. 14, n. 2-3, p. 15–25, 1999. Disponível em: https://doi.org/10.1300/J064v14n02_04 . Acesso em 15 de Julho de 2018.
- ELANGO, F.; TABORA, P.; VEGA, J. M.; LAS MERCEDES, G.; RICA, C. Control of Black Sigatoka Disease (*Mycosphaerella fijiensis*) Using Effective Microorganisms. In: **Proceedings of the 5th International Conference on Kyusei Nature Farming**, APNAN, Thailand, p. 226-232, 1999.
- FLORES, Y.; LÓPEZ, F.; VILLANUEVA, J. Efecto de los microorganismos eficaces (EM) y *Trichoderma* spp. sobre la incidencia de *Fusarium* y *Sclerotium rolfsii* en una siembra experimental de pimentón. **Fundación La Salle de Ciencias Naturales**

- Campus Cojedes.** (2012). Disponível em: <http://www.sertox.com.Ar/retel/default.htm>. Acesso em 16 de Julho de 2018.
- GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; DOS SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, v. 30, p. 1-2, 2000. <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v30i12.2362>
- HIGA, T; PARR, J. F. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. Atami: **International Nature Farming Research Center**, 1994.
- HIGA, T.; WIDIDANA, G. N. Concept and theories of effective microorganisms. In: **International Conference On Kyusei Nature Farming**, Khon Kaen. Proceedings... Washington: s.n., 1991b. p.118-24, 1989.
- HUANG, T. Y. et al. Experimental control of plum red spot disease by a biobacterial agent. In: **CAB Abstracts**, 1999. China fruits, v. 4, p. 30, 1998.
- HUANG, T. Y., LI, Q. T., WANG, Z. X., HU, Y. L., FENG, M., LIU, B. Y. Experimental control of plum red spot disease by a biobacterial agent. China fruits, v.4, p. 30, 1998. In: **CAB Abstracts**, 1999 (Abstract 991001897).
- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio De Janeiro: Assessoria e Serviços A Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190 p.
- MELLONI, R.; DUARTE, K. M. R.; CARDOSO; E. J. B. N. Efeito do composto de lixo urbano e/ou E.M.4 (*Effective Microorganisms*) no desenvolvimento de pepino (*Cucumis sativus*) e no controle da fusariose. **Summa Phytopathol.**, v. 21, p. 21-4, 1995. Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/264041224> Acesso em 17 de Julho de 2018.
- MENTEN, J. O. M. Tratamento de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 4.ed., 1996, Gramado. Tratamento químico de sementes: **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, p. 3-24, 1996.
- NCUBE, N. **Evaluation of Effective Microorganisms (EM) on Soil Chemical Properties and Yield of Selected Vegetables in the Eastern Cape, South Africa**. 2008. 156 p. M.Sc. Thesis. (Department of Agronomy, School of Agriculture and Agribusiness, Faculty of Science and Agriculture). University of Fort Hare, Alice,

South Africa. 2008. Disponível em <https://core.ac.uk/download/pdf/145043267.pdf>
Acesso em 5 de julho de 2018.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2.ed. London: MacMillan Press, v.2, 1979. 1191p.

OLIVEIRA, S. A. S.; STARK, E.; FREITAS, J. A. E.; BERBARA, R. L.; SOUZA, S. R. Partição de nitrogênio em variedades de milho (*Zea mays* L.) com a aplicação foliar de microorganismos eficazes e nitrato. **Revista de Ciências da Vida**. Seropédica, RJ, EDUR, v. 31, n. 1, p. 1-21, 2011.

SANTOS, L. F. dos. **Micro-organismos Eficientes: diversidade microbiana e efeito na germinação, crescimento e composição química de capim-marandu**. 2016. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

PEREIRA, O. A. P., CARVALHO, R. V.;CAMARGO, L. E. A. Doenças do milho. In: KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J. A. M., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A. (Eds). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, v. 2, p. 477-488, 2005.

PICCININ, E; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 5-9, 2005.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582005000100001>

TEIXEIRA, N. T.; de WITT, L.; SILVA FILHO, P. R. R. Microrganismos de Regeneração nas Propriedades Químicas do Solo, Desenvolvimento e Produção de Milho. Em: **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 14, n. 2, p. 72-80, 2017. Disponível em:
<http://ferramentas.unipinhal.edu.br/engenhariaambiental/viewarticle.php?id=1499>
Acesso em: 23 07 2018.

CAPÍTULO II

Controle de Patógenos de Sementes de Milho com Microrganismos Eficientes (EM)

RESUMO

Um dos fatores que afetam a qualidade da semente do milho é a incidência de patógenos, dentre eles o *Fusarium verticillioides* que podem promover infestações durante o desenvolvimento, colheita e armazenamento, e produzir toxinas nocivas à saúde humana e animal. Este patógeno causa danos como podridão e tombamento do colmo. Por esse motivo deve-se fazer o tratamento da semente antes do plantio e práticas de controle para evitar a incidência desse fungo na cultura milho. Os agrotóxicos, apesar de apresentarem elevados custos e riscos ambientais, tem sido o método mais frequente no controle fitossanitário de sementes. Insumos que possam substituir os agrotóxicos e que venham a ser utilizados na produção, tratamento e melhoria da qualidade de sementes - e que sejam não poluentes e apresentem resultados consistentes em campo - são a base de uma agricultura sustentável. Os Microrganismos Eficientes (EM), desenvolvidos no Japão há quase 40 anos pelo professor Teruo Higa são formulações empregadas na Agricultura Natural e apresentam potencial para suprir esta demanda. Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho tratadas com EM comparativamente ao tratamento com o fungicida recomendado para a cultura. Três EM de origens distintas foram testados, um comercial e outros dois provindos da agricultura familiar de áreas de Cerrado e Mata Atlântica. Além disto, estes EM foram filtrados e também testados, de forma a excluir os microrganismos, mantendo-se metabólitos secundários produzidos no processo fermentativo. O delineamento experimental inteiramente casualizado foi realizado com oito tratamentos, sendo três de cada um dos EM filtrado e três de cada EM não filtrado, fungicida e testemunha. Duzentas sementes de milho foram embebidas por 30 minutos em cada formulação e foram analisadas pelos testes de sanidade, germinação e primeira contagem, emergência em areia estéril e índice de velocidade de emergência, peso de massa fresca e seca. Pelo teste de sanidade, todas as formulações foram capazes de diminuir incidência dos fungos nas sementes, sendo estatisticamente iguais ao fungicida em eficiência. Para os testes de qualidade fisiológica, não houve influência de nenhum EM testado, exceto para peso de massa fresca e seca, em que houve diferença dos tratamentos fungicida e testemunha, sendo os resultados dos EM de valores inferiores. Isto pode ter ocorrido pelo uso da areia autoclavada, visto que os microrganismos do

EM podem utilizar as sementes substrato e nutriente, quando não há matéria orgânica a ser decomposta na areia, acarretando um estresse para o embrião na formação da plântula, ainda que isso não tenha interferido na germinação.

3.1. Introdução

A ocorrência de doenças e pragas, associadas às sementes, é um dos fatores que mais causam danos aos cultivos agrícolas e aos agroecossistemas, sendo um problema de importância crescente em todo o mundo (MACHADO, 2006). O uso de sementes com alta qualidade fisiológica e sanitária é muito importante na implantação da cultura. Falhas na emergência podem refletir de maneira determinante na densidade final de plantas e, conseqüentemente, na produtividade, em decorrência do milho ter uma baixa capacidade de compensação efetiva entre plantas (GALVÃO et al., 2017).

As sementes de milho são suscetíveis a vários fungos fitopatogênicos que podem causar prejuízos para o estabelecimento da cultura, diminuição do estande e má formação das plântulas (PINTO, 1998). No Brasil, os principais fungos que infestam ou infectam as sementes de milho são *Fusarium verticillioides* e *Acremonium* spp. (sin. *Cephalosporium* spp.), em campo de produção de sementes; e *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., em condições de armazenamento (GOULART, 1994). Esses fungos podem sobreviver no solo por meio de estruturas de resistência e, ainda, em estruturas internas das sementes, como o embrião.

Algumas espécies do gênero *Fusarium* têm sido associadas a doenças do milho, como *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo, *Gibberella zae* (Scw.) Petch) e *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sinônimo, *Fusarium moniliforme* Sheldon; teleomorfo, *Gibberella moniliformis*, sinônimo, *Gibberella fujikuroi*), em todos os estádios de desenvolvimento (SARTORI et al. 2004). As espécies de *Fusarium* podem causar diversos tipos de podridões, sendo a podridão-rosada-da-espiga causada pelo *Fusarium verticillioides* (PINTO et al., 2007). Estas espécies, embora sejam capazes de provocar danos em várias partes das plantas e em muitos casos não estão diretamente ligados à perda de produção, mas estão estreitamente relacionados com problema de baixa qualidade de grãos e sementes pela produção de micotoxinas, como as fumosinas (FIGUEIRA et al., 2003; SWEENEY e DOBSON, 1998; MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997).

Essas toxinas, além de prejudiciais à planta, podem causar doenças nos seres humanos e animais que consumirem o milho contaminado. Devido aos problemas acarretados por esta classe de toxina, órgãos internacionais como o FDA (Food and Drug Administration - EUA) e União Européia estabeleceram limites máximos de concentração de fumonisinas no milho destinado a produção de alimentos e rações (BUTRÓN et al., 2006). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA) estabeleceu limites máximos permitidos de concentração de fumonisinas em milho de pipoca e para alimentos, a base de milho, destinados à alimentação infantil (BRASIL, 2011). Nos últimos anos as agroindústrias tem adotado, como padrão de qualidade, o limite máximo de tolerância de 6% de grãos ardidos em lotes comerciais de milho (MENEGAZZO et al., 2001).

O tratamento realizado diretamente sobre a superfície da semente pode ser uma opção rápida, eficiente e não onerosa para o controle de patógenos. A utilização de produtos químicos, como fungicidas e inseticidas, apesar de apresentar elevados custos e riscos socioambientais, tem sido o método mais frequente no controle fitossanitário de sementes. O uso intensivo de insumos químicos tem um alto potencial de impacto negativo nos agroecossistemas (CAMPANHOLA e BETTIOL, 2003). Ademais, em conformidade com a lei nº 10.831/03, a Instrução Normativa 38, de 2 de agosto de 2011, estabelece normas técnicas para a produção de sementes e mudas de acordo com o sistema orgânico de produção (LIMA et al., 2014), em que são vetados o uso dos agroquímicos.

O investimento em pesquisas no setor de produção de sementes orgânicas é imprescindível, garantindo qualidade, diversificação e disponibilidade ao consumidor; ou a produção própria de sementes, pelo produtor orgânico, tornando-se autossustentável com o tempo (LIMA et al., 2014). Insumos que possam substituir os agrotóxicos e que venham a ser utilizados na produção, tratamento e melhoria da qualidade de sementes - e que não sejam poluentes e apresentem resultados consistentes em campo - são a base de uma agricultura sustentável.

Os Microrganismos Eficientes ou *effective microorganisms* (EM) tem potencial para atender esta demanda (SHAH et al., 2001; MARAMBE e SANGAKKARA, 1997; HIGA e PARR, 1994). As formulações de EM são um composto probiótico e natural, desenvolvido há quase 40 anos no Japão, pelo professor Teruo Higa. A base da tecnologia EM são culturas mistas de microrganismos, considerados benéficos, que possuem propriedades de fermentação, produção de substâncias bioativas, competição e antagonismo com patógenos que propiciam a manutenção do equilíbrio natural dos ecossistemas (CÓNDOR-GOLEC et al., 2007). A tecnologia EM é reconhecida como tecnologia social, baseada no processo de produção das formulações pela captura de microrganismos que ocorrem naturalmente em solos e matas, podendo ser produzidos por agricultores familiares, favorecendo as condições para o desenvolvimento das plantas (BONFIM et al., 2011).

Fica evidente a necessidade do resgate de técnicas alternativas de controle fitossanitário em sistemas familiares e mesmo não convencionais de produção. Apesar da grande difusão de sistemas alternativos junto aos agricultores - e entre eles - a disponibilidade de informações comparativas em relação ao sistema convencional é praticamente inexistente. Este estudo teve a finalidade de avaliar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho tratadas com EM comparativamente ao tratamento com o fungicida recomendado para a cultura.

3.2. Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Associações Micorrízicas pertencente ao Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Micologia e Etiologia de doenças Fúngicas de Plantas do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Minas Gerais, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Para a condução deste experimento, foi utilizado um lote de sementes de milho da variedade BR105, cedido pelo Programa Milho da Universidade Federal de Viçosa. Para cada tratamento, 200 sementes de milho foram embebidas em 100 mL de cada EM e na testemunha (água destilada esterilizada) por 30 minutos (NCUBE, 2008). Foi adicionado um tratamento ao experimento, com o fungicida recomendado para a cultura do milho DEROSAL PLUS[®]-Bayer, seguindo-se as especificações do fabricante quanto ao uso.

3.2.1. Obtenção dos Microrganismos Eficientes (EM)

Foram utilizados três EM de origens distintas, sendo dois obtidos de agricultores familiares e um EM comercial (Tecnologia EM•1[®]), tendo sido o último, doado pela empresa Ambiem Brasil Ltda. Os EM obtidos de agricultores familiares, denominados EMCE e EMMA foram produzidos a partir de microrganismos capturados de área de Cerrado (município de Montes Claros-MG) e Mata Atlântica (município de Viçosa-MG), respectivamente, utilizando-se como substrato o arroz cozido (700 g) colocado ao solo e coberto com material vegetal em decomposição. Após a captura, o arroz com microrganismos de cores claras foi colocado em garrafa juntamente com melaço (200 mL) e água (1800 mL) foi submetido o processo fermentativo que, após cinco dias, resultou em EM pronto para uso (BONFIM et al., 2011). Quanto ao EM comercial (Tecnologia EM•1[®]), denominado EMCOM, foram seguidas as normas do fabricante

para a “ativação”, utilizando-se para tal, o melaço enviado pela empresa juntamente com o produto e, para o tratamento de sementes, preconizadas as instruções de uso.

3.2.2. Sanidade de sementes

Pelo método do teste de papel filtro “blotter test” (BRASIL, 2009), foram utilizadas 200 sementes de cada tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes, colocadas em caixas "gerbox" previamente sanitizadas, contendo duas folhas de papel filtro esterilizado e umedecido com água, seguindo-se ao congelamento, e após, com incubação em câmara a 25 ± 2 °C, com regime de 12 h de luz, durante 24 h e posterior transferência para a câmara a -16 °C por 24 h, a fim de evitar a germinação das sementes. Decorrido esse período, as sementes retornaram às condições iniciais de incubação, permanecendo por cinco dias, sendo, então, avaliada a ocorrência de fungos (NEERGAARD, 1979). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), totalizando oito tratamentos com 200 sementes cada, em oito repetições, totalizando 64 parcelas experimentais.

3.2.3. Germinação e primeira contagem

Após a imersão das sementes nos tratamentos por 30 minutos, realizou-se a semeadura em folhas de papel Germitest, previamente esterilizadas, pelo sistema de rolos umedecidos com água, em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. Os rolos foram mantidos em germinadores à temperatura de 25 ± 2 °C. Aos quatro dias (primeira contagem) e sete dias (%G), foram realizadas as contagens do número de plântulas normais, segundo os critérios das Regras para Análise de Sementes-RAS (BRASIL, 2009). Cada tratamento foi composto de 4 repetições com 50 sementes. A avaliação foi realizada no sétimo dia após a semeadura e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), totalizando oito tratamentos com 200 sementes cada, em quatro repetições, totalizando 32 parcelas experimentais.

3.2.4. Emergência em areia e Índice de Velocidade de Emergência (IVE)

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com 4 repetições de 50 sementes. Cada parcela experimental consistiu de uma bandeja de plástico (51 x 30 x 10 cm) contendo areia, de textura média, peneirada e esterilizada em autoclave a 120 °C por 2 h, por duas vezes com intervalos de 48 horas. O teste foi realizado em uma sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C. O substrato foi umedecido com a quantidade

de água correspondente a 60% da capacidade de retenção, com regulação diária da umidade.

Para a determinação do Índice de Velocidade de Emergência (%IVE), foram realizadas contagens diárias do número de plântulas normais a partir da emergência da primeira, sendo consideradas emergidas as plântulas com plúmulas visíveis e com 1 cm e o índice calculado pela soma do número de plântulas normais que emergiram diariamente dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a emergência, conforme MAGUIRE (1962). Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), totalizando oito tratamentos com 200 sementes cada, em quatro repetições, totalizando 32 parcelas experimentais.

3.2.5. Massa seca e massa fresca de plântulas

Após a finalização do teste de emergência, ao décimo dia após a semeadura, procedeu-se a determinação da biomassa fresca e seca das plântulas de milho, coletando-se a parte aérea, ou seja, acima do ponto de crescimento. Nesta avaliação, foram consideradas todas as plântulas normais originadas nos respectivos tratamentos, as quais foram pesadas em balança de precisão (0,01 g). A massa total obtida, em cada amostra, foi dividida pelo número de sementes utilizadas, obtendo-se a biomassa fresca média de plântula (g plântula^{-1}). Após a pesagem, foram acondicionadas em sacos de papel e levadas para secar em estufa com circulação forçada de ar, regulada à temperatura de 70 ± 2 °C, por um período de 72 h. Em seguida, foi realizada a pesagem do material, obtendo-se a biomassa seca com precisão de 0,01 g. A massa total obtida, em cada amostra, foi dividida pelo número de sementes utilizadas, obtendo-se a biomassa seca média de plântula (g plântula^{-1}). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), totalizando oito tratamentos com 200 sementes cada, em quatro repetições, totalizando 32 parcelas experimentais.

3.2.6. Análise estatística

As análises de variância foram feitas no programa Sisvar para o teste de Dunnett ($P \leq 0,05$), e também pelo programa SAEG no caso dos teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

3.3. Resultados e Discussão

As sementes tratadas com os três EM por 30 minutos apresentaram significativo decréscimo da incidência geral de fitopatógenos, incluindo a diminuição da incidência de *Fusarium* spp. A menor incidência de patógenos foi no tratamento com o fungicida,

porém, todos os tratamentos diferiram da testemunha pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Incidência geral (%) e incidência de *Fusarium* spp. (%) em sementes de milho tratadas com três tipos de EM, fungicida (DEROSAL PLUS[®]) e a testemunha.

Tratamentos		Incidência Geral	Incidência <i>Fusarium</i> spp.
Água destilada		86a	78a
Fungicida		4d*	3c*
EMCE	F	15cd*	9c*
	NF	13cd*	12c*
EMMA	F	17cd*	6c*
	NF	18cd*	15c*
EMCOM	F	41b*	38b*
	NF	20c*	8c*
CV(%)		34,6	38,3

¹As médias seguidas na coluna pelo * se diferenciam a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett em comparação com a testemunha água destilada esterilizada.

²Médias seguidas pela mesma letra na coluna não se diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

³Considera-se “F” para filtrado e “NF” para não filtrado.

A EMMA, assim como o EMCE, diferiu da testemunha pelo teste de Tukey e apresentam os menores valores para incidência geral (Tabela 1). O EM com maior eficiência foi o EMCE não filtrado, seguido pelo EMCE filtrado, promovendo decréscimo de 73% e 71% na incidência, respectivamente. Para o EMCOM, tanto o filtrado como o não filtrado, diferiram da testemunha, no entanto, mostraram-se menos eficientes comparando-se ao tratamento com o fungicida. Ainda assim, o EMCOM não filtrado foi estatisticamente igual aos outros EM pelo teste de Tukey.

O EMCOM filtrado correspondeu ao menor efeito entre os EM avaliados, diminuindo a incidência geral em 45%, o que pode ter ocorrido em função do tempo de ativação que, ainda que seguidas as recomendações do fabricante, pode não ter metabolizado os açúcares e produzidos os compostos antimicrobianos. CASTRO et al. (1993a) observaram a ação inibitória *in vitro* testando o EM com objetivo de controle nos fitopatógenos *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Pseudomonas solanacearum*.

Na análise dos resultados para a incidência de *Fusarium* spp. houve diferença significativa entre os EM testados. Pelo teste de Dunnett, todos os EM promovem um efeito similar ao fungicida (Figura 1). Pelo teste de Tukey, a ocorrência do fungo foi

significativamente decrescida e todos os tratamentos, excetuando-se o EMCOM filtrado, não se diferenciam do fungicida. O efeito mais pronunciado da diminuição da incidência foi para o EMMA filtrado, que promoveu uma redução de 72% na incidência. RITT et al. (2018) observaram a diminuição em 38% na incidência de *Fusarium* spp. em sementes de milho tratadas com EM na dose de 200 mL/100kg de sementes, diferindo significativamente da testemunha.

Em análise ao efeito do EMCOM não filtrado e filtrado (Tabela 1), prospecta-se que o efeito do tratamento teve mais relação com a presença dos microrganismos no composto do que efetivamente dos seus metabólitos secundários. Dentre os microrganismos encontrados nos EM estão as bactérias produtoras de ácido lático que têm a capacidade de suprimir doenças, incluindo microrganismos como *Fusarium* spp., que aparecem em cultivos contínuos e, em circunstâncias normais, enfraquecem as plantas, expondo-as doenças (FEIJOO e REINALDO, 2016).

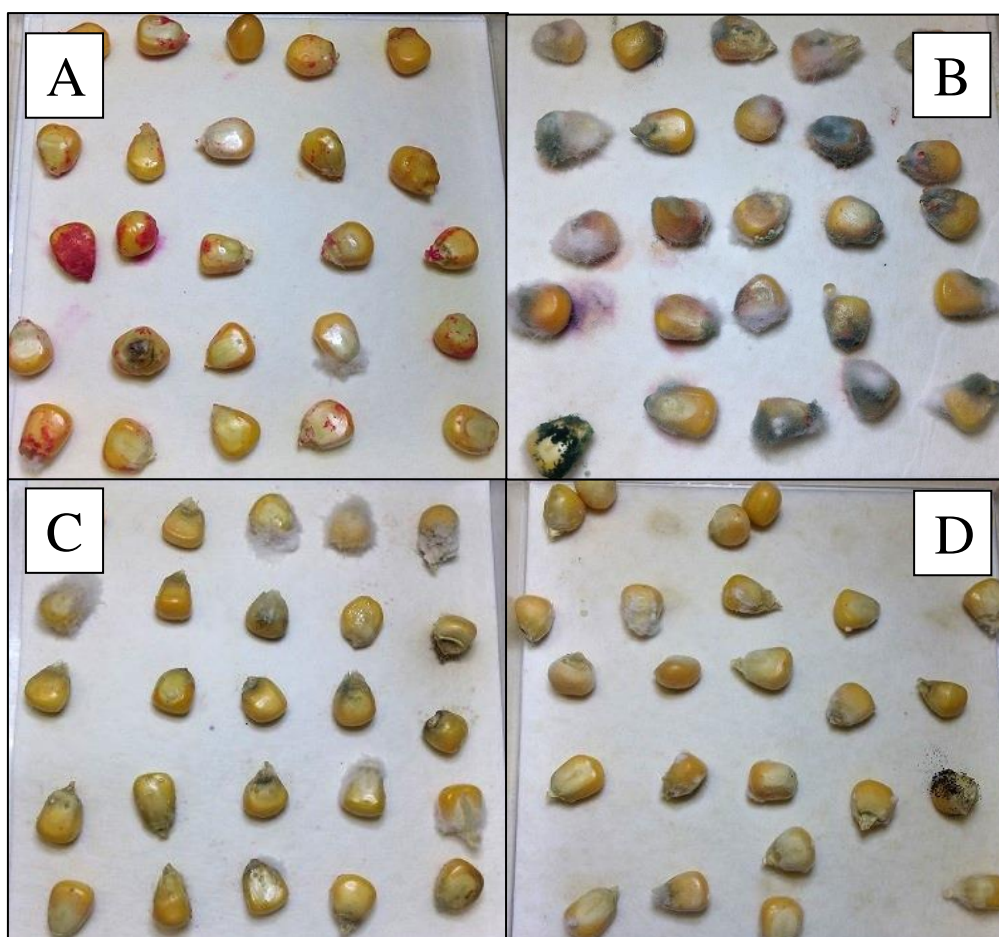


Figura 1. Sementes tratadas com EM, com fungicida e com água destilada esterilizada. (A) Sementes tratadas com fungicida+corante; (B) Sementes tratadas com água destilada esterilizada; (C) Sementes tratadas com EMMA não filtrado; (D) Sementes tratadas com EMCE não filtrado.

Tabela 2. Fungos fitopatogênicos observados e sua incidência em porcentagem nas sementes de milho tratadas com EMCOM, sob diferentes concentrações.

Tratamentos	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Acremonium</i> spp.	
Água destilada	87 ±12,8	10 ±7,7	2 ±4,3	2 ±3,0	
Fungicida	2 ±3,7	0 ±0,0	1 ±1,4	1 ±1,4	
EMCE	F	3 ±4,7	19 ±17,6	0 ±0,0	6 ±7,1
	NF	8 ±10,0	0 ±0,0	2 ±2,1	1 ±1,9
EMMA	F	4 ±4,0	9 ±14,0	0 ±0,0	4 ±3,3
	NF	4 ±4,3	3 ±7,1	2 ±3,0	2 ±4,3
EMCOM	F	33 ±15,4	18 ±13,0	1 ±1,9	0 ±0,0
	NF	3 ±4,2	31 ±9,5	2 ±3,0	7 ±5,2

¹Média±desvio padrão.

²Considera-se “F” para filtrado e “NF” para não filtrado.

O fungo *Penicillium* spp. foi observado em maior quantidade, chegando a 87% de incidência na testemunha e, em menores quantidades, os fungos *Trichoderma* spp., *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp. e *Cladosporium* spp., representando uma baixa incidência para estes em relação àquele. Todos os tratamentos promoveram o decréscimo na incidência de *Penicillium* spp. (Tabela 2) com resultados aproximados aos do tratamento com fungicida, exceto para o EMCOM filtrado, ainda que a incidência neste tratamento tenha sido 54% menor que a testemunha. O gênero *Penicillium* spp. deteriora as sementes em condições de armazenamento e podem prejudicar seu vigor, interferindo na germinação e contribuindo para desenvolvendo plântulas anormais (MACHADO et al., 2000).

Tabela 3. Valores de primeira contagem (PC), germinação (G), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de sementes de milho tratadas com três EM distintos.

Tratamentos		PC	G	E	IVE	MF	MS
		------(%)-----				------(mg)-----	
Água destilada		63 ^{ns}	80 ab	93 ^{ns}	20,1 ab	561ab	11,2ab
Fungicida		67	74 b	92	20,4 a	580a	11,60a
EMCE	F	59	82 a	93	21,3 a	455c	9,11c
	NF	59	81 ab	90	18,7 abc	447c	8,94c
EMMA	F	62	84 a	90	20,1 ab	441c	8,83c
	NF	59	81 ab	88	17,6 bc	468c	9,37c
EMCOM	F	62	82 ab	88	16,8 c	507abc	10,15abc
	NF	59	84 a	91	19,5 ab	487bc	9,74bc
CV(%)		9,7	4,1	3,1	5,8	6,6	6,6

¹Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

²Considera-se “F” para filtrado e “NF” para não filtrado.

^{ns} Não significativo para o teste de Tukey a 5%.

Na avaliação de primeira contagem (PC; Tabela 3), não houve diferença significativa entre os tratamentos. Segundo BHERING et al. (2003), a primeira contagem do teste de germinação pode ser utilizada como um teste de vigor, uma vez que, à medida que a deterioração da semente avança, a velocidade de germinação é reduzida. O resultado da primeira contagem, face aos tratamentos testados, mostra que o EM não promove deterioração da semente. De acordo com LUDWIG et al. (2009), a emergência rápida e uniforme das plântulas é de extrema importância para a cultura do milho, justificando o uso de sementes de qualidade e, conforme os resultados para emergência (E; Tabela 3), não houve diferença entre a testemunha e os tratamentos, o que pode indicar que o EM não interfere, negativamente ou positivamente, na emergência das plântulas de milho em substrato estéril.

O maior valor para porcentagem de germinação (G; Tabela 3.3) se deu no tratamento com o EMCOM não filtrado, e dele não se diferiram estatisticamente os demais tratamentos, exceto o fungicida. O fungicida não promoveu o incremento da germinação em substrato esterilizado, o que está de conformidade com os resultados de PINTO (1997, 1993). SANGAKKARA e ATTANAYAKE (1996) verificaram que sementes de arroz tratadas com EM (1:500) apresentaram aumento na germinação e no crescimento. Santos (2016) constatou que houve maior porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação em sementes de capim-marandu tratadas com inoculantes EM nas concentrações 1% e 2% em água. A eficiência do EM na germinação de sementes pode estar relacionada com a capacidade de degradação do respectivo revestimento pelos microrganismos, por meio de enzimas produzidas, permitindo a absorção de água, oxigênio e germinação (MOWA e MAASS, 2012).

Houve diferença entre os tratamentos para a análise do IVE de plântulas em areia (IVE; Tabela 3). Pelo referido teste, pôde-se constatar que as sementes tratadas com EMCOM filtrado, EMMA não filtrado e o EMCE não filtrado exibiram menor vigor, o que não foi demonstrado pelo teste de primeira contagem, que também avalia o vigor em relação aos tratamentos. Pode ser que resultados discordantes dos referidos testes estejam associados ao princípio dos mesmos, pois são realizados em condições diferentes.

As sementes vigorosas proporcionam maior transferência de massa seca de seus tecidos de reserva para o eixo embrionário, na fase de germinação, originando plântulas com maior peso, em função do maior acúmulo de matéria (NAKAGAWA, 1999). Os tratamentos com maior peso médio de massa fresca foram a testemunha e o fungicida (Tabela 3), que não diferiram do EMCOM filtrado. Os outros tratamentos (MF; Tabela 3) apresentaram decréscimo no peso das plântulas avaliadas, sem diferenciar do EMCOM filtrado e essa tendência permaneceu para os resultados de peso de massa seca (Tabela 3). Na condição de semeadura das sementes de milho, para este teste em areia estéril, a pressão microbiana pode vir a recair sobre a semente enquanto substrato e fonte de nutriente. Esse estresse pode propiciar a diminuição da transferência de massa de seus tecidos de reserva para o eixo embrionário, influenciando na peso de massa seca, ainda que isso não comprometa a germinação e a emergência (Tabela 3).

3.4. Conclusões

Os Microrganismos Eficientes diminuem a quantidade de fungos causadores de doenças nas sementes de milho e podem substituir os tratamentos com fungicida em sementes de milho.

Os EM pode ser utilizado inoculado nas sementes sem interferir em sua germinação e vigor, porém interferindo no índice de velocidade de emergência, massa fresca e massa seca.

Referências bibliográficas

- BHERING, M. C. et al . Avaliação do vigor de sementes de melancia (*Citrullus lunatus* Schrad.) pelo teste de envelhecimento acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 2, p. 1-6, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222003000400001>
- BONFIM, F. P. G; HONÓRIO, I. C. G.; REIS I. L.; PEREIRA A. J; SOUZA, D. B. **Caderno dos microrganismos eficientes (EM):** instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM. Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Fitotecnia; 2011. 32p.
- BRASIL. Lei nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União** (DOU), Brasília, nº 37, p. 72-73, de 22 de fevereiro de 2011. Disponível em <http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jspp?jornal=1&pagina=72&data=22/02/2011> Acesso em 26 de junho de 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília: MAPA, p. 200, 2009.
- BUTRÓN, A; SANTIAGO, R.; MANSILLA, P.; PINTOS-VARELLA, C.; ORDÁS, A.; Malvar, R. A. Maize (*Zea mays* L.) genetic factors for preventing fumonisin contamination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 6113-6117, 2006. <http://doi.org/10.1021/jf0611163>
- CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Métodos alternativos de controle fitossanitário. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, p. 13-50, 2003.
- CASTRO, C. M., MOTTA, S. D., AKIBA, F., RIBEIRO, R. L. D. Microrganismos Eficazes (EM) no controle de fungos e bactérias fitopatogênicas. In: Fundação Mokiti Okada. **Experimentos sobre o uso de microrganismos eficazes (E.M.) no Brasil**. São Paulo: Fundação Mokiti Okada, p.98-102, 1993a.
- CÓNDOR-GOLEC, A. F.; GONZALEZ PEREZ, P.; LOKARE, C. Microorganismos eficazes: ¿mito o realidad?. **Revista Peruana de Biología**. [online], vol. 14, n. 2, p. 315-319, 2007. Disponível em: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000300026&lng=es&nrm=iso . Acesso em 16 de Julho de 2018.

FEIJOO, M. A. L.; REINALDO, J. R. M. Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores. In: **Revista Científica Agroecosistemas** [série online], v. 4, n. 2, p. 31-40, 2016. Disponível em: <http://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/index> Acesso em 5 de julho de 2018.

FIGUEIRA, E. L. Z. et al. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 2, p. 359-378, 2003. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2003v24n2p359>.

GALVÃO, J. C. C.; BORÉM, A.; PIMENTEL, M. A. **Milho**: do plantio à colheita. 2.ed. Viçosa (MG): Ed. UFV, 2017. 382p.

GOULART, A. C. P. Qualidade sanitária de sementes de milho “BR-201” produzidas na região de Dourados, MS, no ano de 1993. **Informativo ABRATES**, v. 4, n. 3, p. 53-55, 1994. Disponível em https://www.researchgate.net/profile/Augusto_Goulart/publication/280945323_Qualidade_de_sanitaria_de_sementes_de_milho_BR-201_produzidas_na_regiao_de_Dourados_MS_no_ano_de_1993/links/55cdea508ae6a8813810781/Qualidade-sanitaria-de-sementes-de-milho-BR-201-produzidas-na-regiao-de-Dourados-MS-no-ano-de-1993.pdf Acesso em 7 de julho de 2018.

HIGA, T; PARR, J. F. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. Atami: **International Nature Farming Research Center**, 1994.

LIMA, V. C. S. et al. Produção orgânica de sementes: desafios e perspectivas. **Cadernos de Agroecologia**, [S.l.], v. 9, n. 4, feb. 2015. ISSN 2236-7934. Disponível em: <http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/cad/article/view/16540> Acesso em: 17 de julho de 2018.

LUDWIG, M. P. et al. Desempenho de sementes e plantas de milho híbrido originadas de lotes de sementes com alta e baixa qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 8, n. 1, p. 83-92, 2009. <http://dx.doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v8n1p83-92>

MACHADO, J. C.; WAQUIL, J. M.; SANTOS, J. P.; REICHENBACH, J. W. Tratamento de sementes no controle de fitopatógenos e pragas. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 232, p. 76-87, 2006. Disponível em:

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489541/1/Tratamentosementes.pdf>

Acesso em 17 de julho de 2018.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 13p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination and in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

MARAMBE, B.; SANGAKKARA, U. R.; SENANAYAKE, Y. D. A. Impact of effective microorganisms on dry matter partitioning in maize (*Zea mays* L.). In: **Fifth International Conference on Kyusei Nature Farming**, p. 112-119, 1998.

MENEGAZZO, R.; GIACOMINI, V.; TRICHEZ, M. A.; LAZZARI, F. A. Amostragem e monitoramento de micotoxinas em matérias-primas para rações. In: Simpósio em armazenagem qualitativa de grãos do Mercosul. Londrina. **Anais...** Londrina, PR: SAG-Mercosul, n. 2, p. 161-171, 2001.

MOWA, E.; MAASS, E. The effect of sulphuric acid and effective micro-organisms on the seed germination of *Harpagophytum procumbens* (devil's claw). In: **South African Journal of Botany**, v. 82, p. 193-199, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.05.006>

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant disease**, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.6.556>.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, p.49-85, 1999.

NCUBE, N. **Evaluation of Effective Microorganisms (EM) on Soil Chemical Properties and Yield of Selected Vegetables in the Eastern Cape, South Africa**. 2008. 156 p. M.Sc. Thesis. (Department of Agronomy, School of Agriculture and Agribusiness, Faculty of Science and Agriculture). University of Fort Hare, Alice, South Africa. 2008. Disponível em <https://core.ac.uk/download/pdf/145043267.pdf>
Acesso em 5 de julho de 2018.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2.ed. London: MacMillan Press, v. 2, 1979. 1191p.

PINTO, N. F. J. A.; OLIVEIRA, E.; FERNANDES, F. T. Manejo das principais doenças do milho. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, **Circular técnica (INFOTECA-E)**, n. 92, 2007. 16 p. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/482702>

PINTO, N. F. J. A. Patologia de sementes de milho. Sete Lagoas: Embrapa- CNPMS, **Circular Técnica (INFOTECA-E)**, n. 29, 1998. 44p. Disponível em <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/482099>

PINTO, N.F.J.A. Eficiência de fungicidas no tratamento de sementes de milho visando o controle de *Fusarium moniliforme* e *Pythium* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, p. 797-801, 1997. Disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44669/1/EFICIENCIA-DE-FUNGICIDAS-NO-TRATAMENTO-DE-SEMENTES-DE-MILHO.pdf>

Acesso em 6 de julho de 2018.

PINTO, N.F.J.A. Tratamento das sementes com fungicidas. In: Tecnologia para produção de sementes de milho. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, **Circular Técnica**, n. 19, p. 43-47, 1993. Disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/37598/1/circ-19.pdf> Acesso em 23 de julho de 2018.

RITT, A. L.; STANGARLIN, J. R.; BARABASZ, R. F; NASCIMENTO, A. S.; HELING, A. L.; KOHLER, T. R. Teste de patogenicidade em sementes de *Zea mays* L. tratadas com produtos da agricultura orgânica. In: **III CICA – CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**. PUCPR- Campus Toledo, 2018.

SANGAKKARA, U. R., ATTANAYAKE, A. M. U. Effect of E.M. on germination and seedling growth of rice. In: **International Conference On Kyusei Nature Farming**, v. 3, Santa Barbara. Proceedings... Washington:s.n., p.223-7, 1996. Disponível em: <http://www.em-pars.com/wp-content/uploads/2018/05/13-effect-of-em-on-germination-and-seedling-growth-of-rice.pdf> Acesso em 17 de julho de 2018.

SANTOS, L. F. dos. **Micro-organismos Eficientes: diversidade microbiana e efeito na germinação, crescimento e composição química de capim-marandu**. 2016. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

SARTORI, A. F.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 456-458, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582004000400018>.

SHAH, S. H.; SALEEM, M. F.; SHAHIEL, M. Effect of different fertilizers and effective microorganisms on growth, yield and quality of maize. In: **International Journal Of Agriculture & Biology**., v. 3, p. 378-379, 2001. Disponível em: http://www.fsppublishers.org/published_papers/74134..pdf Acesso em 17 de julho de 2018.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 141-158, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00112-3)

CAPÍTULO III

Potencial de microrganismos isolados de sementes tratadas com Microrganismos Eficientes (EM) no biocontrole de *Fusarium verticillioides*

RESUMO

A agricultura sustentável preconiza o uso do controle alternativo de doenças de plantas que pode ser viabilizada pelo controle biológico e a utilização de microrganismos com potencial antagonista pode ser uma maneira de inibir o desenvolvimento de fitopatógenos. Uma estratégia direta envolve a introdução de antagonistas nas sementes, nos órgãos de propagação vegetativa ou na parte aérea das plantas. Os “Microrganismos Eficientes” (*Effective Microorganismes*), conhecido pelo acrônimo EM, que contém espécies de microrganismos, onde predominam bactérias que produzem ácido láctico e levedura, e um número mais reduzido de bactérias fotossintéticas, actinomicetos e outros tipos, todos compatíveis entre si, coexistindo em cultura líquida. Formulações de EM são conhecidas por suprimir fitopatógenos nos solos, inclusive espécies de *Fusarium*, frequentemente associadas às sementes de milho e que podem promover perda da qualidade das sementes e prejudicar o desenvolvimento das plantas. Pôde-se comprovar, por meio de experimentos, que sementes tratadas com EM apresentavam diminuição da incidência de *Fusarium* spp. concomitantemente à sua colonização com microrganismos de características morfológicas diversas e não fúngicas. Assim, o objetivo deste experimento foi investigar a capacidade de inibição do crescimento micelial do *Fusarium verticillioides* por isolados obtidos de sementes de milho tratadas com EM de origens diferentes. Microrganismos obtidos de sementes de milho tratadas com EM foram avaliados em teste de cultura pareada com *Fusarium verticillioides*. O teste *in vitro* foi realizado obtendo-se 42 isolados da superfície das sementes e incubados em câmara a 25 °C, 24 horas, e após, na extremidade oposta da placa de petri, foi depositado um disco contendo micélios do fungo fitopatogênico. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em três repetições, totalizando 126 unidades experimentais, com a testemunha, que consistiu em apenas o patógeno na placa. Ao final do teste, foi medido o crescimento micelial do fungo. Dos 42 isolados obtidos das sementes de milho, 21 mostraram capacidade de inibir do crescimento micelial do *F. verticillioides* com porcentagens de inibição entre 46% e 4%. Foram observados diferentes mecanismos de antagonismo, mas principalmente por competição e antibiose.

4.1. Introdução

A agroecologia preconiza o uso do controle alternativo de doenças de plantas que pode ser viabilizada pelo controle biológico e a utilização de microrganismos com potencial antagonista pode ser uma maneira de inibir o desenvolvimento de fitopatógenos. O controle biológico tem sido alcançado através de diversas estratégias, de forma direta ou indireta (MARIANO e ROMEIRO, 2000), e uma delas é a utilização de microrganismos que possuam potencial de diminuir a ação dos patógenos em plantas. Uma estratégia direta envolve a introdução de antagonistas nas sementes, nos órgãos de propagação vegetativa ou na parte aérea das plantas.

O fungo *Fusarium verticillioides* (sinônimo, *F. moniliforme.*) é um dos principais patógenos associados a sementes de milho no Brasil. O fungo pode ser introduzido pelas sementes em áreas isentas, causando deterioração de sementes, morte de plântulas, podridão radicular, do colmo e da espiga (SARTORI et al., 2004). O uso de microrganismos que antagonizam patógenos de plantas é uma saída sustentável para a problemática do controle de doenças na agricultura, a qual se perpetua por anos de cultivo agrícola, apesar do uso intensificado de agrotóxicos (ABRASCO, 2015).

Grande parte das pesquisas relatando o uso de antagonistas para o biocontrole de doenças induzidas por fungos fitopatogênicos relatam o *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole (SARAVANAKUMAR et al., 2016; TAGHDI et al., 2015; MILANESI et al., 2013), ou seja, a maioria das abordagens aplicadas ao controle biológico de doenças de plantas tem sido baseada no uso de um único antagonista contra o patógeno alvo. Esses mecanismos podem atuar de forma sinérgica e a sua importância nos processos de biocontrole depende, não só da espécie, mas do isolado, do fungo a que antagoniza, do tipo de cultivo e das condições ambientais tais como disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura e umidade (BENITÉZ et al., 2004).

O conceito de Microorganismos Eficientes (*Effective Microorganisms* - EM), é baseado em uma tecnologia desenvolvida no final dos anos 1970 pelo professor Teruo Higa, na Universidade de Ryukyus em Okinawa, Japão. Essas formulações são culturas mistas de microrganismos, sem manipulação genética, presentes em ecossistemas naturais, fisiologicamente compatíveis entre si (ECOLOGIC MAINTENANCES, 2012). O produto é comercializado no Brasil e em várias partes do mundo, entretanto, formulações produzidas por agricultores familiares são empregadas em sistemas de

cultivo que trabalham com manejo agroecológicos e objetivam redesenhar agroecossistemas mais sustentáveis (ALTIERI, 1999).

O EM pode conter, em sua composição, uma quantidade variável de *Lactobacillus* spp., *Rhodopseudomonas* spp. e *Streptomyces griseus* (DALY e STEWART 1999, HIGA, 1998). Pode influenciar as condições de desenvolvimento de microrganismos que vivem em um determinado solo, afetando o crescimento e desenvolvimento das plantas (WIELGOSZ et al. 2010; CÓNDOR-GOLEC et al. 2007). A ação inibitória dos microrganismos eficientes frente a espécies de *Fusarium* spp. é relatada na literatura (PUGLIESE et al., 2010; OKORSKI et al., 2010; DUARTE et al., 2006), sendo a grande maioria das informações relacionadas ao tratamento de solo e escassos os trabalhos abordando tratamento de sementes.

Sementes de milho tratadas com EM e submetidas a teste de sanidade apresentaram colônias microbianas em sua superfície. A ocorrência desses microrganismos coincidiu com a diminuição da incidência *Fusarium* spp. na avaliação do teste, o que pôde ser tomado como indicativo de método controle. Portanto, o objetivo dos ensaios subsequentes foi investigar a capacidade de inibição do crescimento micelial do *Fusarium verticillioides* por isolados obtidos de sementes de milho tratadas com EM.

4.2. Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Associações Micorrízicas, pertencente ao Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os isolados foram nominados de acordo com sua origem, sendo que “CE” corresponde a um isolado retirado de semente de milho tratadas com EM produzido em região de Cerrado, “MA” é referente a um isolado retirado de semente de milho tratadas com EM produzido em região da Zona da Mata mineira, seguidos de “F” para EM filtrado e “NF” para não filtrado.

4.2.1. Obtenção das culturas puras dos isolados

Os microrganismos foram coletados da superfície das sementes de milho, plaqueados em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 25 mL de meio BDA (batata-dextrose-ágar) e, posteriormente, mantidos em câmara de incubação tipo BOD a 25 ± 2 °C por cinco dias. Foram obtidos 42 isolados que, após seu crescimento à

temperatura ambiente, foram repicados para novas placas de Petri contendo 25 mL de meio BDA enriquecido com 1% de Extrato de Levedura. As colônias foram purificadas repetindo-se o processo de repicagem por três vezes, utilizando-se o método de estrias simples, cultivando-se os microrganismos no mesmo meio (BDA enriquecido com 1% de extrato de levedura) e mantendo as condições de cultivo do isolamento (MELO et al., 2006).

4.2.2. Obtenção do *Fusarium verticillioides*

O fitopatógeno *Fusarium verticillioides* foi obtido através de acesso a Micoteca pertencente ao Departamento de Fitopatologia da UFV. Fez-se o plaqueamento do material recuperado em placas de Petri contendo 25 mL de meio BDA e, posteriormente, foi mantido em câmara de incubação tipo BOD a 25±2 °C por cinco dias para crescimento. No quinto dia, fez-se a repicagem para dez placas de Petri contendo meio de cultura BDA e o material foi mantido em câmara de incubação tipo BOD a 25±2 °C por quatro dias para crescimento.

4.2.3. Ensaio de cultura pareada

Para avaliar o antagonismo dos isolados contra o patógeno *F. verticillioides*, utilizou-se o método de cultura pareada descrito por DENNIS e WEBSTER (1971), com adaptações. Foram utilizadas placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 20 mL de meio de cultura BDA enriquecido com Extrato de Levedura, calibrado a este volume com auxílio de pipeta tipo bico de papagaio. Com uma alça de semeadura contendo colônias do microrganismo antagonista, foi realizada uma repicagem para um ponto da placa distante 1,5 cm da borda. Após 24 h, disco de seis mm de diâmetro contendo micélio do patógeno com quatro dias de incubação foi transferido para a extremidade oposta na placa de Petri com localização distante, também, a 1,5 cm da borda. O controle consistiu em placa contendo somente o patógeno, sem a presença do isolado. As placas foram mantidas em câmara de incubação tipo BOD a 25±2 °C por sete dias.

As avaliações consistiram na medição do crescimento micelial do *Fusarium verticillioides* ao sétimo dia de incubação das colônias do patógeno, com auxílio de um paquímetro digital. A porcentagem da inibição do crescimento foi calculada usando a fórmula descrita por MENTEN et al.(1976), onde Porcentagem de Inibição = [(C – T)/C] x 100, onde; C= crescimento radial do controle; T= crescimento radial do tratamento. Neste teste empregou-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 42 isolados, além da testemunha, e três repetições totalizando 129 unidades

experimentais. A análise estatística foi realizada apenas com os 21 isolados que apresentaram inibição do crescimento de *F. verticillioides*.

4.3. Resultados e discussão

Dentre os 42 isolados avaliados no ensaio de cultura pareada, 21 demonstraram potencial antagonico ao *F. verticillioides*, ou seja, houve efeito de inibição no crescimento micelial do patógeno quando comparado à testemunha (Tabela 1). De acordo com o agrupamento realizado pelo teste Scott-knott, houve diferença significativa entre os isolados testados com inibições ocorrendo entre 46 e quatro por cento.

Por meio do teste *in vitro* foi observada uma diversidade de interações antagonistas entre os isolados e o patógeno. Em alguns casos, foi associada à competição, em vista do crescimento do isolado impedir o crescimento do fungo comparado à testemunha, concorrendo por espaço e nutrientes (Figura 1). Segundo MENTEN (1996), microrganismos podem ser usados como biocontrole, que, aplicados em sementes, podem eliminar ou impedir o desenvolvimento de patógenos transportados pelas sementes ou presentes no solo, tendo ação de antagonismo, hiperparasitismo e/ou competição contra ele.

Tabela 1. Porcentagem de inibição crescimento micelial de *Fusarium verticillioides* em função do isolado testado no ensaio de cultura pareada.

Isolado	Inibição (%)
CENF10	4 b
MAF5	6 b
MAF7	8 b
CEF1	10 b
MANF7	12 b
MAF1	12 b
CENF8	12 b
CENF5	14 b
MAF6	14 b
CENF4	14 b
CENF2	18 b
MANF9	18 b
CENF1	24 a
CEF3	26 a
CEF6	28 a
CEF5	30 a
CEF2	30 a
MANF6	30 a
MANF8	34 a
MANF12	34 a
MANF11	46 a
CV(%)	40,98

Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott a 5%.

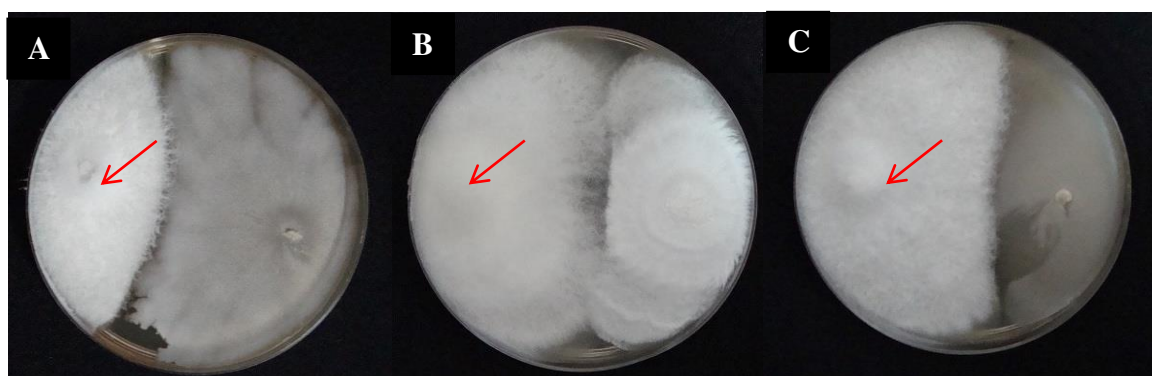


Figura 1. Competição *in vitro* por substrato entre alguns isolados (à direita na placa) e o fitopatógenos (à esquerda na placa/seta). (A) MANF11 x *F. verticillioides*; (B) MANF8 x *F. verticillioides*; (C) MANF9 x *F. verticillioides*.

Em alguns casos, foi verificada a capacidade dos isolados exercerem antibiose (Figura 2). A especificidade de um isolado para exercer antibiose ocorre mediante à produção de metabólitos pertencentes a uma variedade de classes de compostos químicos, que podem sugerir diferentes mecanismos de ação, e esta capacidade de produzir metabólitos tóxicos com efeito fungicida ou fungistático pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie (VINALE et al., 2008). A antibiose pode ser associada à inibição do desenvolvimento e crescimento do fitopatógeno pelo isolado.

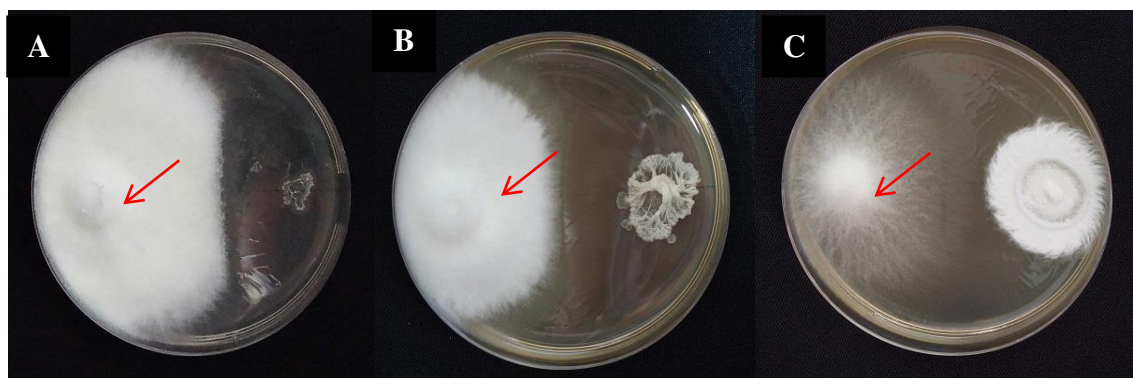


Figura 2. Antibiose *in vitro* de alguns isolados interferindo no crescimento e desenvolvimento do fitopatógeno. (A) CEF6 x *F. verticillioides*; (B) CEF2 x *F. verticillioides*; (C) MANF12 x *F. verticillioides*.

A capacidade de produção de antibióticos por antagonistas pode interferir no desenvolvimento do fitopatógeno, bem como a competição destes por espaço e nutrientes (BELL et al., 1982). Os microrganismos eficientes coexistem em meio líquido com a presença desses metabólitos, e toda essa atividade microbiana pode potencialmente ser utilizada para fins de controle biológico de doenças, pois atende os princípios necessários (DEBACH, 1992).

SANTOS (2016) estudou a diversidade microbiana de microrganismos provindos de EM de três origens distintas e concluiu que eles compartilham unidades taxonômicas operacionais (OTU's), ou seja, possuem filós comuns aos três EM, incluindo Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Synergistetes. O gênero *Bacillus*, presente no filo Firmicutes, é muito estudado pelo efeito benéfico no crescimento de plantas e antagonismo a fitopatogênicos em geral (KUMAR et al. 2012). Dentro do filo Actinobactéria, os membros da ordem Actinomycetales são importantes produtores de antibióticos (BARKA et al. 2015).

4.4. Conclusão

Microrganismos isolados de sementes tratadas com EM podem inibir o crescimento micelial de *F. verticillioides*.

Referências Bibliográficas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA - ABRASCO, Dossiê: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde/ Organização de Fernando Ferreira Carneiro. Lia Giraldo da Silva Augusto, Raquel Maria Rigotto, Karen Friedrich e André Campos Búrio – Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: **Expressão Popular**, 2015.

ALTIERI, M. **Bases científicas para uma agricultura sustentável**. Montevideo: Nordan Comunidad 1999, 400p.

BARKA, E. A. et al. Taxonomy, physiology and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2015. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>

BENITEZ, T.; RINCÓN, A, M.; LIMÓN, M.C; CÓDON, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Barcelona-Spain, v. 7, p. 249-260, 2004. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/22677/000738811.pdf?sequence=1>
Acessado em 10 de Julho de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de análise sanitária de sementes. Brasília: MAPA, p. 200, 2009.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>

CÓNDOR-GOLEC, A. F.; GONZALEZ PEREZ, P.; LOKARE, C. Microorganismos eficaces: ¿mito o realidad? **Revista Peruana de Biología**. [online], vol. 14, n. 2, p. 315-319, 2007. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000300026&lng=es&nrm=iso

DALY, M. J.; STEWART, D. P. C. Influence of Effective Microorganisms (EM) on vegetable production and carbon mineralization – a preliminary investigation. **Journal of Sustainable Agriculture**, v. 14, n. 2-3, p. 15–25, 1999. https://doi.org/10.1300/J064v14n02_04

DEBACH, P; ROSEN, D. Biological control by natural enemies. **Ecology**, v. 73, n. 4, 1992. Disponível em : <https://doi.org/10.2307/1940696>

- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 25-39, 1971. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80077-3)
- DUARTE, M. de L. R.; LIMA, W. G.; CHU, E. Y.; KONAGANO, M.; ALBUQUERQUE, F. A. B. de. Controle alternativo da podridão-das-raízes da pimenteira-do-reino com microrganismos eficazes (EM). **Série Embrapa Amazônia Oriental**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, v. 55, Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 22p.
- ECOLOGIC MAINTENANCES. Microorganismos efectivos EM en la Agricultura. Yucatán, México. 2012. Disponível em <http://www.emmexico.com>
- HIGA, T. Effective Microorganisms, concept and recent advances in technology. Proc. Conf.on Effective Microorganisms for a sustainable agriculture and environment. In: **4th Int. Conf. Kyusei Nature Farming, Bellingham** – Washington, p. 247–248, 1998.
- KUMAR, P.; DUBEY, R. C.; MAHESHWAR, I D. K. Bacillus strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, v. 167, n. 8, p. 493-499, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002>
- MARIANO, R. L. R.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle Biológico. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, v. 2, p. 305-324, 2000.
- MELO, F. M. P. et al. Diversidade de Actinobactérias da Rizosfera de Milho (*Zea mays* L.) e Potencial de Controle Biológico de *Fusarium moniliforme* e *Pythium aphanidermatum*. In: **Anais da Jornada Acadêmica da Embrapa Meio Ambiente**. p. 25-28, 2006. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1027202>. Acesso em julho 2018.
- MENTEN, J. O. M. Tratamento de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 4. ed., 1996, Gramado. Tratamento químico de sementes: **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, p. 3-24, 1996.
- MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C. C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*

- (Tass.) Goid. “in vitro”. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1983-40632013000400014>
- MILANESI, P. M.; BLUME, E. ANTONIOLI, Z. I.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, R. F. dos; FINGER, G.; DURIGON, M. R. Biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 347-356, 2013.
http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2013000300010&lng=pt&nrm=iso
- OKORSKI, A.; OLSZEWSKI, J.; GLOWACKA, K.; OKORSKA, S.; PSZCZÓŁKOWSKA, A. The effect of the application of the biological control agent EM1 on gas exchange parameters and productivity of *Pisum sativum* L. infected with *Fusarium oxysporum* Schlecht. **Acta Agrobotanica** v. 63, n. 2, p. 105-115, 2010.
<https://doi.org/10.5586/aa.2010.038>
- PUGLIESE, M.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Efficacy Of Microorganisms Selected from Compost to Control Soil-Borne Pathogens. In: **Communications in agricultural and applied biological sciences**, v. 75, n. 4, p. 665-669, 2010.
- SANTOS, L. F. dos. **Micro-organismos Eficientes: diversidade microbiana e efeito na germinação, crescimento e composição química de capim-marandu**. 2016. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.
- SARAVANAKUMAR, K.; YU, C.; DOU, K.; WANG, M.; LI, Y.; CHEN, J. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. spp. cucumerinum. **Biological Control**, v. 94, p. 37-46, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.001> . Acesso em 02 de Abril de 2018.
- SARTORI, A. F.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 456-458, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582004000400018>.
- TAGHDI, Y.; HERMOSA, R.; DOMÍNGUEZ, S.; RUBIO, M. B.; ESSALMANI, H.; NICOLÁS, C.; MONTE, E. Effectiveness of composts and *Trichoderma* strains for

control of *Fusarium* wilt of tomato. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 2, n. 54, p. 232-240, 2015. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-15226.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; SHERIDAN L. WOO, S.L.; LORITO, M. Trichoderma-plant-pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1-10, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>

WIELGOSZ, E.; DZIAMBBA S.; DZIAMBBA J. Effect of application of EM spraying on the populations and activity of soil microorganisms occurring in the root zone of spring barley. **Polish Journal of Soil Science**, v. 43, n. 1, p. 65-72, 2010. Disponível em:

<http://www.pjss.org/pl/zeszyty.html?stan=detail&paper=227&i=7&vol=43&numer=1>.

Acesso em 03 de Junho de 2018.

5. Conclusão Geral

Os Microrganismos Eficientes (EM), mesmo que de diferentes origens, podem ser utilizados no tratamento de sementes de milho através da inoculação das sementes.

Os metabólitos secundários produzidos durante o processo fermentativo do EM inibem o crescimento de fungos fitopatogênicos em sementes de milho.

A inoculação de sementes com o EM não interfere em sua qualidade fisiológica.

Sementes tratadas com EM podem ser colonizadas com microrganismos antagonistas ao *Fusarium verticillioides*.