

Eventos Técnicos & Científicos

e-ISSN 0000-0000

001

Julho//2025

OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL



Anais

XXI Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Milho e Sorgo PIBIC/CNPq

29 e 30 de agosto de 2023
Sete Lagoas, MG



Embrapa
Milho e Sorgo

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura e Pecuária*

e-ISSN 000-0000

Eventos Técnicos & Científicos

001

Julho/2025

Anais

XXI Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Milho e Sorgo PIBIC/CNPq

**29 e 30 de agosto de 2023
Sete Lagoas, MG**

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2025*

Embrapa Milho e Sorgo

Rodovia MG 424 Km 45 Esmeraldas II, C.P 151 - 35701-970
Sete Lagoas, MG,
Fone: (32) 3311-7405
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo>
<https://www.embrapa.br/busca-geral/-/busca/sacbusca/sac?buscaPortal=sac>

Comitê Local de Publicações

Presidente

Lauro José Moreira Guimarães

Secretário-executivo

Antônio Carlos de Oliveira

Membros

Guilherme Ferreira Viana

Rosângela Lacerda de Castro

Arystides Resende Silva

Ciro Augusto de Souza Magalhães

Cláudia Teixeira Guimarães

Enilda Alves Coelho

Supervisão editorial

Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto

Antônio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica

Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento das ilustrações

Márcio Augusto Pereira do

Nascimento

Editoração eletrônica

Márcio Augusto Pereira do

Nascimento

Projeto gráfico da coleção

Márcio Augusto Pereira do

Nascimento

1ª edição

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Milho e Sorgo (21.: 2023 : Sete Lagoas, MG).

Anais [do] XXI Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Milho e Sorgo: PIBIC/CNPq, 29 e 30 de agosto de 2023. – Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2025.

PDF (110 p.) : il. color. – (Eventos Técnicos & Científicos / Embrapa Milho e Sorgo, e-ISSN 0000-0000 ; 001).

1. Iniciação científica. 2. Pesquisa científica. 3. Comunicação científica. 4. Evento. I. Título. II. Série.

CDD (21. ed.) 633.15

Coordenação

*Christianne Cardoso Macieira de Souza Lima
Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG*

Equipe de Apoio

*Pedro Paulo Cândido da Fonseca
Elena Charlotte Landau
Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG*

Comitê técnico-científico

Avaliadores internos

*Tatiana Teixeira de Melo
Samuel Campos Abreu
Daniel Pereira Guimarães*

Avaliadores externos

*Frederick Mendes Aguiar
Daniel Bini
Ana Carolina Maciel Redoan*

Apresentação

Os resumos expandidos do XXI Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Milho e Sorgo – PIBIC/CNPq, realizado nos dias 29 e 30 de agosto de 2023, são registrados neste Documento. O Seminário PIBIC/CNPq é um importante evento anual, realizado na Unidade de Pesquisa, e tem como principal objetivo incentivar os jovens do ensino superior na realização e divulgação dos resultados das pesquisas vinculados ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), promovido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) em parceria com a Embrapa.

Estes trabalhos abordam uma diversidade de temas estratégicos para o desenvolvimento da agricultura brasileira, como o melhoramento genético de plantas, o controle de pragas e doenças, a integração lavoura-pecuária-floresta, o desenvolvimento e uso de bioinsumos e a produção de alimentos funcionais. A variedade e a qualidade dos estudos apresentados evidenciam o engajamento dos bolsistas com a pesquisa científica e o compromisso das instituições envolvidas com a inovação e o avanço do conhecimento.

O PIBIC tem papel fundamental na formação de novos pesquisadores, ao oferecer aos estudantes a oportunidade de vivenciar todas as etapas de um projeto científico, desde a definição dos objetivos até a análise e a divulgação dos resultados. Essa vivência contribui para o desenvolvimento de competências essenciais à atuação profissional qualificada.

Por oportuno, reconhecemos e agradecemos o engajamento e a dedicação de todos os envolvidos - estudantes, orientadores, comissões de avaliação, equipe técnica e organizadora. Sem o trabalho coletivo e integrado, estes trabalhos e os eventos associados não teriam sido possíveis.

Frederico Guimarães Durães
Chefe-Geral da Embrapa Gado de Leite

Sumário

Avaliação de estirpes de actinomicetos com potencial bioherbicida em sistemas agrícolas sustentáveis	7
Desempenho de cultivares de milho em sistema de transição para cultivo orgânico: potencial silageiro.....	14
Efeito do complexo dos enfezamentos na sanidade de grãos de milho	25
Efeitos de tratamentos térmicos aplicados em farinhas integrais de sorgo sobre propriedades antioxidantes de bolos isentos de glúten	33
Estoque de carbono em solo arenoso sob sistema Integração Lavoura- Pecuária-Floresta no Oeste da Bahia	40
Impacto da inoculação e coinoculação de <i>Azospirillum</i> e <i>Bacillus</i> na taxa de colonização de fungos micorrizos em plantas de milho sob diferentes doses de fósforo.....	46
Isolamento, caracterização e identificação molecular de microrganismos tolerantes aos estresses hídrico e salino	53
Isolamento, identificação e avaliação do potencial biotecnológico de fungos associados a esporos de fungos micorrízicos arbusculares	60
Localização subcelular de proteínas baseada em co-localização com marcadores celulares.....	66
Manejo do complexo dos enfezamentos com uso intensivo de inseticidas	74
Produtividade da cultura do sorgo granífero e de <i>Urochloa ruziziensis</i> em cultivo intercalar nas entrelinhas da soja através do Sistema Antecipe	80
Resistência de híbridos experimentais de milho aos enfezamentos em Sete Lagoas, MG	86
Seleção de cultivares de sorgo granífero para características que promovam a saúde humana....	92
Resposta de genótipos de milho à inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas.....	98
Seleção de linhagens de sorgo resistentes ao pulgão-da-cana-de-açúcar	104

Avaliação de estirpes de actinomicetos com potencial bioherbicida em sistemas agrícolas sustentáveis⁽¹⁾

Bárbara Ventura Ferreira⁽²⁾, Alexandre Ferreira da Silva⁽³⁾

⁽¹⁾ Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig. ⁽²⁾ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽³⁾ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Resumo - O manejo de plantas daninhas é crucial para a produção agrícola, mas métodos químicos tradicionais podem causar impactos negativos ao meio ambiente e à saúde humana. O controle biológico com metabólitos produzidos por Actinomycetona (bactérias) surge como alternativa promissora e sustentável. Este estudo visa avaliar o efeito de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de planta bioindicadora (pepino, *Cucumis sativus*) e avaliar o potencial de metabólitos secundários produzidos sobre o crescimento da planta teste. Quatro meios de culturas foram testados. Posteriormente, o meio selecionado (M21) foi utilizado para avaliar o efeito dos metabólitos secundários de cinco estirpes de actinomicetos. O meio foi escolhido por promover o crescimento da planta indicadora (pepino) sem afetar a germinação das sementes. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições. Todos os meios de cultura contendo metabólitos produzidos pelas estirpes de Actinomicetes apresentaram atividade herbicida, inibindo o crescimento do pepino em comparação com os controles. Os resultados indicam o potencial das Actinomycetona como agentes de controle biológico de plantas daninhas. As estirpes selecionadas de Actinomycetona apresentaram alta atividade herbicida, possibilitando pesquisas futuras em campo e o desenvolvimento de produtos biopesticidas mais eficientes e ecológicos.

Termos para indexação: controle biológico, Actinomycetona, planta daninha, sustentabilidade, agricultura.

Evaluation of actinomycetes strains with bioherbicidal potential in sustainable agricultural systems

Abstract - Weed management is crucial for agricultural production, but traditional chemical methods can cause negative impacts on the environment and human health. Biological control with metabolites produced by Actinomycetone (bacteria) emerges as a promising and sustainable alternative. This study aims to evaluate the effect of different culture media on the growth of a bioindicator plant (cucumber, *Cucumis sativus*) and to evaluate the potential of secondary metabolites produced on the growth of the test plant. Four culture media were tested. Subsequently, the selected medium (M21) was used to evaluate the effect of secondary metabolites of five actinomycete strains. The medium

was chosen because it promotes the growth of the indicator plant (cucumber) without affecting seed germination. The statistical design used was completely randomized, with six replicates. All culture media containing metabolites produced by the actinomycete strains showed herbicidal activity, inhibiting the growth of cucumber compared to the controls. The results indicate the potential of Actinomycetone as biological weed control agents. The selected Actinomycetone strains showed high herbicidal activity, enabling future field research and the development of more efficient and environmentally friendly biopesticide products.

Index terms: biological control, Actinomycetone, weeds, sustainability, agriculture.

Introdução

O manejo de plantas daninhas pode ser realizado pelos métodos de controle preventivo, mecânico, físico, químico e biológico (Silva et al., 2011; Morais et al., 2021). O controle químico é o mais utilizado. No entanto, o uso inadequado dessa estratégia de manejo vem ocasionando impactos negativos no meio ambiente e na saúde humana (Deuber; Novo, 2006). Diante desse cenário, é muito importante a utilização de métodos de controle que ocasionam menor impacto ao ambiente e à saúde humana. Dentro desse contexto, o controle biológico se destaca como uma interessante alternativa de controle. Pesquisas sobre essa temática começam a se tornar mais comuns na área de matologia (Poveda et al., 2020).

O controle de plantas daninhas com Actinomycetona (por exemplo, actinobactérias) (Oren; Garrity, 2021) é uma abordagem promissora e sustentável que tem atraído crescente interesse na agricultura moderna (Malik et al., 2021). Esses microrganismos são conhecidos por sua capacidade de produzir grande diversidade de metabólitos secundários bioativos, incluindo compostos antimicrobianos e substâncias que inibem o crescimento de plantas (Wellington; Toth, 1992; Taguchi et al., 1993). Essas bactérias são encontradas naturalmente no solo e na região da rizosfera das plantas. São classificadas como gram-positivas e de ampla diversidade genética (Gottlieb; Siminoff, 1952). Por essas características, esse grupo de microrganismos tem atraído interesse crescente como agentes de controle biológico.

No entanto, para avaliar o potencial de ação dos metabólitos secundários, é fundamental validar metodologia de seleção para os microrganismos que propicie a adequada avaliação do potencial de ação herbicida dos metabólitos produzidos por esses microrganismos.

O objetivo deste trabalho foi selecionar meio de cultura que permita o adequado crescimento das estirpes de actinomicetos selecionadas, que não afetem negativamente o crescimento das plantas-testes.

Material e métodos

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. As cepas utilizadas foram selecionadas no Banco de

Germoplasma Microbiano e reativadas em placas de Petri, com meio próprio para actinomiceto, de acordo com Atlas (2010), composto por asparagina 1 g/L; Glicerol 10 mL/L; KH₂PO₄ 1 g/L; Solução de micronutrientes para actinomicetos 1 mL/L; Ágar bacteriológico 18 g/L. Em seguida, foi verificada a pureza das estirpes e preservação em estoque para trabalhos posteriores. Após a reativação e avaliação da pureza das estirpes, foi iniciado um bioensaio para avaliação de suscetibilidade de pepino (*Cucurbita sativa*) à ação dos metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias. Para isso, foram estabelecidos dois ensaios.

O primeiro ensaio consistiu na seleção de um meio de cultura que não afetasse a germinação e o desenvolvimento da planta indicadora. Para isso, foram testados quatro meios de cultura líquidos: M01 (Glicerol 10 g/L; Caseína 0,3 g/L; KNO₃ 2 g/L; K₂PO₄ 2 g/L; NaCl 2 g/L; MgSO₄.7H₂O 0,05 g/L; CaCO₃ 0,02 g/L; FeSO₄.7H₂O 0,01 g/L; e pH=7,8), M03 (Pepitona de soja 10 g/L; Glucose 10 g/L; Amido solúvel 20 g/L; CaCO₃ 3 g/L), M20 (Glicerol 10 g/L; Caseína 0,3 g/L; KNO₃ 3 g/L; K₂PO₄ 2 g/L; NaCl 2 g/L; MgSO₄.7H₂O 0,05 g/L; CaCO₃ 0,02 g/L; FeSO₄.7H₂O 0,01 g/L; e pH= 7_+ 1) e M21 (Amido 10 g/L; Caseína em pó 1 g/L; NaCl 5g; e pH=7.2_+ 0.2). Eles foram comparados com uma testemunha (água). Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com 40 repetições por tratamento.

Os poços das microplacas estéreis e com tampa, da marca CORNING, com 24 poços para cultivo de células na cor transparente, com volume de 3,4 mL e de fundo plano, foram preenchidos com algodão esterilizado e umedecidos com 1,3 mL dos diferentes sobrenadantes dos meios de cultura, com duas sementes em cada poço. As placas foram tampadas e levadas para câmara de crescimento durante 5 dias em temperatura média de 28 °C e fotoperíodo de 12h/12h. O teste foi realizado seguindo a metodologia proposta por Leal (2019). Após esse período, foi avaliada a diferença do número de sementes germinadas nos diferentes tratamentos com os meios de cultura, utilizando o teste de Tukey a 5%.

Após a definição do meio de cultura, foi realizado o teste para verificar o efeito de metabólitos secundários produzidos por cinco actinomicetos (A115, A346, A363, A404 e A432). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 16 repetições por tratamento.

Em cada placa com actinobactéria, foi escolhida uma colônia isolada, raspada e homogeneizada em solução salina em um eppendorf, agitado no vortex e transferido para erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido, que foram autoclavados e resfriados. Posteriormente, foram colocados sob agitação por 10 dias a 100.2 rpm em incubadora com temperatura igual a 28 °C. As placas com poços foram higienizadas por imersão em solução de água + detergente + hipoclorito de sódio, por 30 minutos, enxaguadas três vezes em água deionizada e levadas ao fluxo para secarem na luz UV, mesmo processo da fase inicial. Os tratamentos testados foram água e meio de cultura M19 (Manitol 20 g/L; Peptona bac. 20 g/L e pH=7,5), como controles, e meio inoculado com as bactérias. Cada poço continha com duas sementes, sendo 16 repetições por tratamento, totalizando 112 sementes nesse teste.

Os poços foram preenchidos com algodão esterilizado e umedecidos com 1,3 mL de meio M19 e do sobrenadante das frações dos meios inoculados com bactérias. O sobrenadante foi obtido após centrifugação por 10 min a 8.000 rpm (centrífuga da marca HETTICH Zentrifugen Universal 320R 9000RPM), em tubos falcon de 50 mL, e filtração com suporte de filtração autoclavável (diâmetro de 25 mm) para membrana millipore com poro de 22 µm de diâmetro.

Após montagem da placa, seguindo o mesmo processo citado anteriormente, realizou-se avaliação qualitativa, comparação visual com a testemunha, segundo os critérios apresentados na

Tabela 1. Nessa primeira qualificação, foram levados em consideração os níveis de desenvolvimento das plântulas de pepino nos poços.

Os estágios foram classificados de acordo com o desenvolvimento radicular e a emissão de folhas. Com isso, notas foram aplicadas como peso para diferenciação. Essa análise foi feita para selecionar o melhor meio de cultura de acordo com o desenvolvimento das plântulas de pepino dentro das 96 repetições (entre testemunhas e meios), com duas sementes em cada poço, totalizando 192 sementes.

Tabela 1. Critérios de avaliação qualitativa da germinação das sementes de pepino (*Cucurbita sativa*), 5 dias após a incubação nas placas com poços de cultivo.

Critério	Peso
Emissão de folha e sistema radicular	1,0
Apenas emissão de raízes grossas	0,7
Apenas emissão de raízes finas	0,5
Não germinou	0,0

Os dados obtidos foram analisados conforme a sua normalidade e, em caso de significância, foram submetidos ao teste de Tukey a 5%.

Resultados e discussão

Ao analisar o efeito qualitativo no número de sementes germinadas, total de 181, em função do meio de cultura, pôde-se observar que o M21 foi o que apresentou o comportamento mais próximo à testemunha (Tabela 2). Acredita-se que os demais meios de cultura podem ter afetado o crescimento, uma vez que apresentam cloreto de sódio em sua composição e acréscimo de solução salina com o macerado das bactérias. O efeito, principalmente da salinização, pôde ser constatado visualmente durante a avaliação das sementes, o seu crescimento radicular foi prejudicado. Dessa forma, optou-se pela utilização do M21 para avaliar o potencial fitotóxico dos compostos metabólicos produzidos pelas bactérias.

Tabela 2. Comparação qualitativa da germinação das sementes de pepino (*Cucurbita sativa*) em função dos meios de cultura utilizados.

Tratamentos	Sementes germinadas	Médias
Meio M03	34	0,85 a
Meio M01	38	1,03 ab
Meio M20	39	1,14 b
Meio M21	38	1,49 c
Testemunha	32	1,89 d

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

Após a seleção do meio de cultura, foi realizado o ensaio para avaliar o efeito dos actinomicetos sobre germinação e desenvolvimentos das plantas. Nesse ensaio, foram utilizados dois controles (água e o meio M21). Os demais tratamentos consistiram do M21 associado ao metabólito produzido pelas bactérias testadas. Nessa avaliação, foram estabelecidos outros parâmetros com notas (Tabela 3).

Tabela 3. Critérios de avaliação qualitativa da germinação das sementes de pepino (*Cucumber sativa*), 5 dias após a incubação com os meios inoculados.

Critério	Peso
Germinação vegetativa (sem inibição)	0
Efeito leve de inibição da germinação	1
Efeito leve a moderado de inibição da germinação	2
Efeito moderado de inibição da germinação	3
Efeito forte de inibição da germinação	4
Morte e/ou necrose vegetativa	5

Os dados obtidos foram analisados conforme a sua normalidade e, em caso de significância, foram submetidos ao teste de Tukey a 5%.

Foi possível observar que os metabólitos produzidos pelas estirpes selecionadas afetaram o crescimento da planta indicadora (Figura 1).



Figura 1. Comparação do desenvolvimento de sementes de pepino (*Cucumber sativa*) em resposta aos diferentes tratamentos com metabólitos obtidos de diferentes estirpes de actinomicetos.

Algumas espécies de actinomicetos têm a capacidade de produzir compostos antimicrobianos, como antibióticos e metabólitos secundários, que podem inibir o crescimento de plantas. Esses compostos podem interferir com processos fisiológicos essenciais das plantas, como a germinação de sementes, o crescimento radicular e a fotossíntese.

Ao analisar o efeito dos metabólitos, observou-se que todos apresentaram comportamento similar entre si e diferiram dos controles (Tabela 4).

Tabela 4. Inibição da germinação de sementes de pepino (*Cucumber sativa*) em função dos tratamentos com metabólitos produzidos por cinco estirpes de Actinomicetes, conforme critério estabelecido, 5 dias após incubação

Tratamentos	Médias
1) Água	0,00 a
2) Meio M21	6,25 a
3) Meio M21 + 346	82,63 b
4) Meio M21 + 404	82,13 b
5) Meio M21 + 363	84,38 b
6) Meio M21 + 432	90,63 b
7) Meio M21 + A115	95,81 b

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

Até o momento, obtiveram-se resultados significativos, mas novos ajustes metodológicos estão sendo realizados, com o objetivo de se estabelecer uma metodologia que propicie avaliar adequadamente o efeito dos metabólitos secundários produzidos pelos microrganismos no crescimento das plantas. Após essa adequação de metodologia em laboratório, ensaios serão programados para a realização de screening dos actinomicetos presentes no Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que metabólitos obtidos de actinomicetos são promissores para o controle de plantas daninhas. A seleção do meio de cultura M21 foi crucial, pois apresentou comportamento mais próximo ao da testemunha, minimizando os efeitos negativos sobre a germinação e o desenvolvimento das plantas indicadoras. Observou-se que os metabólitos produzidos pelas estirpes de actinomicetos testados exerceram um efeito inibitório significativo no crescimento das sementes de pepino (*Cucumber sativa*), evidenciando seu potencial fitotóxico.

Embora os resultados sejam promissores, novos ajustes metodológicos são necessários para aperfeiçoar a avaliação do impacto dos metabólitos secundários no desenvolvimento dessas e outras plantas, incluindo as daninhas. Este estudo contribui para o avanço das pesquisas na área de controle biológico, indicando que os metabólitos produzidos por actinomicetos podem ser uma alternativa sustentável e eficaz ao controle químico, reduzindo os impactos negativos no meio ambiente.

Referências

ATLAS, R. M. **Handbook of microbiological media**. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1201/EBK1439804063>.

DEUBER, R.; NOVO, M. do C. de S. S. Nodulação e desenvolvimento de plantas de soja iac-19 com aplicação dos herbicidas diclosulam e flumetsulam. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 5, n. 2, p. 57-63, 2006. DOI: <https://doi.org/10.7824/rbh.v5i2.44>.

GOTTLIEB, D.; SIMINOFF, P. The production and role of antibiotics in the soil, II- Chloromycetin. **Phytopathology**, v. 42, n. 1, p. 91-97, 1952.

LEAL, V. **Prospecção de microrganismos com potencial bioherbicida no controle de plantas daninhas na agricultura**. 2019. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Centro Universitário de Sete Lagoas-UNIFEMM, Sete Lagoas, 2019.

MALIK, M. T.; REHMAN, A. U.; NAQVI, S. A. H.; HASNAIN, A.; UMAR, U. U. D.; AZEEM, H.; SHAHID, M.; UMAIR, M. A critical review of research on exploitation of microbial antagonists for the control of bacterial diseases in crop. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 33, n. 1, p. 217-232, 2021. DOI: <http://doi.org/10.33866/phytopathol.033.01.0669>.

MORAIS, C. C. S.; BARROS, G. B. de S.; GENARI, D. A.; PALIN, D.; MENEGAZZO, R. F.; GAZIM, Z. C.; LOPES, A. D. Allelopathic potential of the aqueous extract of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on sourgrass seeds germination. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, e36010715317, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.15317>.

OREN, A.; GARRITY, G. M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary of Microbiology**, v. 71, n. 10, 5056, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>.

POVEDA, J.; ABRIL-URIAS, P.; ESCOBAR, C. Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: Trichoderma, mycorrhizal and endophytic fungi. **Review Frontiers in Microbiology**, v. 11, article 992, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00992>.

SILVA, M. C. de C.; BRAUN, H.; COELHO, F. S. Manejo e controle de plantas daninhas na cultura da batata. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 1, n. 1, p. 60-67, 2011.

TAGUCHI, S.; KIKUCHI, H.; SUZUKI, M.; KOJIMA, S.; TERABE, M.; MIURA, K.; NAKASE, T.; MOMOSE, H. Streptomyces subtilisin inhibitor-like proteins are distributed widely in streptomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4338-4341, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.59.12.4338-4341.1993>.

WELLINGTON, E. M. H.; TOTH, I. **Course of actinomycetes ecology**. Rio de Janeiro: Embrapa-CNPAB, 1992. Mimeografado.

Desempenho de cultivares de milho em sistema de transição para cultivo orgânico: potencial silageiro

Guilherme Rodrigues Martins⁽²⁾, Carine Gregório Machado Silva⁽²⁾, Maria Lúcia Ferreira Simeone⁽³⁾, Walter José Rodrigues Matrangolo⁽³⁾ e Alexandre Martins Abdão dos Passos⁽³⁾

⁽¹⁾Trabalho financiado pelo CNPq e Embrapa. ⁽²⁾Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽³⁾Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo

Resumo - A produção sustentável de milho tem se concentrado em sistemas agrícolas que reduzem insumos químicos sintéticos, promovem a biodiversidade do solo, conservam recursos naturais e diminuem o impacto ambiental. O trabalho visa contribuir para o posicionamento de cultivares mais apropriadas e eficazes em sistemas de transição e orgânicos, identificando atributos agronômicos que aprimorem a produção sustentável de milho com potencial para silagem. Cultivares, variedades e híbridos foram avaliados quanto ao potencial forrageiro em um delineamento de blocos casualizados. Foram avaliados no experimento os seguintes atributos agronômicos: rendimento da massa da matéria verde por hectare, rendimento da massa da matéria seca por hectare, rendimento de espigas com palha por hectare, rendimento de espigas sem palha por hectare, população final de plantas, índice de espigas, dias para pendoamento, dias para florescimento feminino, altura de plantas, altura de inserção de espigas, matéria seca a 65 °C, matéria seca a 105 °C, proteína, lignina, cinzas, fibra bruta, hemicelulose, celulose e conteúdo celular. Como resultado, verificou-se que a cultivar BRS 1060 apresentou um rendimento de massa da matéria verde de 38.699,96 kg ha⁻¹, superando a média das outras cultivares, que foi de 21.889,94 kg ha⁻¹. A cultivar BRS 3046 se destacou com o maior teor de proteína entre as avaliadas, atingindo 7,12%, superando a média geral de 6,4%. A correta escolha de cultivares de milho em sistemas de produção orgânico, em seu estabelecimento, é primordial para o alcance da sustentabilidade produtiva.

Termos para indexação: sistema alternativo de produção, agroecologia, agricultura regenerativa, agricultura urbana, silagem.

Performance of maize cultivars in a transition system to organic cultivation: silage potential

Abstract - Sustainable maize production has focused on agricultural systems that reduce synthetic chemical inputs, promote soil biodiversity, conserve natural resources and reduce environmental impact. The work aims to contribute to the positioning of more appropriate and effective cultivars in transitional and organic systems, identifying agronomic attributes that improve the sustainable production of maize with potential for silage. Cultivars, varieties and hybrids were evaluated for forage potential in a randomized block design. The following agronomic attributes were evaluated in the experiment: yield of green matter mass per hectare, yield of dry matter mass per hectare, yield of ears with straw per hectare, yield of ears without straw per hectare, final plant population, index of ears, days to bolting, days to female flowering, plant height, ear insertion height, dry matter at

65 °C, dry matter at 105 °C, protein, lignin, ashes, crude fiber, hemicellulose, cellulose and cellular content. As a result, it was found that the cultivar BRS 1060 presented a green matter mass yield of 38,699.96 kg ha⁻¹, surpassing the average of the other cultivars, which was 21,889.94 kg ha⁻¹. The cultivar BRS 3046 stood out with the highest protein content among those evaluated, reaching 7.12%, surpassing the general average of 6.4%. The correct choice of maize cultivars in organic production systems is essential for achieving productive sustainability.

Index terms: alternative production system, agroecology, regenerative agriculture, urban agriculture, silage.

Introdução

A produção de milho desempenha um papel crucial na segurança alimentar global, sendo uma das culturas mais extensamente cultivadas em todo o mundo (FAO, 2020). Nas últimas décadas, tem sido dada maior ênfase ao desenvolvimento de sistemas agrícolas sustentáveis e ecológicos, como agroecologia, agricultura regenerativa e sistemas orgânicos, nos quais o uso de insumos químicos sintéticos é racionalizado ou abolido (Altieri, 1999; Lynch, 2015). Essas práticas favorecem o manejo racional, que impulsiona a biodiversidade do solo, conserva os recursos naturais e reduz o impacto ambiental (Tilman et al., 2002; Skinner et al., 2019).

O estudo do desempenho de diferentes cultivares de milho em sistemas de produção mais sustentáveis é vital para garantir a eficiência na produção agrícola, ao mesmo tempo que minimiza os danos ao ambiente (Gliessman, 2007). A utilização de cultivares adaptadas, com atributos e características apropriadas para o ambiente de produção, é premissa agrônoma visando à obtenção da sustentabilidade ampla (ambiental, econômica e social) da atividade agrícola (Horrigan et al., 2002). Por meio da escolha acertada de cultivares com alto potencial produtivo, adaptadas às condições edafoclimáticas locais sob técnicas de agricultura orgânica, com resiliência genética convencional para pragas e doenças, o produtor tem, sem utilização de mais insumos externos, a oportunidade de promover incrementos no rendimento e na eficiência do uso da terra de maneira simples e sem custos adicionais (Hossard et al., 2016; Lori et al., 2017).

A silagem de milho é um dos principais alimentos utilizados na pecuária, seja na produção de leite ou de carne. É um produto da conservação via fermentação anaeróbica da planta inteira do milho, sendo um alimento bastante importante na nutrição de ruminantes, devido seu alto valor nutritivo, principalmente no que se refere ao teor de energia (Karnatam et al., 2023). A silagem de milho orgânico, assim como outros produtos, tem demonstrado potencial para proporcionar maior retorno econômico, financeiro, ambiental e social. Tem-se verificado, no Brasil, que a adoção de práticas orgânicas, dentre elas a escolha de cultivares apropriadas, pode resultar em benefícios econômicos e ambientais, além de melhorar a qualidade do solo e a biodiversidade (Paziani et al., 2009; Ferreira et al., 2022; Crevelari et al., 2023).

O trabalho visa fornecer uma contribuição para o posicionamento de cultivares que são mais apropriadas e eficazes em sistemas de transição e orgânicos, identificando atributos agrônomicos para aprimorar a produção sustentável de milho com potencial silageiro.

Material e métodos

O estudo foi conduzido na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, em uma área de sequeiro, nas coordenadas 19° 26' 36.03" S; 44°10' 40.23, 710 metros de altitude, durante a safra 2022/2023 (Figura 1). As cultivares de milho foram avaliadas em um sistema de transição para cultivo orgânico de produção.



Figura 1. Área de condução do ensaio. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

Os atributos químicos da camada de 0–20 cm do solo foram determinados e estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da análise química de solo (0–20 cm de profundidade) da área experimental.

pH	P	K ⁺	S	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	M.O.	B	Cu	Fe	Mn	Zn	SB	T	t	V	m	
H ₂ O	CaCl ₂	mg dm ⁻³	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	dag kg ⁻¹	dag kg ⁻¹	mg dm ⁻³	mg dm ⁻³	mg dm ⁻³	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻¹	(%)								
6.7	5.7	31.7	170.0	4	0.43	5.35	0.83	0.00	2.10	2.86	0.20	2.0	86	52.5	14.4	6.6	8.7	7	76	0.00

¹ P (Mehlich 1); K (Mehlich 1); Ca²⁺ (KCl - 1 mol L⁻¹); Mg²⁺ (KCl - 1 mol L⁻¹); Al³⁺ (KCl - 1 mol L⁻¹); H + Al (H por SMP) e MO (Na₂Cr₂O₇). MO, matéria Orgânica e V, saturação por bases.

Foram conduzidos dois ensaios, um para avaliação de materiais com aptidão para silagem orgânica e outro para avaliação do potencial de produção de grãos orgânicos cujos dados não serão apresentados neste trabalho. Ambos os ensaios foram conduzidos com variedades e híbridos comerciais da Embrapa (BRS) e cultivares testemunhas comerciais e convencionais (não transgênicos) de empresas privadas. Os genótipos avaliados nos ensaios de aptidão de produção de silagem foram AG 1051 (híbrido semiprecoce), BRS 3046 (híbrido triplo GDU de 947), M 274 (híbrido), BRS 4104 (variedade GDU de 939), BRS 4105 (variedade), BRS 4107 (variedade), BRS

2107 (híbrido top-cross), BRS Gorutuba (variedade super precoce), BRS 1060 (híbrido simples) e BRS Caimbé (variedade precoce GDU de 894).

Previamente à semeadura foi realizado o preparo da área para transição do cultivo orgânico. O solo foi preparado com uma gradagem pesada e duas gradagens niveladoras. Após a gradagem realizou-se a aplicação de gesso agrícola, 1230 kg por ha, e FTE, 56 kg por hectare. Aplicou a dose 8,153 kg/ha do esterco bovino e 400 kg por ha de pó de rocha fósforo.

As sementes foram previamente tratadas com BiomaPhos® (150 ml/60.000 sementes), *Azospirillum brasilense* (10 ml/kg de sementes) e Bioma Fix® (1.500 ml/100g de sementes).

A semeadura ocorreu no dia 22/11/2022, utilizando semeadora de parcelas experimentais. Utilizou-se delineamento experimental em blocos casualizados (Montgomery, 2017; Smith et al., 2019) com quatro repetições, sendo cada parcela constituída de quatro linhas de 4,2 m de comprimento e espaçamento de 0,7 m entre linhas, semeando-se quatro sementes por metro. Como área útil, consideraram-se as duas linhas centrais.

Na Figura 2 encontram-se os dados de precipitação, temperatura média e evapotranspiração potencial do período experimental.

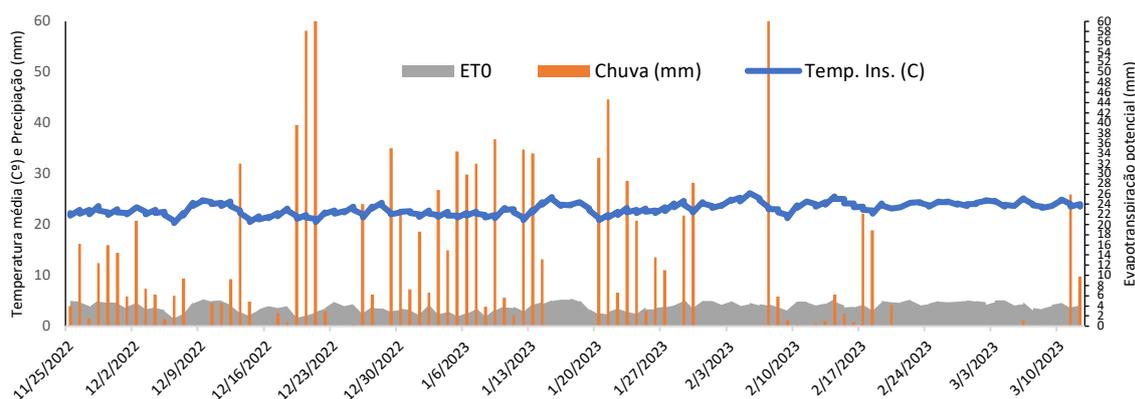


Figura 2. Precipitação pluviométrica (barras), temperatura diária média (linha) e evapotranspiração potencial referencial diária (área) no período de novembro de 2022 a abril de 2023, em Sete Lagoas, MG. Fonte: Inmet (2023).

A área experimental foi sistematicamente monitorada por meio de visitas rotineiras para a coleta de dados e verificação da necessidade de manejo de insetos e plantas daninhas. Na medida em que foram necessários, adotaram-se os tratamentos culturais e fitossanitários recomendados para a cultura como limpeza das entrelinhas e corredores por meio da capina manual.

Foi realizada a instalação de uma armadilha “iscada” com feromônio sexual sintético, para levantamento de adultos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e de armadilhas adesivas amarelas (*Yellow Trap*) para o monitoramento da cigarrinha-do-milho (*Dalbulus maidis*), responsável pela transmissão de doenças como os enfezamentos (pálido e vermelho) e a risca do milho. A partir do monitoramento foi realizada a liberação de inimigos naturais (*Trichogramma* spp. para controle biológico da lagarta-do-cartucho. Em 1º/12/2023 foi realizada a pulverização do BT e o *Beauveria bassiana* BV13 (1,2 x 10⁹ UFC/mL).

Realizou-se o corte das plantas inteiras a 15 cm de altura, nas duas linhas centrais, quando se encontravam próximo ao estádio R5 (entre 100 dias e 110 dias com “metade a três quartos da linha do leite” aparente) para análise dos rendimentos de biomassa e qualidade bromatológica. As plantas foram picadas, homogeneizadas e separadas uma amostra de 300 gramas para enviar ao laboratório para análise bromatológica por meio do NIR.

Foram avaliados no experimento os atributos agronômicos: rendimento da massa da matéria verde por hectare (RMMVH), rendimento da massa da matéria seca por hectare (RMMSH), rendimento de espigas com palha por hectare (RECPH), rendimento de espigas sem palha por hectare (RESPH), população final de plantas (PFP), índice de espigas (IE), dias para pendoamento (DP), dias para florescimento feminino (FF), altura de plantas (AP), altura de inserção de espigas (AIE), matéria seca a 65°C (%) (MS65), matéria seca a 105 °C (MS105), proteína (%) (PROT%), lignina% (LIG%), cinzas% (CZ%), fibra bruta% (FB%), hemicelulose% (HEMI%), celulose% (CEL%) e conteúdo celular% (CC%).

A caracterização da composição físico-química das plantas inteiras moídas dos diferentes genótipos de milho foi realizada utilizando modelos de calibração NIR em equipamento da Buchi modelo NIRFlex 500 para os seguintes constituintes: matéria seca a 65 °C (%), matéria seca a 105 °C, proteína (%), lignina (%), cinzas (%), fibra bruta (%). Os teores de hemicelulose (%) foi calculado pela diferença entre FDN e FDA. A celulose (%) pela diferença entre FDA e lignina. O conteúdo celular (CC) (%) foi calculado como $CC = 100 - FDN$.

Os valores dos resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (Fisher, 2016; Wu et al., 2021), e as médias dos tratamentos, quando significativas, comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (Scott; Knott, 1974). Adicionalmente foi realizada uma análise de correlação de Pearson (Taylor, 2017). Com o objetivo de agrupar as cultivares com base em sua similaridade em relação a múltiplas variáveis, foi realizada uma análise de agrupamento utilizando o método K Means (MacQueen, 1967; Jain, 2010). O número ótimo de clusters foi determinado usando o método do cotovelo e o método da silhueta (Rousseeuw, 1987).

Resultados e discussão

O comportamento das cultivares de milho testadas no sistema orgânico foi diferenciado entre elas para as variáveis analisadas, exceto para o índice de espigas, altura de plantas, massa da matéria seca a 65 °C, e teores de lignina, fibra bruta, hemicelulose e conteúdo celular (Tabela 2). Os rendimentos de biomassa na avaliação de silagem emergem como métricas primordiais para a avaliação da produtividade de cada cultivar. Um rendimento mais elevado nessas métricas é desejável. Todavia, enfatiza-se a necessidade de não se ater unicamente ao rendimento, mas de também considerar a qualidade bromatológica das plantas.

Tabela 2. Médias para rendimento da massa da matéria verde por hectare (RMMVH), rendimento da massa da matéria seca por hectare (RMMSH), rendimento de espigas com palha por hectare (RECPH), rendimento de espigas sem palha por hectare (RESPH), população final de plantas (PFP), índice de espigas (IE), dias para pendoamento (DP), dias para florescimento feminino (FF), altura de plantas (AP), altura de inserção de espigas (AIE), matéria seca a 65 °C (%) (MS65), proteína (%) (PROT%), lignina% (LIG%), cinzas% (CZ%), fibra bruta% (FB%), hemicelulose% (HEMI%), celulose% (CEL%) e conteúdo celular% (CC%).

Cultivares	RMMVH	RMMSH	RECPH	RESPH	PFP	IE	DP	FF	AP
	(kg ha ⁻¹)				(pts ha ⁻¹)		(dias)		(cm)
BRS 1060	38699.7 a	12340.8 a	8645.1 a	7549.1 a	61507.9 a	1.06 a	65.8 a	67.5 b	187.5 a
BRS 2107	28386.3 b	9340.8 b	6968.8 a	6247.8 a	61507.9 a	1 a	64.5 a	67 b	197.5 a
BRS 3046	27642 b	8519.3 b	6683 a	5705.4 a	53174.6 b	0.88 a	66 a	68.8 b	181.3 a
AG1051	25934.5 b	7691.6 c	5265.6 b	4654 b	59523.8 a	0.91 a	66 a	71 a	196.3 a
BRS Caimbe	25486.9 b	7654.5 c	4703.1 b	4169.6 b	55158.7 b	0.85 a	65.3 a	68 b	211.3 a
M274	21033.1 c	6788.6 c	4824.6 b	4100.4 b	59920.6 a	0.89 a	66 a	67.8 b	180 a
BRS 4104	20047.3 c	6250.2 c	3917.4 b	3167.4 b	58730.2 a	0.82 a	65 a	71 a	163.8 a
BRS 4105	17529.8 c	5587.4 c	3767.9 b	3261.2 b	53968.3 b	0.92 a	66.5 a	69.8 a	181.3 a
BRS 4107	15614.7 c	4885.4 c	4692 b	4008.9 b	46825.4 c	0.82 a	66 a	70.5 a	176.3 a
BRS Gorutuba	15334.9 c	4536.2 c	2649.6 b	2272.3 b	57936.5 a	0.93 a	56 b	58 c	158.8 a
Média	23570.9	7359.5	5211.7	4513.6	56825.4	0.91	64.7	67.9	183.4

Cultivares	AIE	MS65	PROT	LIG	CZ	FB	HEMI	CEL	CC
	(cm)	(%)							
BRS 1060	91.3 b	31.8 a	6.1 b	3.3 a	9.6 a	17.8 a	34.9 a	27.1 b	34.7 a
BRS 2107	102.5 a	32.9 a	6.3 b	3.3 a	10.1 a	19.3 a	35.2 a	28.2 a	33.3 a
BRS 3046	90 b	30.1 a	7.1 a	3.4 a	9.7 a	17.9 a	36.7 a	26.7 b	33.1 a
AG1051	112.5 a	29.6 a	6 b	3.6 a	10 a	19 a	35.9 a	28.3 a	32.2 a
BRS Caimbé	115 a	30.8 a	5.9 b	3.3 a	10 a	20 a	34.7 a	28.5 a	33.5 a
M274	78.8 b	32.3 a	6.1 b	3.6 a	9.6 a	19.2 a	36.6 a	27.7 a	32.2 a
BRS 4104	78.8 b	31.2 a	6.2 b	3.7 a	9.9 a	19.2 a	35.1 a	28.4 a	32.7 a
BRS 4105	87.5 b	31.9 a	6.8 a	3.2 a	9.6 a	17.9 a	36 a	26.4 b	34.4 a
BRS 4107	87.5 b	31.3 a	7.1 a	3.5 a	10.4 a	19.3 a	36 a	28.1 a	32.4 a
BRS Gorutuba	68.8 b	29.7 a	6.5 b	3.5 a	9.6 a	19.4 a	34.4 a	27.5 b	34.6 a
Média	91.25	31.16	6.4	3.4	9.8	18.9	35.6	27.7	33.3

As médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott (5%).

Verifica-se superioridade da BRS 1060, um híbrido simples, sobre o desempenho agrônomo de biomassa. Esta cultivar apresenta o maior RMMVH e de RMMSH entre as cultivares avaliadas. A BRS 1060 apresenta um rendimento da massa da matéria verde de 38.699,96 kg/ha, o que é notavelmente maior que a média das outras cultivares, que foi de 21.889,94 kg/ha. Além disso, quando comparado à segunda melhor cultivar, que apresentou um rendimento de 28.386,31 kg/ha, a BRS 1060 ainda supera por uma margem de 10.313,65 kg/ha. A superioridade do híbrido foi também refletida no rendimento da massa da matéria seca, em que a BRS 1060 supera a média das demais cultivares em 5.534,77 kg/ha e suplanta a segunda melhor cultivar em 2.999,94 kg/ha. A BRS 1060 apresenta um rendimento de 12.340,77 kg/ha, o que é significativamente superior à média das demais cultivares, que foi de 6.806,00 kg/ha. Comparando com a segunda melhor

cultivar, que tem um rendimento de 9.340,83 kg/ha, a BRS 1060 supera por 2.999,94 kg/ha. Estes resultados demonstram que a cultivar BRS1060 tem um desempenho superior em termos de rendimento da silagem em comparação com a média das demais cultivares e em comparação com a segunda melhor cultivar.

Observa-se ainda que o rendimento de espigas, tanto com palha quanto sem palha, também é o mais alto entre as cultivares. O rendimento de espigas ganha relevância na análise, destacando a importância das espigas como componentes cruciais do milho na produção de silagem. Essa medida não apenas reflete a produtividade, mas também a qualidade da forragem e desempenho animal alimentado por esse conservado. Espigas saudáveis e produtivas desempenham um papel desejável em todo sistema de produção de milho.

A cultivar Gorutuba, caracterizada por seu ciclo precoce, demonstrou uma maturação mais acelerada, atingindo os estágios de pendoamento e florescimento, em média, 9,8 e 9,5 dias antes da BRS 1060, respectivamente. Em contraste, cultivares de ciclo mais longo, como a BRS 1060, beneficiam-se de um período vegetativo estendido. Este tempo adicional antes do florescimento potencializa a fotoassimilação, culminando em uma maior produção de biomassa. Este acúmulo energético, proveniente da fotossíntese, pode ser canalizado para a produção de biomassa, o que, sob condições ideais, pode resultar em rendimentos superiores.

Por outro lado, uma rápida progressão para o pendoamento e o florescimento pode ser vantajosa em regiões onde a estação de crescimento é curta, permitindo que as plantas completem seu ciclo de vida antes de condições adversas, como estresse hídrico ou baixas temperaturas. Além disso, em sistemas agrícolas onde a sucessão de culturas é praticada, uma maturação mais rápida pode permitir uma transição mais suave entre culturas sucessivas viabilizando a segunda safra ou diminuindo o risco dessa.

A cultivar BRS 1060 se destaca em termos de quantidade de silagem, superando a média das demais cultivares e a segunda melhor cultivar em rendimento. No entanto, em termos de qualidade da silagem, a BRS 1060 não é a líder em todas as métricas. Em particular, seu conteúdo de proteína é inferior à média e à segunda cultivar com maior teor de proteína. A BRS 1060 contém 6,07% de proteína, o que é ligeiramente inferior à média das outras cultivares, que está em 6,47%. Mais notavelmente, a segunda cultivar com maior teor de proteína tem 7,12%, mostrando que a BRS 1060 fica atrás em termos de teor proteico. Isso destaca um trade-off comum na agricultura entre rendimento e qualidade. Enquanto a BRS 1060 pode produzir grandes quantidades de silagem, os produtores podem precisar considerar outras cultivares se a qualidade da silagem for uma prioridade, especialmente em termos de conteúdo de proteína.

Verificaram-se, na média, altos valores de cinza na biomassa avaliada (9,8%) (Tabelas...2023).

A partir dos dados apresentados e das correlações observadas entre as variáveis de rendimento de massa, é possível inferir que essas métricas frequentemente estão interligadas, algo que é esperado devido à natureza conjunta de seus determinantes. Verificou-se a correlação positiva entre o rendimento de espigas e os rendimentos de massa.

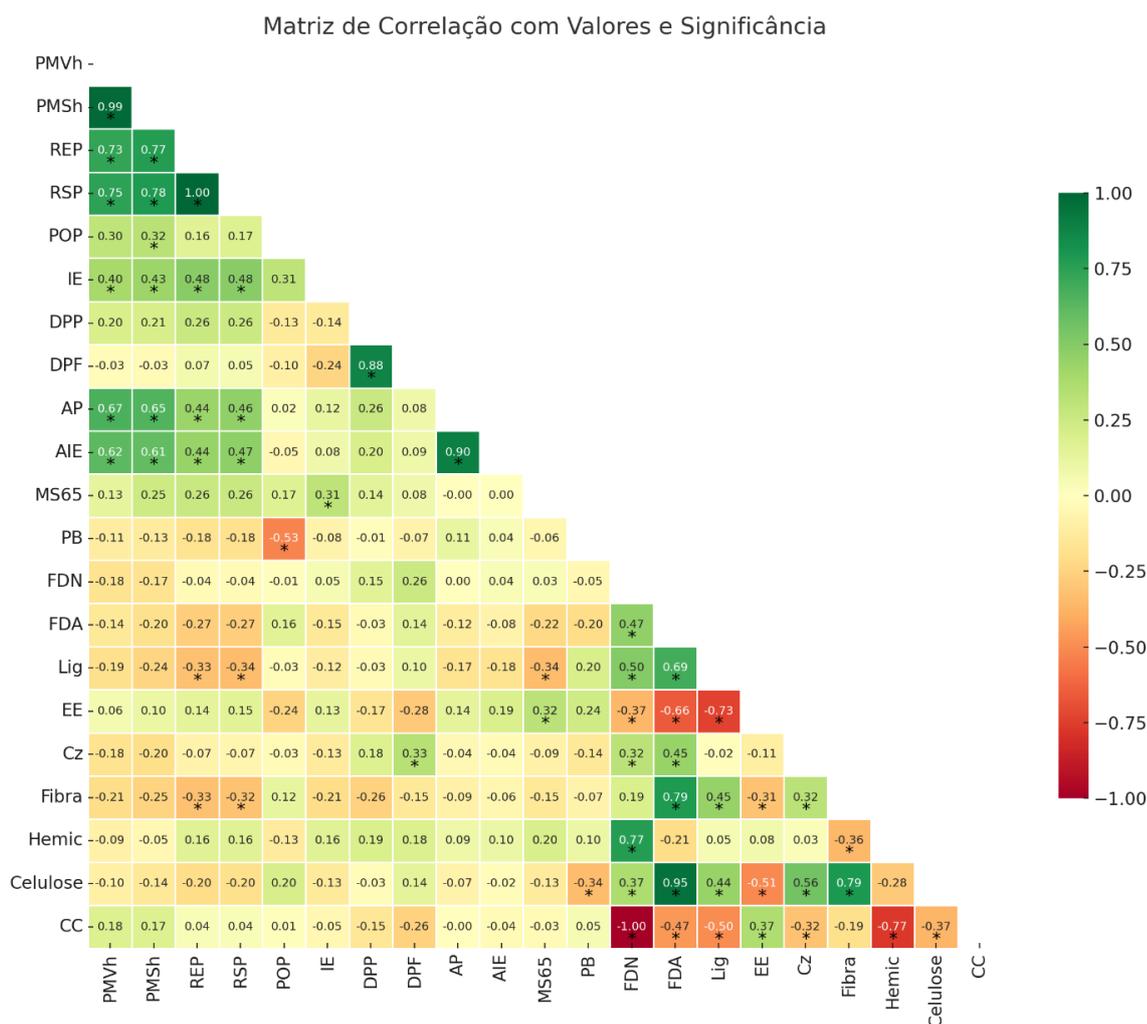


Figura 3. Matriz de correlação simples para as variáveis respostas analisadas.

Dentre as variáveis analisadas, identificamos um total de 58 correlações significativas. Desse total, 39 correlações são positivas e 19 são negativas. As correlações positivas mais pronunciadas foram observadas entre Rendimento de Espigas Sem Palha (RSP) e Rendimento de Espigas Com Palha (REP) ($r=0.9964$), Rendimento da Massa da Matéria Seca por Hectare (PMSH) e Rendimento da Massa da Matéria Verde por Hectare (PMVh) ($r=0.9884$). Estas correlações indicam, por exemplo, que um aumento no Rendimento de Espigas Sem Palha (RSP) está fortemente associado a um aumento no Rendimento de Espigas Com Palha (REP). Em contrapartida, as correlações negativas mais fortes foram identificadas entre Conteúdo Celular (CC) e Hemicelulose (HEMI) ($r=-0,7658$), e Extrato Etéreo (EE) e Lignina (LIG) ($r=-0,7348$). Verifica-se correlações positivas, mas não muito forte para a altura das plantas (AP) e as medidas de rendimento de biomassa dos materiais (Figura 3). A Altura das Plantas (AP) emerge como um atributo multifacetado, impactando tanto a produtividade quanto o manejo agrícola. Plantas mais altas podem gerar maior biomassa, mas também demandam mais recursos e podem ser mais suscetíveis a danos causados por ventos por exemplo e exigir maquinários mais apropriados com barras mais elevadas para pulverizações de bioinsumos, ou aplicações aéreas

Foi verificado por meio do método do cotovelo um número ótimo de três clusters na avaliação dos dados. Foi possível gerar os grupos, compreendendo o cluster 0: com as cultivares AG1051,

BRS 2107, BRS 3046, BRS 4104, Caimbé, M274; o Cluster 1: BRS 4105, BRS 4107, BRS Gorutuba e o Cluster 2: somente com o BRS 1060 (Figura 4).

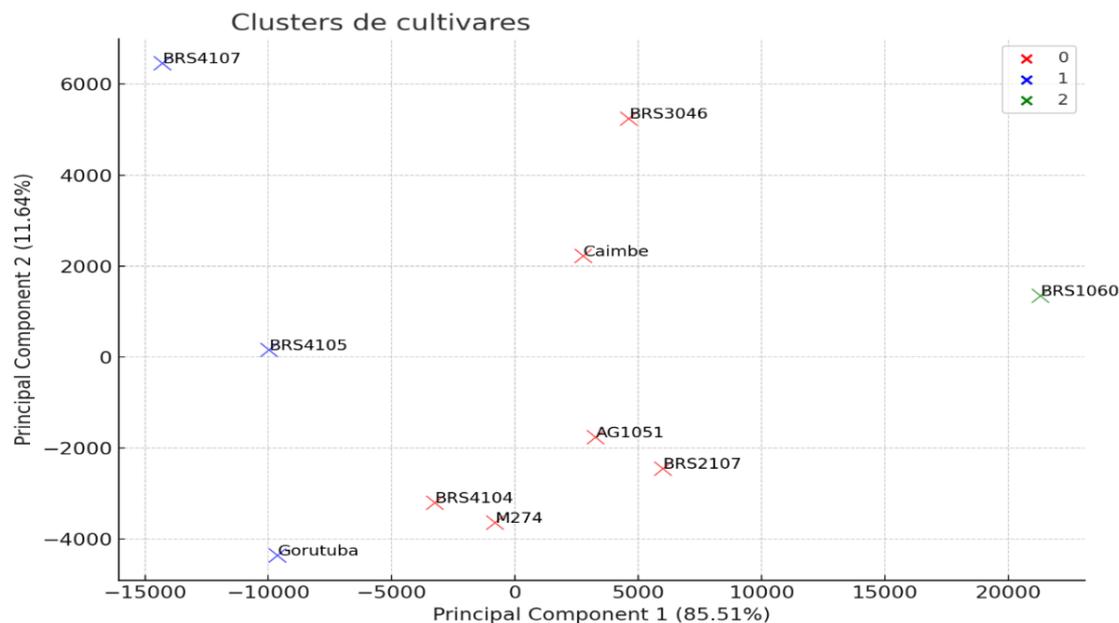


Figura 4. Análise de cluster para cultivares de milho sob sistema orgânico de produção.

O Cluster 0 é composto pelas variedades BRS 4107, BRS 4105 e BRS Gorutuba. Estas variedades, em conjunto, tendem a apresentar um rendimento de massa abaixo da média, conforme indicado pelas variáveis PMVh, PMSH, PMVhc e PMSc. O Cluster 1 é singularmente representado pela BRS1060. Esta cultivar demonstra um perfil de alto rendimento, como evidenciado pelas variáveis relacionadas ao rendimento, todas apresentando desvios positivos. Além do alto rendimento, características como um maior índice de espigas (IE) e uma população final de plantas (POP) reforçam sua produtividade em termos de densidade e número de espigas. No entanto, um teor mais elevado de fibra sugere que, embora produtiva, essa cultivar pode apresentar desafios em termos de digestibilidade. O Cluster 2 compreende as demais cultivares, formando um grupo mais diverso. Essas cultivares exibem uma mistura de desvios em relação à média. O prolongado tempo para pendoamento (DPP) e florescimento feminino (DPF) sugere que essas cultivares podem ser mais adaptadas a regiões ou sistemas de cultivo onde se beneficiam de um período vegetativo mais extenso. O destaque no índice de espigas (IE) aponta para uma boa produtividade em termos de formação de espigas, enquanto o conteúdo celular (CC) mais baixo pode influenciar a qualidade da forragem ou o rendimento global.

Conclusão

A correta escolha de cultivares de milho em sistemas de produção orgânico, em seu estabelecimento, é primordial para o alcance da sustentabilidade produtiva. Assim, mediante os resultados deste trabalho, a cultivar BRS 1060 se destacou apresentando os maiores valores de rendimento de biomassa e de espigas. Contudo, deve-se ressaltar que o híbrido top-cross BRS 2107 e o híbrido triplo BRS 3046 apresentaram valores próximos no rendimento de biomassa e de espigas (um importante fator determinante para obtenção de volumoso em qualidade).

Referências

- ALTIERI, M. A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 74, n. 1/3, p. 19-31, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00028-6).
- CREVELARI, J. A.; SOUZA, Y. P.; SANTOS, J. S.; AMBRÓSIO, M.; GONÇALVES, V. M. L.; PEREIRA, M. G. Adaptability and stability of corn hybrids for silage via genotype and genotype × environment interaction biplot. **Agronomy Journal**, v. 115, n. 2, p. 687-697, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/agj2.21240>.
- FAO. FAOSTAT **Food and agriculture data**: crops. Rome, 2020. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em: 13 ago. 2023.
- FERREIRA, A. P. A. L.; OLIVEIRA, L. de; TALAMINI, E. Land use returns in organic and conventional farming systems: financial and beyond. **Organic Agriculture**, v. 12, p. 353-371, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13165-022-00392-4>.
- FISHER, R. A. The design of experiments. In: KOTZ, S.; JOHNSON, N. L. (ed.). **Breakthroughs in statistics**. New York: Springer, 2016. p. 66-70.
- GLIESSMAN, S. R. **Agroecology**: the ecology of sustainable food systems. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- HORRIGAN, L.; LAWRENCE, R. S.; WALKER, P. How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 5, p. 445-456, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1289%2Fehp.02110445>.
- HOSSARD, L.; ARCHER, D. W.; BERTRAND, M.; COLNENNE-DAVID, C.; DEBAEKE, P.; ERNFORS, M.; JEUFFROY, M. H.; MUNIER-JOLAIN, N.; NILSSON, C.; SANFORD, G. R.; SNAPP, S. S.; JENSEN, E. S.; MAKOWSKI, D. A meta-analysis of maize and wheat yields in low-input vs. conventional and organic systems. **Agronomy Journal**, v. 108, n. 3, p. 1155-1167, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2134/agronj2015.0512>.
- INMET. **Estação Meteorológica de Sete Lagoas**. Disponível em: <https://mapas.inmet.gov.br/>. Acesso: 2 out. 2023.
- JAIN, A. K. Data clustering: 50 years beyond K-means. **Pattern Recognition Letters**, v. 31, n. 8, p. 651-666, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.patrec.2009.09.011>.
- KARNATAM, K. S.; MYTHRI, B.; NISA, W. U.; SHARMA, H.; MEENA, T. K.; RANA, P.; VIKAL, Y.; GOWDA, M.; DHILLON, B. S.; SANDHU, S. Silage maize as a potent candidate for sustainable animal husbandry development-perspectives and strategies for genetic enhancement. **Frontiers in Genetics**, v. 14, 1150132, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1150132>.
- LORI, M.; SYMNACZIK, S.; MÄDER, P.; DE DEYN, G.; GATTINGER, A. Organic farming enhances soil microbial abundance and activity: a meta-analysis and meta-Regression. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, e0180442, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180442>.
- LYNCH, D. **Sustainable agriculture**: definitions and terms. Beltsville: National Agricultural Library, 2015. (Special Reference Briefs Series, 99-02).
- MACQUEEN, J. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In: BERKELEY SYMPOSIUM ON MATHEMATICAL STATISTICS AND PROBABILITY, 5., 1967, Berkeley. **Proceedings...** Berkeley: University of California, 1967. p. 281-297.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. New York: John Wiley & Sons, 2017.
- PAZIANI, S. de F.; DUARTE, A. P.; NUSSIO, L. G.; GALLO, P. B.; BITTAR, C. M. M.; ZOPOLLATTO, M.; RECO, P. C. Características agrônomicas e bromatológicas de híbridos de milho para produção de silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 3, p. 411-417, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009000300002>.

ROUSSEEUW, P. J. Silhouettes: a graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. **Journal of Computational and Applied Mathematics**, v. 20, p. 53-65, 1987. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0377-0427\(87\)90125-7](http://dx.doi.org/10.1016/0377-0427(87)90125-7).

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974. DOI: <https://doi.org/10.2307/2529204>.

SKINNER, C.; GATTINGER, A.; KRAUSS, M.; KRAUSE, H. M.; MAYER, J.; HEIJDEN, M. G. A. van der; MÄDER, P. The impact of long-term organic farming on soil-derived greenhouse gas emissions. **Science Reports**, v. 9, article 1702, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38207-w>.

SMITH, J. R.; JOHNSON, A.; JONES, D. Modern experimental designs in agricultural research. **Journal of Agricultural Science**, v. 157, n. 8, p. 657-669, 2019.

TABELAS brasileiras de composição de alimentos para ruminantes. Disponível em: <https://www.cqbal.com.br/#/>. Acesso em: 13 mar. 2023.

TAYLOR, S. J. Introduction to correlation and regression analysis. In: AGRESTI, A. **Statistical methods for the social sciences**. 5. ed. São Paulo: Pearson, 2017. p. 136-169.

TILMAN, D.; CASSMAN, K. G.; MATSON, P. A.; NAYLOR, R.; POLASKY, S. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, p. 671-677, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature01014>.

WU, J.; CAI, Z.; ZHOU, B. One-way ANOVA based on interval-valued symbolic data. **Computational Statistics & Data Analysis**, v. 154, 107115, 2021.

Efeito do complexo dos enfezamentos na sanidade de grãos de milho⁽¹⁾

Gabriel Vitor Buitrago de Figueiredo⁽²⁾, Dagma Dionísia da Silva Araújo⁽²⁾, Felipe Almeida Silva⁽²⁾, Laura Cristiny Souza Maia⁽²⁾, Luciano Viana Cota⁽²⁾ e Rodrigo Veras da Costa⁽²⁾

⁽¹⁾Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig. ⁽²⁾ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽³⁾ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Resumo - O complexo dos enfezamentos, composto principalmente por duas bactérias da classe Mollicutes: *Spiroplasma kunkelii* e *Candidatus Phytoplasma asteris* e pelo vírus-da-risca do-milho (Maize rayado fino vírus - MRFV), é atualmente o principal problema fitossanitário para a cultura do milho, com perdas de produtividade podendo chegar a mais de 80%. Os patógenos colonizam o floema das plantas, causando alterações fisiológicas e nutricionais nelas, que podem resultar em efeitos secundários, como isoporização de colmos (nutrientes exauridos) e podridão de colmos, levando ao tombamento de plantas. Outros efeitos são a má formação de espigas e grãos chochos. A relação desse complexo de doenças com a sanidade de grãos de milho foi pouco pesquisada e há necessidade de informações sobre este problema, já que o enfraquecimento das plantas pode aumentar a predisposição delas a infecções fúngicas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do complexo dos enfezamentos na incidência de podridão de grãos em 35 híbridos comerciais de milho. O complexo dos enfezamentos apresentou correlação direta com as podridões de colmo/tombamento, com consequente efeito na produtividade.

Termos para Indexação: Mollicutes, Maize rayado fino virus, grãos ardidos

Effect of the stunting complex on the health of corn grains⁽¹⁾

Abstract - The maize stunt complex, composed mainly of two bacteria of the Mollicutes class: *Spiroplasma kunkelii* and *Candidatus Phytoplasma asteris* and the Maize rayado fino virus (MRFV), is currently the main phytosanitary problem for maize crops, with yield losses that can reach more than 80%. The pathogens colonize the phloem of plants, causing physiological and nutritional changes in them, which can result in secondary effects such as stalk isoporization (depleted nutrients) and stalk rot, leading to plant toppling. Other effects include malformation of ears and ear rot incidence. The relationship between this complex of diseases and the health of corn kernels has been little studied and there is a need for information on this problem, since the weakening of plants can increase their predisposition to fungal infections. The aim of this study was to evaluate the effect of the blight complex on the incidence of grain rot in 35 commercial maize hybrids. The head blight complex showed a direct correlation with stalk rot, with a consequent effect on productivity.

Index terms: Mollicutes, Maize rayado fino virus, ear rot.

Introdução

O milho é o segundo grão mais produzido e exportado pelo Brasil, sendo componente base para a alimentação humana e animal. A produção e a produtividade estimadas de milho para a safra 2022/2023 no País são de 127,767 milhões toneladas e 5.767 kg/ha, respectivamente (Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, 2023). Dentre os fatores que podem afetar a produtividade do milho, estão as doenças, que têm grande impacto na cadeia produtiva. Atualmente, o complexo dos enfezamentos é o problema fitossanitário mais importante para o milho brasileiro. O complexo dos enfezamentos é composto por três patógenos, o vírus *Maize rayado fino virus* (MRFV) e duas bactérias da classe Mollicutes: *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb et al., 1986) (Mycoplasmatales: Mycoplasmataceae) e *Candidatus Phytoplasma asteris* (Nault, 1980), causadoras dos enfezamentos pálido e vermelho, respectivamente. Os três patógenos são transmitidos pela cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae). Os efeitos do complexo são multiespigamento, redução da altura de plantas, encurtamento de internódios, aumento no tombamento de plantas e podridão de colmos e perdas na produtividade (Silva et al., 2019; Costa et al., 2023).

A associação do complexo dos enfezamentos com as podridões de grãos também é uma possibilidade que deve ser pesquisada, uma vez que o enfraquecimento das plantas pela doença pode resultar em predisposição a infecções fúngicas. Os principais fungos que colonizam os grãos são *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*), *Fusarium subglutinans*, *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. A colonização dos grãos pode resultar em apodrecimento, resultando em grãos ardidos e podridões de espigas. A associação entre a severidade do complexo dos enfezamentos com a sanidade de grãos de milho ainda necessita de pesquisas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos enfezamentos na incidência de podridão de grãos em 35 híbridos comerciais de milho.

Material e métodos

O experimento foi conduzido na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, na safrinha de 2022. A semeadura foi realizada em 18/3/2022. Foram semeados 35 híbridos comerciais de milho em parcelas com quatro linhas com cinco metros de comprimento. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com três repetições. A transmissão dos patógenos do complexo dos enfezamentos ocorreu de forma natural através da cigarrinha *Dalbulus maidis*, presente na área experimental.

Foram realizadas contagens semanais do número de cigarrinhas a partir do estágio V2 (duas folhas expandidas) até o estágio V7-V8 (sete-oito folhas expandidas). A contagem foi realizada em cinco plantas das duas linhas úteis, totalizando dez plantas/parcela. Aos 49 dias após a semeadura (DAS), foi realizada a quantificação do número de plantas com sintomas de raiado-fino para cálculo da incidência da doença. Utilizaram-se as duas linhas úteis, e a incidência foi dada pela fórmula: $\text{Incidência \%} = (\text{n}^\circ \text{ de plantas com sintomas} / \text{total de plantas na parcela útil}) \times 100$.

A severidade do complexo dos enfezamentos foi avaliada aos 101 DAS utilizando-se escala de notas de 1 a 6, considerando a média dos sintomas das plantas na parcela, em que 1: ausência de sintomas; 2: plantas com menos de 25% das folhas com sintomas, ou seja, folha avermelhada ou amarelada, ou apresentando faixas cloróticas em sua inserção; 3: plantas com 25% a 50% das folhas

com sintomas; 4: plantas com 50% a 75% das folhas com sintomas; 5: plantas com mais de 75% das folhas com sintomas e 6: plantas com morte precoce causada por enfezamentos (Silva et al., 2003).

A quantificação de podridão/tombamento de plantas foi realizada aos 147 DAS, seguindo a mesma fórmula usada para cálculo da incidência de raiado-fino. As plantas foram consideradas apodrecidas ao não suportar a pressão dos dedos.

Aos 178 DAS, as espigas foram colhidas e os grãos foram pesados para avaliar a produtividade a 13% de umidade. A seguir, os grãos foram enviados para o Laboratório de Fitopatologia onde foram avaliados o peso total da amostra, o peso de 100 grãos sadios, o peso de grãos ardidos e o número de grãos ardidos na amostra. O peso total da amostra (g) e o peso de grãos ardidos (g) foram utilizados para cálculo do peso percentual de grãos ardidos na amostra pela fórmula: Peso percentual de grãos ardidos (%) = (peso de grãos ardidos/peso total da amostra) *100.

Para avaliação da sanidade, 100 grãos sadios (assintomáticos) e os grãos ardidos na amostra, até 100 no total por parcela, foram desinfestados superficialmente por imersão em hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos e, em seguida, distribuídos em caixas tipo gerbox, contendo no máximo 25 grãos cada.

Foram considerados ardidos os grãos com escurecimento total ou parcial, grãos mofados e fermentados, conforme a Instrução Normativa nº 60 de 23 de dezembro de 2011 (Brasil, 2011). As caixas gerbox foram mantidas 24 horas em temperatura ambiente para o início da germinação dos grãos e mantidas por mais 24 horas em freezer para que a germinação fosse inviabilizada.

Após esse período, as caixas foram mantidas por 10 dias em câmara de crescimento de fungos, com temperatura de 25 ± 2 °C sob regime de luz de 12 horas. A incidência de fungos nos grãos ardidos e sadios foi avaliada separadamente pela contagem e identificação das colônias, utilizando estereomicroscópio binocular e microscópio.

Por causa do andamento das análises de sanidade, ainda em execução, os dados analisados foram aqueles gerados na primeira repetição do experimento. Foi calculado o intervalo de confiança para peso de grãos ardidos (%), complexo de enfezamentos (nota), incidência de podridão/tombamento de colmos (%), de raiado-fino (%), de *Fusarium* sp. em grãos ardidos, sadios e grãos ardidos + sadios. Análise de regressão e de correlação foi feita entre o complexo de enfezamentos com o peso de grãos ardidos, tombamento de colmos, raiado fino, incidência de *Fusarium* sp. nos grãos e a produtividade e entre os demais fatores.

Resultados e discussão

Houve variação na severidade do complexo de enfezamentos, peso de grãos ardidos, podridão de colmo/tombamento de plantas, incidência de *Fusarium* sp. e produtividade dos híbridos (Tabela 1). As notas para o complexo dos enfezamentos variaram de 2 a 5,67, não sendo observado nenhum híbrido com ausência de sintomas (Tabela 1). A variação entre híbridos para o complexo dos enfezamentos tem sido mostrada em várias pesquisas (Moro et al., 2007; Costa et al., 2019; Oleszczuk et al., 2020; Faria et al., 2022; Pozebon et al., 2022).

O peso percentual médio de grãos ardidos foi de 1,1%, variando, entre híbridos, de 0,09 a 2,40%. A incidência média de *Fusarium* sp. foi de 86,88 e 98,2% em grãos sadios e ardidos, respectivamente. Nos grãos sadios, houve uma maior variação entre os híbridos, com valores

entre 50 e 100% de incidência de *Fusarium* sp. Para os grãos ardidos, a média variou entre 70 e 100%, sendo que a grande maioria dos híbridos tiveram 100% dos grãos colonizados por *Fusarium* (Tabela 1). Outros gêneros de fungos, como *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Bipolaris* sp., foram identificados nas amostras, porém em baixa frequência entre os híbridos.

A incidência média de podridão/tombamento de colmos foi de 34,6% com grande variação entre híbridos, de 0,95 e 90%. Em relação ao raiado-fino, a média foi de 11,53%, com valores entre 0 e 24% de incidência (Tabela 1).

A produtividade variou de 2.453,64 kg/ha a 9.057,63 kg/ha, com os híbridos com as maiores severidades do complexo dos enfezamentos apresentando as maiores perdas (Tabela 1). Híbridos com notas abaixo de 3 apresentaram média de produtividade de 7.2496,78 kg/ha; notas entre 3 e 4, médias de 6.618,13 kg/ha; para notas acima de 4 e menores que 5, a média foi de 4.503,87 kg/ha; e notas acima de 5, a média foi de 3.279,87 kg/ha. Vale ressaltar que a produtividade média no Brasil é estimada pela Conab, na safra 2022/2023, em 5.767 kg/ha. Entre os 35 híbridos avaliados, dezoito deles (51,43%), apresentaram produtividade abaixo da média nacional, sendo todos eles com notas de complexo de enfezamentos acima de 4 (Tabela 1).

Tabela 1. Peso de amostras, de grãos sadios e ardidos, número e porcentagem de grãos ardidos, severidade do complexo dos enfezamentos, porcentagens de tombamento de plantas, de raiado fino e de *Fusarium* e produtividade de trinta e cinco híbridos de milho semeados na safrinha de 2022. Sete Lagoas, MG. 2023.

Híbridos	Peso grãos			Nº de grãos ardidos	Grãos ardidos (%)	Nota	Incidência (%)		Média <i>Fusarium</i> nos grãos (%)		Produtividade de (kg/ha)
	Amostra (g)	100 grãos (g)	Ardidos (g)				Complexo dos enfezamentos	Tombamento	Raiado fino	Ardidos	
1	260,46	21,68	5,17	100	1,98	5,17	49,75	23,05	100	77	2597,1
2	284,17	18,1	3,87	65	1,36	4,67	56,87	24,55	100	97,45	2903,06
3	297,22	28,19	7,14	100	2,4	5,33	15,63	17,68	100	89	2453,64
4	317,07	16,61	5,97	100	1,88	5	77,09	0	100	94	2715,91
5	318,78	19,8	4,6	85	1,44	4,5	90,91	11,5	70,24	99	3262,93
6	365,45	20,55	5,69	78	1,56	4,33	74,67	16,26	94	99	3945,37
7	377,19	15,54	6,41	100	1,7	5,67	34,04	11,07	96	84,5	2429,81
8	380,58	23,3	2,98	55	0,78	4,33	79,04	14,25	98,18	99	4225,47
9	384,25	27,86	4,99	100	1,3	4,67	24,28	16,24	100	100	4786,79
10	387,61	26,66	7,12	80	1,84	5	72,58	12,83	100	92,5	3591,17
11	405,74	20,23	4,62	68	1,14	4,5	22,84	13,62	100	82	4692,14
12	410,36	21,43	3,48	52	0,85	4	37,91	12,49	100	85,53	4697,63
13	417,34	26,28	4,31	58	1,03	4,17	10,34	13,38	100	100	5059,25
14	418,71	19,55	7,25	100	1,73	5	80,48	5,43	96	100	4529,02
15	425,2	33,4	10,1	100	2,38	5,33	49,02	4,17	99	97	4642,42
16	442,6	19,4	6,61	100	1,49	3,83	49,06	10,71	99	99	5973,45
17	503,5	31,9	9,1	100	1,81	3,83	32,23	13,21	100	96,5	6451,88
18	537,67	25,84	6,2	100	1,15	4,33	27,93	0	99	95	5648,95
19	564,95	25,08	6,5	100	1,15	3	15,63	15,05	100	82,5	6173,5
20	567,1	23,5	7,77	100	1,37	2,67	34,54	3,92	100	100	8037,39
21	575,62	18,62	2,23	42	0,39	4,67	36,74	1,96	99	97	5593,74
22	582,17	27,05	1,41	19	0,24	2	12,16	12,47	100	75	9179,87
23	584,94	33,32	5,9	67	1,01	3,67	9,17	9,8	100	80	5720,9
24	585,45	31,37	5,54	50	0,95	2,83	0,95	19,98	100	94,67	6211,43
25	586,9	28,85	5,85	100	1	3,33	15,16	20,12	100	98	7634,97
26	597,81	21,5	0,79	12	0,13	3,33	12,88	10,87	100	85,5	7370,66
27	606,95	26,83	1,35	14	0,22	2,33	6,7	15	93,33	92	7195,87
28	609,52	30,95	1,67	21	0,27	3,17	19,36	22,58	100	81,5	8541,57
29	610,3	18,6	4,48	75	0,73	4,5	63,46	5,21	100	100	4725,87
30	613,36	26,87	4,52	55	0,74	3,33	7,6	16,74	100	94,5	6554
31	620,18	31,73	2,1	20	0,34	2,33	19,42	12,04	100	97,5	8331,59
32	628,6	26,32	2,43	20	0,39	2	15,48	8,08	100	99,09	6932,41
33	638,68	25,08	5,84	72	0,91	2,83	23,62	0	93,06	83,62	7619,28
34	656	25,9	8,23	100	1,25	2,17	29,95	3,81	100	92	6228,84
35	664,05	22,94	0,59	11	0,09	2,17	3,41	5,57	100	99,5	9057,63
Médias	492,19	24,6	4,94	69,11	1,11	3,83	34,6	11,53	98,19	92,54	5591,87

A análise de regressão foi significativa para a relação entre o complexo dos enfezamentos e o peso de grãos ardidos, as podridões/tombamento de colmos e a produtividade. Também houve significância na relação de podridões/tombamento de plantas e a produtividade e entre o peso de grãos ardidos e a produtividade (Figura 1, de A-E). Não houve significância entre o complexo dos enfezamentos e a incidência de *Fusarium* sp. em grãos do milho. Nenhuma relação foi significativa quando se analisou a incidência de raiado-fino.

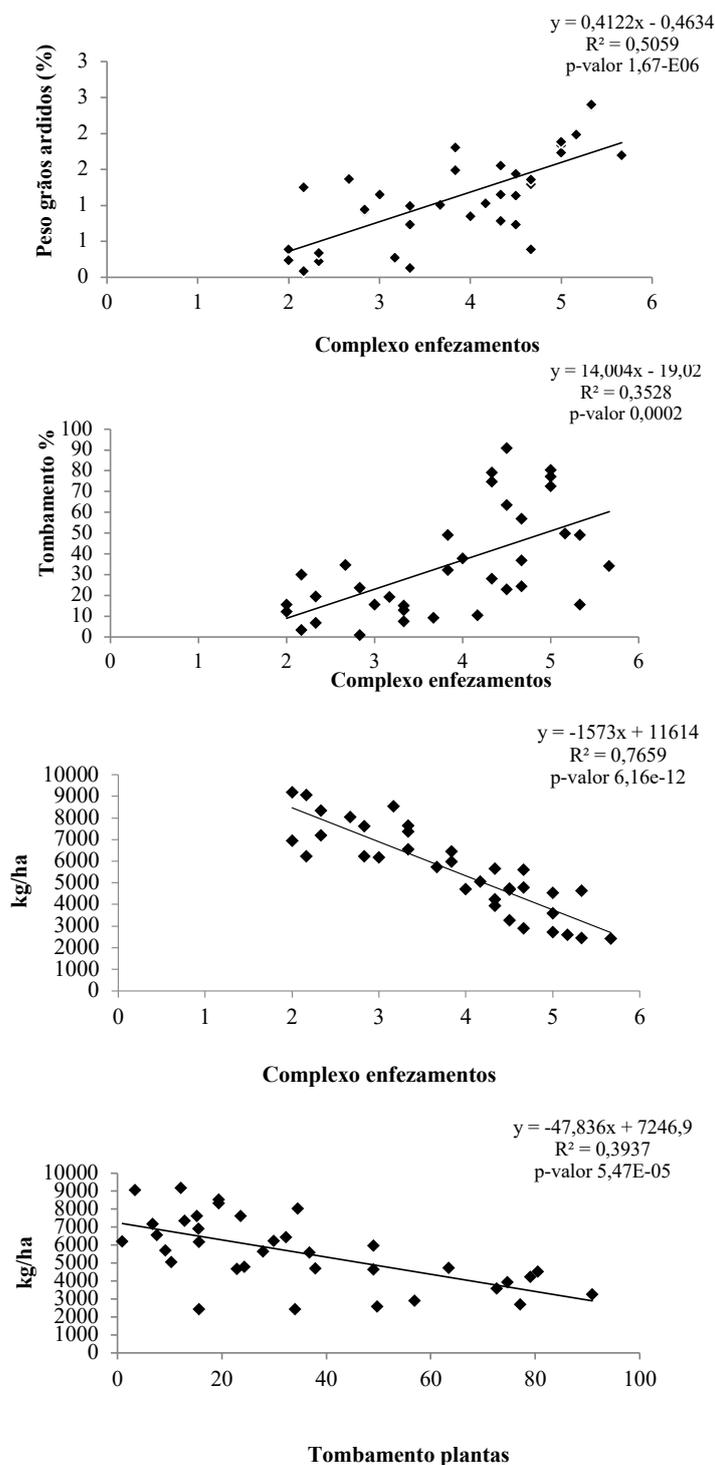


Figura 1. Relação entre complexo dos enfezamentos, tombamento de plantas, peso de grãos ardidos, incidência de *Fusarium* sp. e produtividade de 35 híbridos de milho, Sete Lagoas, MG.

Houve alta correlação positiva entre o complexo dos enfezamentos e o peso de grãos ardidos (0,71), alta e inversa com a produtividade (-0,88) e intermediária positiva com a podridão/tombamento de plantas. O peso percentual de grãos ardidos e a podridão/tombamento de plantas também apresentaram alta correlação inversa com a produtividade (-0,73) e (-0,63), respectivamente. Os demais fatores apresentam correlação intermediária ou baixa entre si (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação de Pearson entre complexo dos enfezamentos, peso de grãos ardidos (%), podridão/tombamento de plantas (%), incidência de *Fusarium* sp. (%), de raiado fino (%) e produtividade de milho (kg/ha). Sete Lagoas, MG. 2022.

Fatores	Complexo enfezamentos	Peso grãos ardidos (%)	Tombamento (%)	Raiado-fino (%)
Peso grãos ardidos (%)	0,71	–	–	–
Tombamento (%)	0,59	0,49	–	–
Raiado fino (%)	0,05	0,02	-0,16	–
<i>Fusarium</i> assintomaticos	0,12	0,17	0,13	0,1
<i>Fusarium</i> ardidos	-0,11	-0,09	-0,42	0,07
<i>Fusarium</i> sadios+ardidos	0,08	0,13	-0,02	0,13
Produtividade (kg/ha)	-0,88	-0,73	-0,63	-0,13

Os resultados deste trabalho mostram que há um forte efeito no aumento do peso de grãos ardidos e podridão/tombamento de colmos causados pelo complexo dos enfezamentos e de redução da produtividade pela interação entre estes fatores. Outros trabalhos também observaram resultados similares quanto à perda de produtividade (Costa et al., 2019; Souza et al., 2003).

A associação entre a severidade de complexo dos enfezamentos e o aumento das podridões de colmo e tombamento de plantas tem sido observada (Silva et al., 2019; Costa et al., 2023). Vale ressaltar que o tombamento de plantas devido aos enfezamentos pode ser pela infecção por fungos ou pela exaustão de nutrientes nos colmos, que passam a fornecer nutrientes para as espigas, tornando-se isoporizadas e frágeis. Segundo Costa et al. (2023), a interação entre as podridões de colmo e o complexo dos enfezamentos é uma grande fonte de preocupação, uma vez que ambos são altamente agressivos e prejudiciais ao milho, limitam a absorção de nutrientes, vias de produção e absorção, e limitam severamente a absorção e translocação de água e nutrientes para disparar órgãos (Costa et al., 2019). Segundo esses autores, esses efeitos combinados afetam seriamente o desenvolvimento da planta e reduzem substancialmente a produtividade.

Neste trabalho, foi identificado um forte efeito do complexo dos enfezamentos no peso de grãos ardidos. A alta incidência de *Fusarium* mostra que este é o principal fungo em grãos de milho sujeitos ao complexo dos enfezamentos. A prevalência de *Fusarium* em milho, acima de 90% e valores altos de incidência em grãos ardidos e sadios, foi confirmada em trabalhos anteriores (Costa et al., 2019; Lanza et al., 2014). Costa et al. (2019) identificaram variação entre híbridos, porém abaixo do nível máximo tolerado pela legislação brasileira na época, 6%, que obedecia às normas estabelecidas pela Portaria nº 845/1976. Pelo resultado deste trabalho, de acordo com a legislação atual da Anvisa para o peso de grãos ardidos, 21 híbridos ficaram classificados como tipo 2 (peso de grãos ardidos 2%) e 14 com notas abaixo de 1 (peso de grãos ardidos até 1%), sendo, portanto, tipo 1. Este resultado acarreta, para os produtores, descontos na hora da comercialização dos grãos, dado que nas classificações comerciais o milho mais comercializado entre os produtores rurais e as empresas compradoras de grãos é o chamado de “argentino” (tipo 2), cuja classificação de limite máximo é 1, mas a negociação pode sofrer alterações (Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2017).

Conclusão

Alta incidência de *Fusarium* sp. foi identificada em grãos de milho sadios e ardidos.

O complexo dos enfezamentos afetou a qualidade de grãos de milho, favorecendo o aumento do peso de grãos ardidos e reduzindo a produtividade.

O complexo dos enfezamentos se correlacionou às podridões de colmo/tombamento com efeito na produtividade.

Agradecimentos

À Croplife Brasil, pelo financiamento do projeto, ao CNPq e à Fapemig, pelo suporte de bolsas.

Referências

- ACOMPANHAMENTO da Safra Brasileira [de] Grãos: safra 2022/23: 10º levantamento, v. 10, n. 10, fev. 2023. Brasília, DF: Conab, 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/gaos/boletim-da-safra-de-gaos>. Acesso em: 7 ago. 2022.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 60, de 22 de dezembro de 2011. Estabelece o Regulamento Técnico do Milho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 246, 23 dez. 2011. Seção 1, p. 3-5.
- COSTA, R. V. da; SILVA, D. D. da; COTA, L. V.; CAMPOS, L. J. M.; ALMEIDA, R. E. M. de; BERNARDES, F. P. Incidence of corn stunt disease in off-season corn hybrids in different sowing seasons. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, e00872, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00872>.
- COSTA, R. V.; ALMEIDA, R. E. M.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; LIMA, L. S.; SOUSA, C. W. A.; SOUZA, M. R. Corn stunt disease complex increases charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) under field conditions. **Tropical Plant Pathology**, v. 48, p. 283-292, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-023-00570-z>.
- FARIA, R. D.; FANELA, T. L. M.; SARTORI, M. M. P.; LOPES, J. R. S.; LOURENÇÃO, A. L.; BALDIN, E. L. L. Evaluation of resistance of Bt and non-Bt maize genotypes to *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) and associated mollicutes. **Phytoparasitica**, v. 50, p. 997-1009, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12600-022-00999-z>.
- LANZA, F. B.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, R. V.; QUEIROZ, V. A. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; SOUZA, A. G. C.; FIGUEIREDO, J. E. F. Prevalence of fumonisin producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. **Crop Protection**, v. 65, p. 232- 237, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.08.003>.
- MORO, J. R.; SILVEIRA, F. T.; CARGNELUTTI FILHO, A. Dissimilaridade genética em sessenta e quatro linhagens de milho avaliadas para resistência ao complexo enfezamento. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 1, p. 153-160, 2007.
- NAULT, L. R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. **Phytopathology**, v. 70, n. 7, p. 659-662, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-70-659>.

- OLESZCZUK, J. D.; CATALANO, M. I.; DALAISÓN, L.; DI RIENZO, J. A.; GIMÉNEZ PECCI, M. P.; CARPANE, P. Characterization of components of resistance to Corn Stunt disease. **PLoS ONE**, v. 15, n. 10, e0234454, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234454>.
- POZEBON, H.; STÜMER, G. R.; ARNEMANN, J. A. Corn stunt pathosystem and its leafhopper vector in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 115, n. 6, p. 1817-1833, 2022.
- SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM RURAL. **Grãos**: classificação de soja e milho. Brasília, DF, 2017.152 p. (Coleção SENAR).
- SILVA, D. D. da; COTA, L. V.; MEIRELLES, W. F.; SOUZA, I. R. P. de; AGUIAR, F. M.; OLIVEIRA, I. R. de; COSTA, R. V. da; MENDES, S. M. **Problemas fitossanitários ocorridos em lavouras de milho na região de Marechal Cândido Rondon, Oeste do Paraná, na safra 2018/2019 e safrinha 2019**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019. 23 p. Nota técnica.
- SILVA, R. G.; GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; OLIVEIRA, E. Controle genético da resistência aos enfezamentos do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 921-928, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000800004>.
- SOUZA, I. R. P. de; OLIVEIRA, E. de; OLIVEIRA, C. M. de; PRATES, H. T.; COIMBRA, R. R.; LOPES, M. J. C. Relação entre características bioquímicas e agrônômicas e o enfezamento pálido em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 1, p. 9-19, jan./abr. 2003.
- WHITCOMB, R. F.; CHEN, T. A.; WILLIAMSON, D. L.; LIAO, C.; TULLY, J. G.; BOVÉ, J. M.; MOUCHES, C.; ROSE, D. L.; COAN, M. E.; CLARK, T. B. *Spiroplasma kunkelii* sp. nov.: characterization of the etiological agent of corn stunt disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 170-178, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-36-2-170>.

Efeitos de tratamentos térmicos aplicados em farinhas integrais de sorgo sobre propriedades antioxidantes de bolos isentos de glúten

Alexandre Gonçalves Teles⁽¹⁾, Valéria Aparecida Vieira Queiroz⁽²⁾, e Cícero Beserra de Menezes⁽²⁾

⁽¹⁾Estudante de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽²⁾Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Resumo - O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes tratamentos térmicos empregados na farinha integral de sorgo, antes de sua utilização, sobre as propriedades antioxidantes de bolos isentos de glúten. Utilizou-se uma receita padrão com modificação apenas nos tratamentos aplicados à farinha de sorgo: (FC) farinha crua; (FT) farinha tostada por torrefação; (FCT) farinha crua/tostada (50% de FC+ 50% de FT); (FCo) farinha cozida e seca; (FE) farinha de sorgo extrudada. Uma formulação com farinha de arroz foi usada como controle. Foram avaliados capacidade antioxidante e os teores de antocianinas totais, 3-desoxiantocianinas, compostos fenólicos totais e taninos. O bolo feito com farinha crua obteve os melhores resultados quanto às propriedades antioxidantes, com níveis elevados de capacidade antioxidante, compostos fenólicos e taninos. Os bolos produzidos com as farinhas de sorgo tostada, tostada/crua e extrudada, embora tenham registrado perdas, ainda retiveram mais de 79% das características antioxidantes daquele feito com farinha crua. A estabilidade de 3-DXAs foi mais afetada pelos tratamentos térmicos, com perda por volta de 85% . Os bolos contendo farinha de sorgo superaram os de farinha de arroz em todos os compostos analisados, destacando-se a farinha de sorgo como ingrediente para a indústria de alimentos sem glúten e com potencial funcional.

Termos para indexação: *Sorghum bicolor* (L.) Moench, produtos gluten-free, compostos fenólicos, alimentos funcionais.

Effects of heat treatments applied to whole sorghun flours on the antioxidant properties of gluten-free cakes

Abstract - The objective of this work was to evaluate the influence of different heat treatments used on whole sorghum flour, before its use, on the antioxidant properties of gluten-free cakes. A standard recipe was used with modifications only in the treatments applied to sorghum flour: (FC) raw flour; (FT) flour toasted by roasting; (FCT) raw/toasted flour (50% FC+ 50% FT); (FCo) cooked and dry flour; (FE) extruded sorghum flour. A formulation with rice flour was used as a control. Antioxidant capacity and levels of total anthocyanins, 3-deoxyanthocyanins, total phenolic compounds and tannins were evaluated. The cake made with raw flour obtained the best results in terms of antioxidant properties, with high levels of antioxidant capacity, phenolic compounds and tannins. Cakes produced with toasted, toasted/raw and extruded sorghum flour, although recorded losses, still retained more than 79% of the antioxidant characteristics of those made with raw flour. The stability of 3-DXAs was most affected by heat treatments, with a loss of around 85%. Cakes

containing sorghum flour outperformed those made with rice flour in all compounds analyzed, highlighting sorghum flour as an ingredient for the gluten-free food industry with functional potential.

Index terms: *Sorghum bicolor* (L.) Moench, gluten-free products, phenolic compounds, functional food.

Introdução

O sorgo possui elevada tolerância à seca e custos de produção menores quando comparados a outros cereais, o que o torna uma cultura importante para uso futuro, haja vista a diminuição da disponibilidade de água no planeta e o aumento da demanda populacional (Schober; Bean, 2008).

Seus grãos integrais se destacam pelas suas propriedades nutricionais e funcionais altamente benéficas para a saúde. Além de serem ricas fontes de fibras, alguns genótipos podem, também, fornecer minerais, vitaminas e compostos bioativos. Desse último, destacam-se as antocianinas, os ácidos fenólicos, os taninos e o amido resistente (Awika; Rooney, 2004). Embora nos países ocidentais o sorgo seja cultivado quase exclusivamente para alimentação animal (Anuniação et al., 2017), seu uso para consumo humano tem aumentado, resultado da procura por alternativas dietéticas livres de glúten, e também de uma clara necessidade de incorporação de cereais integrais na alimentação humana (Schober; Bean, 2008).

Uma ampla diversidade de produtos à base de sorgo, por exemplo, cookies, bolos, pães, massas, cereais matinais, churros, entre outros, já foi desenvolvida no Brasil e apresenta aceitação sensorial positiva (Queiroz et al., 2021). Entretanto, características como textura ainda são motivos para otimização da formulação de alguns produtos feitos com esse cereal. Visando melhorar essa característica, foram aplicados diferentes tratamentos térmicos na farinha de sorgo antes de sua utilização. Porém, como o calor pode afetar o teor dos compostos bioativos (Queiroz et al., 2020), o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito desses tratamentos térmicos sobre as propriedades antioxidantes de bolos sem glúten.

Material e métodos

A farinha do híbrido de sorgo BRS 305, que possui altos teores de compostos fenólicos totais, taninos (Martinez et al., 2020) e alta capacidade antioxidante, foi obtida na Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). Os demais ingredientes foram obtidos em comércio local.

As formulações dos bolos foram desenvolvidas a partir de uma receita padrão com modificação apenas nos tratamentos aplicados à farinha de sorgo: (FC) farinha crua; (FT) farinha tostada por torrefação da farinha crua em forno elétrico (Fischer) a 180 °C por 40 min; (FCT) farinha crua/tostada (50% de FC+ 50% de FT); (FCo) farinha cozida e seca: obtida pelo

cozimento de 124 g de farinha de sorgo crua em 1 litro de água, em fogo baixo por 40 min e, posteriormente, submetida a secagem, em estufa (DeoLeo), a 80 °C por 24 horas e moída em moinho de laboratório (Hawos HM-1); (FE) farinha de sorgo extrudada: obtida na Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ), conforme descrito por Vargas-Solórzano et al. (2014). Para a formulação controle, foi utilizada a farinha de arroz (FA), por ser a mais usada em produtos sem glúten. As formulações continham os seguintes ingredientes e percentagens: farinha de sorgo ou de arroz (16%), açúcar (21,5%), amido de milho (13%), ovo em pó (3%), manteiga (9%), goma xantana (0,5%), fermento químico em pó (1,5%), água (35,5%). A proporção foi expressa em base de massa obtida pela soma de todos os ingredientes (394 g). Foram feitas três repetições de cada formulação. Para o preparo dos bolos, os ingredientes secos foram previamente misturados manualmente, em seguida, foram adicionadas a manteiga e a água, sendo, então, homogeneizados em batedeira da Oster power 750W por 3 min. Após a massa ficar homogênea, acrescentou-se o fermento. As misturas foram colocadas em formas de alumínio, com furo no meio, previamente untadas. O forno elétrico (Fischer) foi pré-aquecido a 180 °C por 15 min, e os bolos foram assados nessa mesma temperatura por 30 min. Depois de esfriados em temperatura ambiente, os bolos foram desenformados e acondicionados a -18 °C até serem feitas as análises químicas.

Para as análises químicas, as amostras foram previamente liofilizadas em Liofilizador SL-404 (Solab). A extração foi realizada com 1 g da amostra em 25 mL de metanol acidificado (1% HCl) com agitação em mesa agitadora (Nova Ética, modelo 109) a 200 rpm/120 min, posteriormente, centrifugada a 3.000 rpm/ 10 min e filtrada. A capacidade antioxidante (CA) foi avaliada utilizando o reagente 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS+) e Trolox como padrão de referência (Awika et al., 2003). Para quantificar os compostos fenólicos totais (CFT), foi empregado o método de Folin-Ciocalteu (Kaluza et al., 1980), com modificações. A absorbância das amostras foi medida em um espectrofotômetro (Hitachi U-1100 UV-Visível) a 600 nm. As 3-DXAs luteolinidina, apigeninidina e seus derivados metoxilados foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Yang et al., 2012), com modificações. Os taninos foram quantificados pelo método vanilina-HCl (Price et al., 1978), com absorbância lida em espectrofotômetro a 500 nm.

O delineamento estatístico foi em blocos casualizados (DBC), com seis tratamentos, em três repetições. Os resultados foram analisados por Anova, e as médias dos tratamentos foram comparadas por teste de Tukey em nível de 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico SISVAR.

Resultados e discussão

A CA dos bolos de sorgo variou de 8,88 (FCo) a 30,61 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$ (FC). Já o controle feito com FA foi de 3,48 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$. A CA do bolo feito com FT e a do feito com FCT foram estatisticamente iguais ($P < 0,05$), apresentando retenções da CA de 94,6 e 93,4%, respectivamente, em relação a FC (Tabela 1). Assim, o calor úmido (FCo) proporcionou maiores perdas que o calor seco (FT e FCT). Esse resultado corrobora o de Cardoso et al. (2014), que também observaram maiores perdas em farinha de sorgo tratada com calor úmido em comparação com o calor seco (Tabela 1).

Tabela 1. Capacidade antioxidante (CA, $\mu\text{mol TE g}^{-1}$)* e teores de compostos fenólicos totais (CFT, mg GAE g^{-1})* e taninos (TAN, mg CE g^{-1})* das formulações à base de farinha de sorgo BRS 305 pré-tratada e farinha de arroz (controle).

Farinha	CA ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)	Retenção (%)	CFT (mg GAE g^{-1})	Retenção (%)	TAN (mg CE g^{-1})
Farinha crua (FC)	30,61 a	-	3,38 a	-	0,8 a
Farinha tostada (FT)	29,02 b	94,6	3,31 a	98	0 b
Farinha crua/tostada (FCT)	28,61 b	93,4	2,86 b	84,6	0 b
Farinha extrudada (FE)	23,95 c	79,8	2,57 b	77,2	0 b
Farinha cozida (FCo)	8,88 d	29,2	1,73 c	51,6	0 b
Farinha de arroz (FA)	3,48 e	N/A	1,20 d	N/A	0 b

* Médias seguidas de letras diferentes dentro da mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os maiores teores de CFT foram detectados nos bolos contendo FC e FT, seguidos por aqueles contendo FCT e FE. O menor valor foi encontrado no boloc com FCo. Anunciação et al. (2017), comparando o conteúdo de compostos bioativos de cereais matinais de sorgo integral e de trigo, encontraram teores de fenólicos totais de $1,11 \text{ mgGAE g}^{-1}$, menor que os dos bolos produzidos com farinhas de sorgo deste estudo (entre $1,73 \text{ mg GAE g}^{-1}$ e $3,38 \text{ mg GAE g}^{-1}$), mas próximo do conteúdo do bolo com farinha de arroz ($1,20 \text{ mg GAE g}^{-1}$).

Os taninos foram detectados apenas nos bolos contendo FC ($0,8 \text{ mg CE g}^{-1}$). Vale ressaltar que os processamentos aplicados na farinha podem ter provocado mudanças na estrutura química ou complexação dos taninos com outros componentes das formulações, influenciando em sua extração/quantificação e nos resultados obtidos.

Em geral, a FC se destacou, apresentando maiores valores de CA, CFT e TAN, sugerindo uma opção potencialmente mais saudável e com menor consumo energético, portanto mais sustentável. Por outro lado, na formulação feita a partir da FCo, as perdas de CFT e da CA foram mais significativas (50% e 71%, respectivamente), evidenciando que o pré-tratamento da farinha com calor úmido (cozimento) é uma desvantagem, pois afeta suas propriedades funcionais. Esses resultados corroboram os estudos de Hithamani e Srinivasan (2014), os quais relataram perda média de 50,9% e 42,9% dos compostos fenólicos no sorgo após submeter o cereal, respectivamente, ao cozimento úmido sob pressão (103.421 pascals , 15 min) e à fervura em panela aberta (10 min).

No entanto, é importante salientar que as formulações produzidas com FT, FCT e FE, embora tenham sofrido perdas em suas propriedades antioxidantes, ainda apresentaram retenções entre 79,8 e 94,6% na CA e de 77,2 a 98,9% nos CFT, em relação à FC. Esses resultados mostram que, mesmo sofrendo dois tipos de tratamentos térmicos, os produtos feitos com essas farinhas (FT, FCT e FE) continuam sendo uma boa alternativa para uso em produtos sem glúten com potencial funcional.

O total de 3-DXAs variou de 2,12 (FCo) a $13,87 \mu\text{g g}^{-1}$ (FC) (Tabela 2). Não foram detectadas 3-DXAs na formulação controle (FA). Lut e 5-Lut foram as principais 3-DXAs encontradas nas formulações com as farinhas de sorgo. Cardoso et al. (2014) também relataram maiores quantidades de Lut e 5-Lut (32,1% e 30,7% do total de 3-DXAs) nas farinhas de sorgo processadas domesticamente.

Os teores de Api e 7-Api foram relativamente baixos em todas as formulações. A farinha crua apresentou maior teor de Api e de 7-Api. Cardoso et al. (2014) relataram que o processamento pode reduzir a concentração desses compostos por mecanismos ainda desconhecidos.

Tabela 2. Teores de 3-desoxiantocianinas (3-DXAs, $\mu\text{g g}^{-1}$)* das formulações feitas com farinha de sorgo BRS 305 pré-tratadas e com farinha de arroz (controle).

Farinha	3-Desoxiantocianinas ($\mu\text{g g}^{-1}$)					Retenção (%)
	Lut	5-Lut	Api	7-Api	Total	
Farinha crua (FC)	4,04 a	8,15 a	0,10 a	1,58 a	13,87a	-
Farinha tostada (FT)	0,65 c	2,74 c	0 b	0 c	3,39 c	24,6
Farinha crua/tostada (FCT)	2,03 b	6,78 b	0 b	0,54 b	9,36 b	67,5
Farinha extrudada (FE)	0,69 c	3,03 c	0 b	0 c	3,71 c	26,8
Farinha cozida (FCo)	0,08 d	2,03 c	0 b	0 c	2,12 d	15,3
Farinha de arroz (FA)	0 d	0 d	0 b	0 c	0 e	N/A

*Lut: Luteolinidina; 5-Lut: 5-metoxiluteolinidina; Api: Apigeninidina; 7-Api: 7-metoxiapigeninidina. Médias seguidas de letras diferentes dentro da mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em relação ao bolo feito com FC, a maior retenção de 3-DXAs foi obtida naquele feito com FCT (67,5%). Os demais pré-processamentos sofreram com perdas superiores. Cardoso et al. (2014) observaram estabilidade das 3-DXAs em todos os processamentos com calor seco, reduzindo somente no processamento com calor úmido. Essas perdas de 3-DXAs do sorgo podem ser atribuídas à combinação do excesso de temperatura e de tempo de processamento, visto que, exceto pela FC, as demais formulações sofreram dois tratamentos térmicos. O grau de instabilidade e os produtos de degradação dependem da intensidade (temperatura e tempo) e da natureza do aquecimento (Patras et al., 2010).

Conclusão

O bolo feito com farinha de sorgo crua apresentou melhores resultados em capacidade antioxidante, compostos fenólicos e taninos. Na formulação com farinha cozida, o pré-processamento por calor úmido (cozimento) prejudicou suas propriedades antioxidantes. As farinhas de sorgo tostada, tostada/crua e extrusada também tiveram perdas, mas retiveram mais de 79% das características em comparação com a farinha crua. A estabilidade de 3-DXAs foi mais afetada pelos tratamentos térmicos, com cerca de 85% de perda. Os bolos contendo farinha de sorgo superaram os de farinha de arroz em todos os compostos analisados, destacando-se a farinha de sorgo com um potencial antioxidante superior. Embora o bolo de farinha de sorgo crua tenha preservado melhor as propriedades antioxidantes, com menor dispêndio energético, há necessidade de uma avaliação sensorial para confirmar sua superioridade em relação aos demais tratamentos.

Referências

- ANUNCIAÇÃO, P. C.; CARDOSO, L. de M.; GOMES, J. V. P.; DELLA LUCIA, C. M.; CARVALHO, C. W. P.; GALDEANO, M. C.; QUEIROZ, V. A. V.; ALFENAS, R. de C. G.; MARTINO, H. S. D.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Comparing sorghum and wheat whole grain breakfast cereals: sensorial acceptance and bioactive compound content. **Food Chemistry**, v. 221, p. 984-989, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.065>.
- AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. **Phytochemistry**, v. 65, n. 9, p. 1199-1221, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.001>.
- AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WU, X.; PRIOR, R. L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6657-6662, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf034790i>.
- CARDOSO, L. M.; MONTINI, A. T.; PINHEIRO, S. S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; DUART, H. S.; MARTINI, H. S. D.; MOREIRA, A. V. B. Effects of processing with dry heat and wet heat on the antioxidant profile of sorghum. **Food Chemistry**, v. 152, p. 210-217, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.106>.
- HITHAMANI, G.; SRINIVASAN, K. Bioaccessibility of polyphenols from wheat (*Triticum aestivum*), sorghum (*Sorghum bicolor*), green gram (*Vigna radiata*), and chickpea (*Cicer arietinum*) as influenced by domestic food processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 46, p. 11170-11179, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf503450u>.
- KALUZA, W. Z.; MCGRATH, R. M.; ROBERTS, T. C.; SCHROEDER, H. H. Separation of phenolics of *Sorghum bicolor* (L.) Moench grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1191-1196, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60232a039>.
- MARTINEZ, O. D. M.; TOLEDO, R. C. L.; QUEIROZ, V. A. V.; PIROZI, M. R.; MARTINO, H. S. D.; BARROS, F. A. R. Mixed sorghum and quinoa flour improves protein quality and increases antioxidant capacity in vivo. **LWT**, v. 129, 109597, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109597>.
- PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 3-11, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>.
- PRICE, M. L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1214-1218, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60219a031>.
- QUEIROZ, V. A. V.; MENEZES, C. B. de; CARVALHO, C. W. P. de; GALDEANO, M. C.; CAPRILES, V. D.; OLIVEIRA, F. C. E. **Sorgo na produção de alimentos sem glúten**: propriedades sensoriais, nutricionais e funcionais. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2021. 42 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 272).
- QUEIROZ, V. A. V.; CORREIA, V. T. da V.; MENEZES, C. B. de; MIGUEL, R. de A.; CONCEIÇÃO, R. R. P. da; PAIVA, C. L.; FIGUEIREDO, J. E. F. Retention of phenolic compounds and acceptability of gluten-free churros made with tannin or tannin-free sorghum flour. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, e02288, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2020.v55.02288>.
- SCHOBER, T. J.; BEAN, S. Sorghum and maize. In: ARENDT, E. K.; BELLO, F. D. (ed.). **Gluten-free cereal products and beverages**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 101-118.
- VARGAS-SOLÓRZANO, J. W.; CARVALHO, C. W. P.; TAKEITI, C. Y.; CHERI, J. L.; QUEIROZ, V. A. V. Physicochemical properties of expanded extrudates from colored sorghum genotypes. **Food Research International**, v. 55, p. 37-44, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.023>.

YANG, L.; ALLRED, K. F.; GEERA, B.; ALLRED, C. D.; AWIKA, J. M. Sorghum phenolics demonstrate estrogenic action and induce apoptosis in nonmalignant colonocytes. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 3, p. 419-427, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.657333>.

Estoque de carbono em solo arenoso sob sistema Integração Lavoura- Pecuária-Floresta no Oeste da Bahia⁽¹⁾

Júlia Soares Moreira⁽²⁾, Flávia Cristina dos Santos⁽³⁾, Manoel Ricardo de Albuquerque Filho⁽³⁾ e Márcia Cristina Teixeira da Silveira⁽⁴⁾

⁽¹⁾Bolsa PIBIC financiada pelo CNPq e pesquisas pela Fazenda Trijunção. ⁽²⁾ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa⁽³⁾. Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo. ⁽⁴⁾ Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul

Resumo - Com os efeitos das mudanças climáticas globais, há demanda para o desenvolvimento de sistema agropecuários de produção mais sustentáveis. Assim, os sistemas integrados, como a Integração Lavoura-Pecuária-Floresta (ILPF), surgem como alternativas pelos benefícios já comprovados em pesquisa, por exemplo, o maior estoque de carbono (C) no solo. Neste sentido, em dezembro de 2018, foi instalado experimento com o sistema ILPF na Fazenda Trijunção, BA, sobre solo arenoso (110 g kg⁻¹ de argila), com o cultivo de culturas por dois anos, e depois braquiária Piatã, com o eucalipto. Para avaliação do estoque de C no solo, foi realizada amostragem em abril de 2022 (3,5 anos após a implantação do ILPF). As amostras de solo foram coletadas em minitrincheiras próximas aos renques do eucalipto na posição linha e no centro, entre dois renques, em três das 15 parcelas da área experimental de 15 hectares. Foram coletadas amostras indeformadas em cada uma das três paredes da minitrincheira, nas profundidades de 0 cm – 10 cm; 10 cm – 20 cm; e 20 cm – 30 cm para análise da densidade do solo e teor de C total. No geral, houve maior estoque de C no solo arenoso sob sistema ILPF, na posição mais próxima das árvores de eucalipto (linha), em comparação com o estoque sob Cerrado nativo. Já dentro do sistema ILPF, não houve diferença no estoque de C no solo considerando as posições no centro ou na linha. Concluiu-se que a implantação do sistema ILPF favorece o estoque de carbono em solo arenoso em comparação com área de Cerrado nativo, pelos múltiplos benefícios advindos deste sistema, principalmente na posição próxima aos renques do eucalipto.

Termos para indexação: sistemas integrados, agricultura baixo carbono

Carbon stock in sandy soil under an Integrated Crop-Livestock-Forestry system in Western Bahia⁽¹⁾

Abstract - Because of global climate change, there is a demand for the development of more sustainable agricultural systems. As a result, integrated systems like Integrated Crop-Livestock-

Forestry (ICLF) are emerging as alternatives, offering proven benefits, such as increased carbon (C) stock in the soil. In December 2018, an ICLF system experiment was established at Fazenda Trijunção, BA, on sandy soil (110 g kg⁻¹ clay). The system included crops for two years followed by *Urochloa brizantha* cv. Piata and eucalyptus. To evaluate the carbon stock in the soil, sampling was conducted in April 2022 (3.5 years after the ICLF implementation). Soil samples were collected in two mini-trenches: one near the eucalyptus trees and another one in the center between two groves. The experiment consisted of 15 plots, one hectare each one, in a total of 15-hectare experimental area. Undisturbed samples were taken from each of the three mini-trench walls at depths of 0–10, 10–20, and 20–30 cm for analysis of bulk density and total C content. The results showed a higher C stock in the sandy soil under the ICLF system, particularly in the row position closest to the eucalyptus trees, when compared to the native Cerrado soil. Within the ICLF system, there was no significant difference in C stock between the positions in the center and the row. The study concluded that implementing the ICLF system enhances C storage in sandy soils compared to native Cerrado, largely due to the multiple benefits of this integrated system, especially near the eucalyptus trees.

Index terms: integrated systems, low carbon agriculture.

Introdução

O modo com que o ser humano realiza diferentes atividades interfere no ambiente que o cerca. Um exemplo disso é a intensificação do potencial de aquecimento global da atmosfera, a qual tem sido causada pelas emissões de gases de efeito estufa advindos de ações como o aumento do consumo de combustíveis fósseis e o mau uso da terra (Oliveira et al., 2018). No processo denominado “efeito estufa”, alguns gases possuem papel de destaque, como dióxido de carbono (CO₂) e óxido nitroso (N₂O), sendo o CO₂ responsável por mais da metade do aquecimento global (Oliveira et al., 2018).

No cenário da agricultura, observa-se que o preparo convencional do solo, com o revolvimento dele, estimula a perda de matéria orgânica (MO) e, conseqüentemente, sua acentuada oxidação (Troian et al., 2020). Isso ocasiona baixo estoque de carbono (C) no solo, o que se agrava nos solos arenosos, que apresentam baixa capacidade de proteção da MO pelo seu baixo teor de argila.

Outro processo que aumenta a emissão de gases de efeito estufa e prejudica o estoque de carbono no solo é a degradação das pastagens, ocasionada pelo baixo nível tecnológico implementado. Uma alternativa para reverter esse quadro é a intensificação agropecuária, por meio dos sistemas integrados de produção. Há diversos arranjos envolvendo as plantas, como a Integração Lavoura-Pecuária-Floresta (ILPF), que integra os componentes vegetal, animal e arbóreo na mesma área (Balbino et al., 2011).

Os benefícios advindos desse sistema ocorrem pela complementaridade, diversificação e sinergia entre seus componentes e envolvem a melhoria dos atributos físicos, químicos e

biológicos do solo. Além disso, o sistema aumenta a produtividade; o bem-estar animal; a eficiência na utilização dos insumos; o efeito “poupa terra”; a neutralização da emissão de gases de efeito estufa; o sequestro de carbono; entre outros (Balbino et al., 2011; Costa et al., 2012; Reis et al., 2020).

Nesse contexto, este trabalho teve o objetivo de avaliar o estoque de carbono em solo arenoso sob sistema ILPF, em diferentes posições em relação aos renques de eucalipto, em comparação com o Cerrado nativo.

Material e métodos

A área em estudo está localizada na Fazenda Trijunção, município de Jaborandi, BA. O solo é classificado como Latossolo Amarelo Distrófico típico, textura arenosa (110 g kg⁻¹ de argila), e estava coberto com pastagem degradada de *U. brizantha* cv. Marandu. A vegetação original do local é de Cerrado “strictu sensu”. O clima da região é do tipo Aw, pela classificação de Köppen e Geiger, caracterizando-se como quente e seco, com chuvas concentradas no verão e temperatura média de 24 °C¹. A altitude local é de 933 m, e a precipitação média anual varia de 700 mm a 1.400 mm, com déficit hídrico pronunciado do final de abril a outubro.

O eucalipto foi plantado em 15 renques com 400 m de comprimento, em espaçamento de 2 m entre plantas e de 25 m entre renques, totalizando uma área de 15 ha. As culturas anuais foram cultivadas no meio dos renques de eucalipto, nas safras 2018/2019 (girassol, soja, feijão caupi, sorgo forrageiro (SS 318 e Volumax)) e 2019/2020 (sorgo forrageiro - BRS 658, BRS Ponta Negra, Capim sudão BRS Estribo e Volumax e milhetos - ADR 300 e ADR 6010) em consórcio com a *U. Brizantha* cv. Piatã. Entretanto, devido ao precário estabelecimento da pastagem de Piatã, houve necessidade de novo semeio da pastagem em novembro de 2020. As amostras de solo foram coletas em mini trincheiras

Para avaliação do estoque de carbono no solo, foram realizadas amostragens a partir abril de 2019, sendo apresentada neste trabalho a amostragem realizada em abril de 2022, ou seja, cerca de 3,5 anos após a implantação do sistema ILPF. Para as amostragens de solo, foram realizadas minitrincheiras próximas aos renques do eucalipto (Linha – ILPF-L) e no centro entre dois renques (Centro – ILPF-C), em três das 15 parcelas da área experimental. Foi coletada uma amostra indeformada de solo, em cada uma das três paredes da minitrincheira, com anel volumétrico (anel com 7 cm de altura) nas profundidades de 0 cm–10 cm; 10 cm–20 cm; e 20 cm–30 cm. Nessas amostras indeformadas, foram analisados a densidade do solo e o teor de carbono total (C por calcinação a 1.200 °C), necessários para cálculo de estoque de C no solo, sendo coletado um total de três amostras simples para cada profundidade em um hectare de área, para formar uma composta para cada 5 ha (área de 15 ha foi dividida em três blocos) (Teixeira et al., 2017). O estoque de carbono foi calculado conforme Urquiaga et al. (2016), tendo sido realizada a correção na camada subsuperficial (20 cm–30 cm).

Os resultados foram submetidos ao teste de médias ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2011).

¹ Disponível em: <https://pt.climate-data.org/americas-do-sul/brasil/bahia/jaborandi-312741/>

Resultados e discussão

De maneira geral, houve maior estoque de carbono no solo arenoso sob sistema ILPF, na posição mais próxima às árvores de eucalipto (Linha – L), em comparação com o estoque sob Cerrado nativo (Figura 1). Apenas na profundidade de 20 cm–30 cm não houve diferença entre os tratamentos (Figura 1). Já dentro do sistema ILPF, não houve diferença no estoque de C no solo considerando as posições no centro ou na linha (Figura 1).

O maior estoque de C próximo ao renque do eucalipto pode ser explicado pela contribuição das árvores, com relação às suas raízes, formação de microclima que favorece a ciclagem de nutrientes, atividade biológica, aporte de material vegetal, etc.

O estoque de C no ILPF na camada de 0 cm–20 cm foi de 9,4 Mg ha⁻¹ (média das duas posições) e, segundo Almeida e Alves (2020), é classificado como baixo para a classe dos solos arenosos. Entretanto, cabe ressaltar que a avaliação foi realizada com apenas cerca de 3,5 anos de implantação do sistema ILPF, e o acúmulo de C no solo demanda tempo, principalmente considerando-se os solos arenosos.

Trabalho de Ferreira et al. (2022) conduzido em Luís Eduardo Magalhães, BA, em solo arenoso, bastante semelhante ao deste trabalho, mas com avaliação do estoque de C no solo com diferentes manejos de culturas anuais, algodão, soja e milho, por cinco anos, mostrou valores de 9,3 Mg ha⁻¹ e 20,1 Mg ha⁻¹ de C acumulado na área de Cerrado, nas camadas de 0 cm–20 e 0 cm–40 cm de solo, respectivamente, e uma variação de 16,2 Mg ha⁻¹ a 18,7 Mg ha⁻¹ na camada de 0 cm–20 cm, envolvendo as culturas anuais em sistema plantio direto, e uma variação de 31,7 Mg ha⁻¹ a 37,5 Mg ha⁻¹ considerando a camada de 0 cm–40 cm. Observa-se que o valor do estoque de C do Cerrado na camada de 0 cm–20 cm em Ferreira et al. (2022) está próximo ao obtido neste trabalho (6,99 Mg ha⁻¹, camada de 0 cm–20 cm), enquanto os valores das culturas anuais estão acima em relação ao sistema ILPF deste trabalho (média das duas posições de 9,4 Mg ha⁻¹, 0 cm–20 cm).

Quanto às posições em relação aos renques de eucalipto, Assis et al. (2015) em trabalho com avaliação dos atributos físicos em sistemas de ILPF encontraram variação da qualidade física do solo em relação à posição de amostragem em referência à linha de árvores de eucalipto. Já em Viana et al. (2016) não foram observadas diferenças entre os arranjos de eucalipto e o local de amostragem para os teores de carbono e para as quantidades de carbono orgânico total.

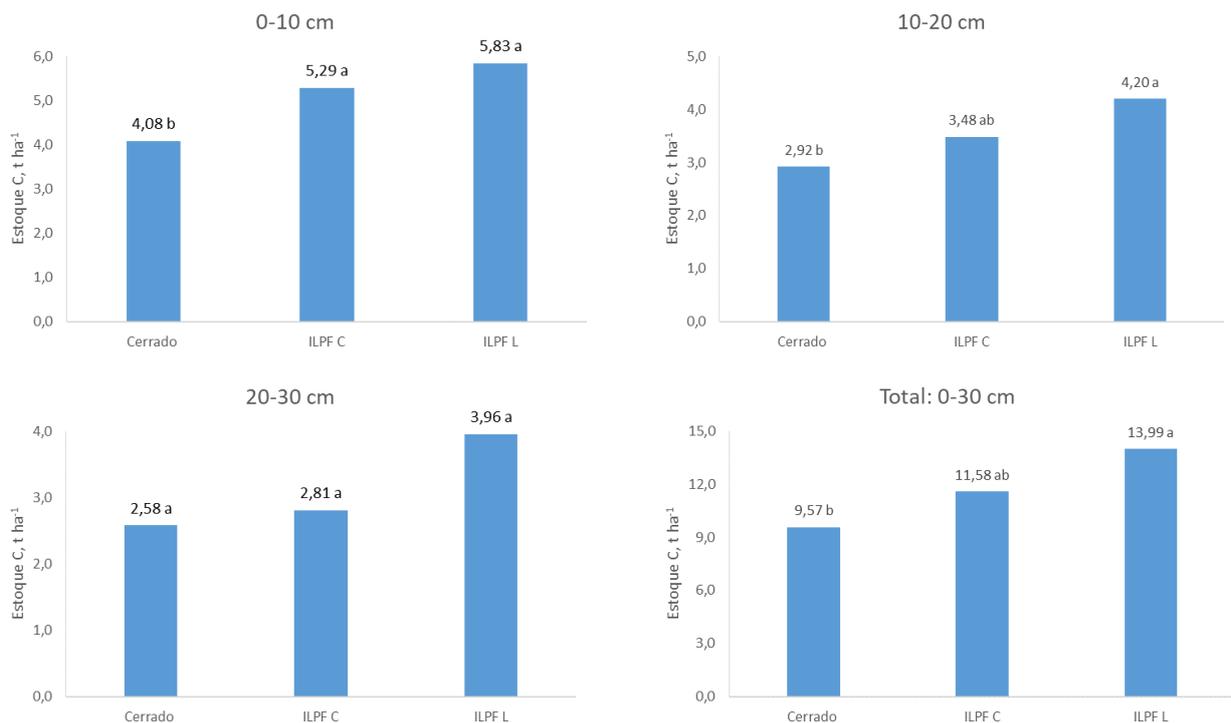


Figura 1. Estoque de carbono no sistema ILPF (centro-C e linha-L) e no Cerrado nativo, nas profundidades de 0 cm–10 cm, 10 cm–20 cm, 20 cm–30 cm e 0 cm–30 cm (total).

Observação: médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Conclusão

A implantação do sistema ILPF favorece o estoque de carbono em solo arenoso em comparação com a área de Cerrado nativo, pelos múltiplos benefícios advindos deste sistema, principalmente na posição próxima aos renques do eucalipto. Considerando apenas o sistema ILPF, o estoque de carbono independe da posição avaliada em relação aos renques de eucalipto.

Referências

ALMEIDA, R. G.; ALVES, F. V. (ed.). **Diretrizes técnicas para produção de carne com baixa emissão de carbono certificada em pastagens tropicais: Carne Baixo Carbono (CBC)**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2020. 36 p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 280).

ASSIS, P. C. R.; STONE, L. F.; MEDEIROS, J. C.; MADARI, B. E.; OLIVEIRA, J. M.; WRUCK, F. J. Atributos físicos do solo em sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 4, p. 309-316, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v19n4p309-316>.

BALBINO, L. C.; BARCELLOS, A. O.; STONE, L. F. (ed.). **Marco referencial integração lavoura-pecuária-floresta**. Brasília, DF: Embrapa, 2011. 130 p.

COSTA, F. P.; CEZAR, I. M.; MELO FILHO, G. A.; BUNGENSTAB, D. J. Custo-benefício dos sistemas de produção em integração. In: BUNGENSTAB, D. J. (ed.). **Sistemas de integração lavoura pecuária-floresta: a produção sustentável**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 209-216.

FERREIRA, A. C. B.; BOGIANI, J. C.; SOFIATTI, V.; BORIN, A. L. D. C.; PERINA, F. J.; FERREIRA, G. B.; SILVA, M. A. S.; MACHADO, P. L. O. A. Organic carbon stock changes and crop yield in a tropical sandy soil under rainfed grains-cotton farming systems in Bahia, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 52, e71219, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-40632022v5271219>.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>.

OLIVEIRA, I. R.; GONTIJO NETO, M. M.; NOBRE, M. M. Mudanças climáticas e a agricultura de baixa emissão de carbono. In: NOBRE, M. M.; OLIVEIRA, I. R. **Agricultura de Baixo Carbono: tecnologias e estratégias de implantação**. Brasília, DF: Embrapa, 2018. p. 10-32.

REIS, J.; KAMOI, M.; LATORRACA, D.; CHEN, R.; MICHETTI, M.; WRUCK, F.; RODRIGUES-FILHO, S. Assessing the economic viability of integrated crop-livestock systems in Mato Grosso, Brazil. **Renewable Agriculture and Food Systems**, v. 35, n. 6, p. 631-642, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1742170519000280>.

TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G. **Manual de métodos de análise de solo**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 574 p.

TROIAN, D.; ROSSET, J. S.; MARTINS, L. F. B. N.; OZÓRIO, J. M. B.; CASTILHO, S. C. P.; MARRA, L. M. Carbono orgânico e estoque de carbono do solo em diferentes sistemas de manejo. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 13, n. 4, p. 1447-1469, 2020. DOI: <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2020v13n4p1447-1469>.

URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; JANTALIA, C. P.; MADARI, B. E.; MACHADO, P. L. O. de A.; BODDEY, R. M. **Protocolo para avaliar o potencial de sistemas agrícolas no sequestro de C e acúmulo de N no solo**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2016. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 303).

VIANA, M. C. M.; FREIRE, F. M.; ALVARENGA, R. C.; QUEIROZ, D. S.; PAULA, M. H. C. de; REZENDE, I. F. Monitoramento do estoque de carbono no solo no sistema de integração lavoura-pecuária-floresta em área de cerrado de Minas Gerais. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 31., 2016, Bento Gonçalves, RS. **Milho e Sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar: anais**. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2016.

Impacto da inoculação e coinoculação de *Azospirillum* e *Bacillus* na taxa de colonização de fungos micorrizos em plantas de milho sob diferentes doses de fósforo

Carolina Ramos Campos⁽¹⁾, Victor Alef Rodrigues⁽²⁾ e Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁽³⁾

⁽¹⁾Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽²⁾ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei. ⁽³⁾ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Resumo - O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura muito importante na agricultura mundial, sendo o segundo cereal mais cultivado. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da inoculação e coinoculação de cepas dos gêneros *Azospirillum* e *Bacillus* na taxa de colonização inicial de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), em plantas de milho associadas a diferentes doses de fósforo (P). O ensaio foi realizado em casa de vegetação da Embrapa Milho e Sorgo. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial (7 x 3) x 4 repetições, sendo os tratamentos B0 (sem inoculantes); A1 (*Azospirillum* 1); A2 (*Azospirillum* 2); B119+B2084 (*Bacillus megaterium* + *B. subtilis*); A1 x B119+B2084 (A1 x *B. megaterium*+ *B. subtilis*); A2 x B119+B2084 (A2 x *B. megaterium*+ *B. subtilis*) e A1 x A2 x B119+B2084 (A1 x A2 x *B. megaterium* +*B. subtilis*), em três níveis de adubação fosfatada: supertriplo (TSP), sendo P0 (sem P), 50% TSP (50 kg P₂O₅ ha⁻¹) e 100% TSP (100 kg P₂O₅ ha⁻¹). O plantio foi realizado com cinco sementes por vaso, sendo que após 20 dias de germinação foram retiradas duas plantas de cada vaso, e foram coletadas as raízes finas, para avaliação da taxa de colonização micorrízica nativa. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados por meio do teste de Scott-Knott 5%. Os resultados indicaram que houve diferença estatisticamente significativa. Os tratamentos sem aplicação de fósforo apresentaram as maiores médias de colonização por FMA, enquanto as doses de P reduziram essa colonização. A coinoculação das cepas de *Azospirillum* e *Bacillus* favoreceu a colonização das raízes pelos FMAs, indicando benefícios para o desenvolvimento vegetal e a absorção de nutrientes.

Termos para indexação: inoculante, micorriza, adubação fosfatada.

Impact of inoculation and co-inoculation of *Azospirillum* and *Bacillus* on the colonization rate of mycorrhizal fungi in maize plants under different doses of phosphorus

Abstract - Maize (*Zea mays* L.) is a very important crop, being the second most cultivated cereal in the world. The objective of this work was to evaluate the impact of inoculation and co-inoculation of strains of the genera *Azospirillum* and *Bacillus* on the initial colonization rate of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in maize plants associated with different doses of phosphorus (P). The test was carried out in a greenhouse at Embrapa Milho e Sorgo. The experimental design was in randomized blocks, in a factorial scheme (7 x 3) x 4 replications.

The treatments were B0 (without inoculants); A1 (*Azospirillum* 1); A2 (*Azospirillum* 2); B119+B2084 (*Bacillus megaterium* + *B. subtilis*); A1 x B119+B2084 (A1 x *B. megaterium*+ *B. subtilis*); A2 x B119+B2084 (A2 x *B. megaterium*+ *B. subtilis*) and A1 x A2 x B119+B2084 (A1 x A2 x *B. megaterium* +*B. subtilis*), in three levels of phosphate fertilizer: super triple (TSP), being P0 (without P), 50% TSP (50 kg P₂O₅ ha⁻¹) and 100% TSP (100 kg P₂O₅ ha⁻¹). Planting was carried out with five seeds per pot; after 20 days of germination, two plants were removed from each pot, and the fine roots were collected to evaluate the rate of native mycorrhizal colonization. The data were subjected to analysis of variance and compared using the 5% Scott-Knott test. The results indicated that there was a statistically significant difference. Treatments without application of phosphorus showed the highest averages of AMF colonization, while P doses reduced this colonization. Co-inoculation of *Azospirillum* and *Bacillus* strains favored root colonization by AMF, indicating benefits for plant development and nutrient absorption.

Index terms: inoculant, mycorrhiza, phosphate fertilizer.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura muito importante na agricultura mundial, sendo o segundo cereal mais cultivado para consumo humano. Sua relevância é inegável, já que desempenha um papel fundamental na segurança alimentar de muitas populações ao redor do mundo (Monje, 2011). O notável sucesso dessa gramínea vem da capacidade de adaptação a diversas condições climáticas, aliada à sua alta produtividade e ao seu valor nutricional, além de ser uma matéria-prima essencial para múltiplos usos na indústria e na esfera socioeconômica (Schons, 2006).

O fósforo (P) é o segundo nutriente mais requerido pelas plantas e também o que mais limita a produção agrícola (Weil; Brady, 2017). Esse nutriente exerce papel importante no metabolismo vegetal, por participar de fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia (Buchanan et al., 2015). No desenvolvimento da cultura do milho, o P desempenha um papel de extrema importância, especialmente no período de florescimento, atingindo sua demanda máxima quando os grãos começam o enchimento (Vasconcellos et al., 2000).

Porém a disponibilidade de P no solo é limitada e, conseqüentemente, há necessidade de aplicação de altas doses desse nutriente via fertilizantes fosfatados (Coelho; Alves, 2003; Viruel et al., 2014). No entanto, esses fertilizantes são derivados de fosfato de rocha mineral, um recurso finito, além de ser de alto custo para o produtor (Gilbert et al., 2009; Fernández et al., 2012).

Entretanto, com o manejo inadequado dos solos e a utilização da adubação imprópria, torna-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias, como os inoculantes biológicos, contribuindo para o aumento de produtividade, complementando parte da adubação química e conseqüentemente reduzindo custos das lavouras. Esses inoculantes à base de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) fornecem

melhorias que vão desde as características para promover o crescimento da parte aérea e das raízes das plantas até a melhora da proteção enzimática e de condições de estresses bióticos e abióticos inerentes à atividade agrícola (Hungria et al., 2010; Florio et al., 2019; Aydinoglu et al., 2020; Porto et al., 2020).

Outro microrganismo de suma importância para as plantas são os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). As plantas, na tentativa de contornar barreiras buscando superar as limitações de fósforo no solo, estabelecem mecanismos capazes de aumentar a eficiência na absorção de P, por meio da produção de estruturas, como as hifas, longas e finas, que interagem com as raízes, aumentando assim a área de contato com o solo explorado (Moreira; Siqueira, 2006).

Nesse contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o impacto da inoculação e coinoculação de cepas dos gêneros *Azospirillum* e *Bacillus* na taxa de colonização inicial de FMAs, em plantas de milho associadas a diferentes doses de P.

Material e métodos

O experimento foi conduzido em vasos na casa de vegetação da Embrapa Milho e Sorgo, utilizando solo caracterizado como Latossolo Vermelho Distrófico típico, com as seguintes características químicas e físicas: pH H₂O = 5,2; Al = 0,4 cmolc dm⁻³; Ca = 2,5 cmolc dm⁻³ Mg = 0,24 cmolc dm⁻³; SB (soma de bases) = 11,84 cmolc dm⁻³; P = 2,2 mg dm⁻³; K = 30,3 mg dm⁻³; V (saturação de bases) = 23,2% e teor de argila = 74,0 dag kg⁻¹.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial (7 x 3) x 4 repetições, sendo os tratamentos B0 (sem inoculantes); A1 (*Azospirillum* 1); A2 (*Azospirillum* 2); B119+B2084 (*Bacillus megaterium* + *Bacillus subtilis*); A1 x B119+B2084 (*Azospirillum* 1 x *Bacillus megaterium*+*Bacillus subtilis*); A2 x B119+B2084 (*Azospirillum* 2 x *Bacillus megaterium*+*Bacillus subtilis*) e A1 x A2 x B119+B2084 (*Azospirillum* 1 x *Azospirillum* 2 x *Bacillus megaterium*+*Bacillus subtilis*), em 3 níveis de adubação fosfatada: supertriplo (TSP), sendo P0 (sem P), 50% TSP (50 kg P₂O₅ ha⁻¹) e 100% TSP (100 kg P₂O₅ ha⁻¹).

O plantio foi realizado com cinco sementes/vaso, sendo que após 20 dias de germinação foram retiradas duas plantas/vaso e coletadas as raízes finas, para avaliação da taxa de colonização micorrízica nativa.

Duas cepas de *Azospirillum* (A1 e A2) foram selecionadas da Coleção Multifuncional de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo, classificadas anteriormente como bactérias fixadoras de nitrogênio e capazes de promoverem o crescimento do milho em condições hidropônicas e/ou campo (Sousa et al., 2018).

As duas cepas de *Bacillus*, B119 (*Bacillus megaterium*) e B2084 (*B. Subtilis*), são bases de um inoculante líquido (produto comercial [registro comercial nº PR 000497-9.000045 no Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa)]).

Os tratamentos contendo essas cepas (B119 e B2084) foram aplicados na

concentração de 4×10^9 UFC mL⁻¹ na dose de 100 mL ha⁻¹ (recomendação do fabricante). Para o preparo do inoculante das cepas de *Azospirillum*, os microrganismos foram crescidos em caldo nutritivo TSB, por três dias, a 28 ± 2 °C, sob agitação constante de 120 rpm. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos, a 6.000 rpm e ressuspensas em solução salina [0,85% (m/v) NaCl]. As suspensões bacterianas foram ajustadas à absorbância igual a 1, em comprimento de onda de 540 nm, e foram aplicados na concentração de 4×10^9 UFC mL⁻¹ na dose de 150 mL ha⁻¹. Em seguida, foram adicionadas ao veículo (produto comercial Bioma Fix® em pó), na proporção de 30% (m/v) do total de inoculante líquido. O inoculante (bactéria + veículo) foi peletizado às sementes de milho.

Para a avaliação da colonização micorrízica nativa, as raízes finas foram lavadas em água corrente e emergidas em 45 mL de solução de KOH 10% e autoclavadas por 5 minutos. Em seguida, foram lavadas novamente e incubadas em uma solução de 45 mL de HCl a 1% por 60 minutos, sendo então adicionados 10 mL do corante azul de trypan a 0,05%. Elas foram depois levadas a banho-maria a 90 °C por 45 minutos. Após finalizar esse processo, retirou-se o excesso de corante, lavando-se as raízes em água deionizada. Em seguida, o material foi avaliado em lupa estereoscópica. A porcentagem de colonização micorrízica foi determinada em segmentos de raízes de aproximadamente 5 cm de comprimento colocados em placa quadriculada, sendo consideradas positivas raízes que apresentavam estruturas de fungos micorrízicos, sejam arbúsculos, hifas ou vesículas, e negativas aquelas com ausência dessas estruturas (Gionvannetti; Mosse, 1980; Gonçalves et al., 2016).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e, quando ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no software Sisvar 5.3 (Ferreira, 2011).

Resultados

Os resultados indicaram que houve diferença estatisticamente significativa. Ao analisar o efeito da inoculação e da coinoculação dentro de cada fonte de P, observou-se que não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos inoculados e o controle não inoculado dentro do nível 0% de P (sem adubação fosfatada) (Figura 2 A). Entretanto, houve diferenças significativas em relação ao controle (B0) nos tratamentos em que o milho foi inoculado somente com as duas estirpes de *Bacillus* (B119+B2084), e inoculado com o *Azospirillum* (A2), ambos com adubação de 50% (Figura 2 B).

Na adubação com 100%P, ocorreu colonização superior significativa em relação ao controle não inoculado (B0), para os tratamentos inoculado com as duas cepas de *Bacillus* (B119+B2084), *Azospirillum* (A1), *Azospirillum* (A2), e para a combinação (coinoculação) do *Azospirillum 2* com as duas cepas de *Bacillus* (*Azospirillum 2* x *Bacillus megaterium*+*Bacillus subtilis*) (Figura 2C)

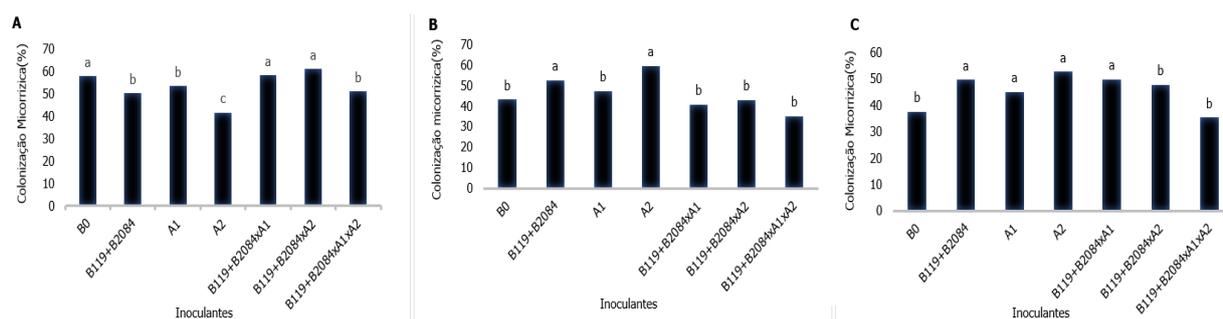


Figura 1: Taxa média da colonização micorrízica em plantas de milho inoculadas e coinoculadas com *Bacillus* e *Azospirillum*, sob diferentes níveis de fósforo, aos 20 dias após germinação (A); sem adubação (P0); (B) 50% TSP; (C) 100% TSP. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas indicam que os tratamentos não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Conclusão

O trabalho mostrou que a dose de P afeta a colonização das raízes por FMAs. De modo geral, os tratamentos sem aplicação de fósforo alcançaram as maiores médias de colonização por FMA, enquanto as doses (50% P e 100% P) reduziram essa colonização, como esperado.

A coinoculação das cepas de *Azospirillum* e *Bacillus* demonstrou um efeito favorável na colonização das raízes de milho pelos FMA, indicando um potencial benefício para o desenvolvimento vegetal, promovendo, assim, uma melhor absorção de nutrientes pelas plantas.

Esses resultados são relevantes para melhorar práticas agrícolas, especialmente na aplicação de fósforo e no uso de inoculantes microbianos, otimizando o desenvolvimento das culturas de forma sustentável, com benefícios para a produtividade agrícola.

Referências

- AYDINOGLU, F.; ILTAS, O.; AKKAYA, O. Inoculation of maize seeds with pseudomonas putida leads to enhanced seedling growth in combination with modified regulation of miRNAs and antioxidant enzymes. **Symbiosis**, v. 81, p. 271-285, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00703-x>.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. 6th ed. New York: John Wiley & Sons, 2015. 1.283 p.
- COELHO, A. M.; ALVES, V. M. C. Adubação fosfatada na cultura do milho. In: SIMPÓSIO SOBRE FÓSFORO NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2003, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Potafos, 2003.
- FERNÁNDEZ, L.; AGARAS, B.; ZALBA, P.; WALL, L. G.; VALVERDE, C. Pseudomonas spp. isolates with high phosphate-mobilizing potential and root colonization properties from agricultural bulk soils under no-till management. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, p. 763-773, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0665-6>.
- FERREIRA, D. F. **Sisvar-software**: versão 5.3. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2011.
- FLORIO, A.; BRÉFORT, C.; GERVAIX, J.; BÉRARD, A.; LE ROUX, X. The responses of NO₂⁻ and N₂O-reducing bacteria to maize inoculation by the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 depend on carbon availability and determine soil gross and net N₂O production. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 136, p.

107524, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107524>.

FERRAREZI, J. A.; CARVALHO-ESTRADA, P. de A.; BATISTA, B. D.; ANICETO, R. M.; TSCHOEKE, B. A. P.; ANDRADE, P. A. de M.; LOPES, B. de M.; BONATELLI, M. L.; ODISI, E. J.; AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria from the Brazilian Amazon on the bacterial community associated with maize in field. **Applied Soil Ecology**, v. 170, 104297, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104297>.

GILBERT, N. L.; GOLDBERG, M. S.; BECKERMAN, B.; BROOK, J. R.; JERRET, M. Assessing spatial variability of ambient nitrogen dioxide in Montréal, Canada, with a land-use regression model. **Air & Waste Management Association**, v. 55, n. 8, p. 1059-1063, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1080/10473289.2005.10464708>.

GIONVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infections in roots. **New Phytologist**, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>.

GONÇALVES, A. B. da S.; GOMES, E. A.; LANA, U. G. de P.; SOUSA, S. M. de; GUIMARÃES, C. T. Estabelecimento de metodologia para análise e quantificação da colonização por fungo micorrízico arbuscular em milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 31., 2016, Bento Gonçalves. **Milho e sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar: anais**. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2016.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1/2, p. 413-425, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.

LENOIR, I.; FONTAINE, J.; SAHRAOUI, A. L.-H. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: a review. *Phytochemistry*, v. 123, p. 4-15, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.002>.
NUTRI-FATOS: informação agrônômica sobre nutrientes para as culturas. **Arquivo do Agrônomo**, n. 10, mar. 1996. Disponível em: [https://www.npct.com.br/npctweb/npct.nsf/article/BRS-3146/\\$File/Nutrifatos.pdf](https://www.npct.com.br/npctweb/npct.nsf/article/BRS-3146/$File/Nutrifatos.pdf). Acesso em: 13 maio 2023.

MONJE, D. M. J. **Microbial ecology of endophytic bacteria in zea species as influenced by plant genotype, seed origin, and soil environment**. 2011. 230 p. Tese (Doutorado) - University of Guelph, Guelph.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006.

PORTO, L. S.; COSTA, R. R. G. F.; SILVA, F. V. da; ROCHA, A. F. de S. Micro-organismos eficazes e *Azospirillum brasilense*: efeitos sobre a produtividade do milho. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 9, n. 2, p. 11-21, 2020.

SCHONS, A. **Crescimento e desenvolvimento da mandioca e do milho em cultivo solteiro e consorciado**. 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

SOUSA, S. M. de; OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; ANDRADE, D. L.; CARVALHO, C. G. de; RIBEIRO, V. P.; PASTINA, M. M.; MARRIEL, I. E.; LANA, U. G. de P.; GOMES, E. A. **Cepas de *Bacillus* e *Azospirillum* aumentam o crescimento e a absorção de nutrientes em milho em condições hidropônicas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 31 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 184).

TARRAF, W.; RUTA, C.; TAGARELLI, A.; CILLIS, F. de; MASTRO, G. de. Influence of arbuscular mycorrhizae on plant growth, essential oil production and phosphorus uptake of *Salvia officinalis* L. **Journal Industrial**

Cropsand Products, v. 102, p. 144-153, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.010>.

TEKAYA, M.; MECHRI, B.; MBARKI, N.; CHEHEB, H.; HAMMAMI, M.; ATTIA, F. Arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* influences key physiological parameters of olive trees (*Olea europaea* L.) and mineral nutrient profile. **Photosynthetica**, v. 55, n. 2, p. 308-316, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0243-5>.

VASCONCELLOS, C. A.; PITTA, G. V. E.; FRANÇA, G. E. de; ALVES, V. M. C. Fósforo para o milho. **Cultivar Grandes Culturas**, n. 12, p. 8-9, 2000.

VIRUEL, E.; ERAZZÚ, L. E.; MARTINEZ CALSINA, L.; FERRERO, M. A.; LUCCA, M. E.; SENERIZ, F. Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 14, n. 4, p. 819-8931, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162014005000065>.

WEIL, R.; BRADY, N. **The nature and properties of soils**. 15th ed. New York: MacMillan, 2017.

Isolamento, caracterização e identificação molecular de microrganismos tolerantes aos estresses hídrico e salino

Jessica Marques Dionísio⁽¹⁾, Douglas Venâncio Alexandre da Silva⁽²⁾, Chainheny Gomes de Carvalho⁽³⁾, Ubiraci Gomes de Paula Lana⁽⁴⁾, Ariana Elisei Vilela⁽⁵⁾, Sylvia Moraes de Sousa Tinoco⁽⁶⁾, Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁽⁶⁾ e Eliane Aparecida Gomes⁽⁶⁾

⁽¹⁾Estudante do Curso de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽²⁾ Estudante de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas. ⁽³⁾ Bolsista DTI B do Convênio Embrapa/CNPq. ⁽⁴⁾ Analista da Embrapa Milho e Sorgo. ⁽⁵⁾ Bolsista de Pós-doutorado do Convênio Embrapa/CNPq. ⁽⁶⁾ Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

Resumo - O estresse hídrico causa perdas significativas no rendimento da produção agrícola em todo o mundo. As consequências climáticas imprevisíveis e óbvias do aquecimento global aumentam ainda mais a preocupação crescente com a disponibilidade limitada de água para a agricultura. O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal apresenta-se como uma alternativa promissora para aumentar a produção agrícola em condições desfavoráveis, principalmente pelo baixo custo e reduzido impacto ambiental. Este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar, avaliar a diversidade genética e identificar molecularmente microrganismos isolados de solos de diferentes ecossistemas brasileiros, com ênfase na resposta desses microrganismos aos estresses hídrico e salino. Um total de 718 cepas bacterianas termotolerantes foi isolado de amostras de solo e selecionado com base em características morfológicas e capacidade de crescimento em concentrações elevadas de sorbitol e NaCl, indicando sua capacidade de sobreviver e se adaptar às condições de estresses hídrico e salino. Entre essas amostras, 27 cepas do gênero *Priestia* ou *Bacillus*, identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, apresentaram maior potencial de tolerância à seca. Além disso, pela amplificação das sequências de DNA, utilizando os primers ERIC, foi possível observar padrões distintos de fragmentos amplificados, fornecendo uma visão abrangente sobre a variabilidade genética entre as bactérias isoladas. Os resultados deste estudo revelaram um potencial biotecnológico significativo dos microrganismos isolados a partir de amostras de solos de diferentes ecossistemas brasileiros.

Termos para Indexação: *Bacillus*, *Priestia*, seca, bactérias promotoras do crescimento de plantas

Isolation, characterization and molecular identification of tolerant microorganisms water and saline stress

Abstract - Water stress causes significant losses in agricultural production yields throughout the world. The unpredictable and obvious climate consequences of global warming increase growing concern about the limited availability of water for agriculture. The use of plant-growing promoting bacteria presents as an alternative to increase agricultural production under unfavorable conditions, mainly due to its low cost and reduced environmental impact. This work aimed to isolate, characterize, evaluate genetic diversity and molecularly identify microorganisms isolated from soils of different Brazilian ecosystems, with an emphasis on the response to these microorganisms to water and saline stress. A total of 718 bacterial strains thermotolerants were isolated from the soil samples

and selected based on morphological characteristics and growth capacity in high concentrations of sorbitol and NaCl, showing their ability to survive and adapt to water and saline stress conditions. Among these samples, 27 strains of the genus *Priestia* or *Bacillus*, identified by sequencing of the 16S rRNA gene, showed greater potential for drought tolerance. Furthermore, by amplification of DNA sequences using ERIC primers, it was possible to observe distinct patterns of the amplified fragments, providing comprehensive insight into the genetic variability between the isolated bacteria. The results of this study revealed a significant biotechnological potential of microorganisms isolated from samples of soils from different Brazilian ecosystems.

Index terms: *Bacillus*, *Priestia*, drought, plant growth-promoting bacteria

Introdução

O estresse hídrico é um desafio significativo enfrentado pela agricultura, não apenas no Brasil, mas também em várias regiões do mundo. No contexto nacional, esse desafio é particularmente acentuado nas regiões nordeste e norte de Minas Gerais, onde as condições climáticas são mais áridas e as precipitações pluviométricas são escassas (Silva; Andrade, 2003). Essas regiões apresentam altas temperaturas, chuvas escassas e mal distribuídas, com longos períodos de estiagem, o que causa impacto negativo nas plantas, diminuindo sua produtividade por desequilíbrios fisiológicos, nutricionais e hormonais, limitando o seu potencial produtivo (Santos; Carlesso, 1998).

Diante desse quadro, torna-se necessária a busca por soluções que possam minimizar os efeitos da seca nas culturas. Dentre as alternativas, o uso de insumos biológicos à base de microrganismos benéficos, como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), promovem melhorias no desenvolvimento das culturas sem danificar o meio ambiente (Andrade et al., 2019; Silva et al., 2020).

Uma das principais vantagens das BPCP é a redução do uso de produtos químicos e fertilizantes sintéticos. Esses microrganismos têm a capacidade de liberar substâncias, como hormônios de crescimento, enzimas e metabólitos, que estimulam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Dessa forma, eles podem aumentar a absorção de nutrientes presentes no solo pelas plantas, promovendo uma maior eficiência na utilização dos recursos disponíveis (Miransari, 2013). Essa interação satisfatória entre o BPCP e as plantas ocorre por meio de processos complexos, como a colonização das raízes pelas bactérias e a ativação de rotas metabólicas específicas. As BPCP podem secretar enzimas que auxiliam na solubilização de nutrientes insolúveis, como o fósforo (P), tornando-os mais disponíveis para as plantas (Fracasso et al., 2020). Esses microrganismos também podem auxiliar no controle de patógenos do solo, estimular a formação de agregados e melhorar a estrutura do solo, favorecendo a infiltração de água e a aeração das raízes. Dessa forma, as BPCP podem ajudar a reduzir a compactação do solo, garantindo a conservação dos recursos naturais e a preservação do meio ambiente (Scarsanella, 2022).

Além dos benefícios para as plantas e o solo, o uso das BPCP também pode resultar em ganhos tecnológicos para os agricultores. A redução do uso de fertilizantes sintéticos e pesticidas químicos reduz os custos de produção e melhora a qualidade das culturas, o que gera consequentemente maiores rendimentos e valorização dos produtos agrícolas.

Seguindo o princípio de que a microbiota do solo desempenha um papel fundamental na promoção do crescimento das plantas e na resistência ao estresse, a identificação e a seleção

de microrganismos com essas características tornam-se fonte promissora de insumos biológicos, despertando interesse na busca por soluções na agricultura.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo isolar, caracterizar e avaliar a diversidade genética e identificar molecularmente microrganismos isolados de solos de diferentes ecossistemas brasileiros, com ênfase na resposta desses microrganismos aos estresses hídrico e salino.

Material e métodos

As amostras de solos utilizadas pertencem à coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo e foram coletadas em diferentes regiões geográficas brasileiras, incluindo os biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal.

O processo de isolamento dos microrganismos iniciou-se com a pesagem de 0,5 g de solo, seguida da adição de 2,5 mL de solução salina (NaCl 0,85% m/v) e agitação constante por 24 horas, promovendo a suspensão dos microrganismos presentes no solo.

Para a realização do choque térmico, as amostras foram deixadas em repouso por 30 minutos para a decantação de resíduos sólidos. Em seguida, uma alíquota de 0,5 mL da amostra foi retirada, evitando a coleta da parte sedimentada, e transferida para microtubos estéreis. Essas amostras foram mantidas em banho-maria a 65 °C por 30 minutos. Após esse processo, foram resfriadas em gelo por 5 minutos.

Após o choque térmico, uma alíquota de 50 µL de cada amostra foi cuidadosamente depositada e espalhada, com o auxílio de uma alça de Drigalsk, em placas de Petri contendo meio LB (Luria Bertani) sólido. As placas foram incubadas a 45 °C por 24 horas. Ao final desse período, as colônias formadas foram avaliadas em relação às suas características morfológicas, incluindo tamanho, forma, cor e elevação.

Em seguida, as colônias selecionadas foram repicadas em tubos de 15 mL contendo 4 mL de meio LB líquido e incubadas a 28 °C por 24 horas sob agitação constante. Posteriormente, as bactérias foram cultivadas em meios LB sólido contendo NaCl 10% (m/v) ou sorbitol 405 g/L ou sorbitol 520 g/L, que simulam condições de alta salinidade e estresse hídrico, respectivamente. As bactérias selecionadas foram então criopreservadas em glicerol 25% (v/v) e armazenadas a -80 °C.

Diante da grande variabilidade encontrada, um grupo de 27 bactérias com diferentes origens, morfologias e diversidade genética foi selecionado para a extração de DNA, utilizando-se o kit "Wizard Genomic DNA Purification" (Promega, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A análise da diversidade genética das bactérias isoladas foi realizada por meio da metodologia ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) utilizando os primers ERIC 1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3' e ERIC F- 5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'. As amostras foram amplificadas em um volume de 20 µL contendo 1 x tampão de reação (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,4), 1,5 mM de MgCl₂, 0,5mM de dNTP, 50 ng de DNA, 0,2 µM de cada primer e 1 U de enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA). As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial 94 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 48 °C por 1 min, 65 °C por 5 min, seguidos pela extensão final de 65 °C por 16 min. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com gel red (Biotium Inx., EUA). Para o sequenciamento de DNA, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e os ciclos de amplificação foram preparados de acordo com Abreu et al. (2017) utilizando-se os primers 8F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Turner et al., 1999) e 1492R (5'

TACGYTACCTTGTTACGACT-3') (Lane, 1991).

As reações de PCR foram purificadas com o kit ExoSap IT (Affymetrix, EUA) e sequenciadas utilizando-se o kit "Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing" (ThermoFisher, EUA) com os primers 8F, 1492R, 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') (Turner et al., 1999) e 902R (5'-GTCAATTCITTTGAGTTTYARYC-3') (Hodkinson; Lutzoni, 2009), de acordo com as recomendações dos fabricantes. As amostras foram purificadas e injetadas no sequenciador de DNA 3500XL Genetic Analyzer (Hitachi, Japão). Para análise das sequências, foi utilizado o software Sequencher 5.4 (Gene Codes Corporation, EUA). As sequências foram submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos com o banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio da ferramenta BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) (Altschul et al., 1997).

Resultados e discussão

Foram isoladas e preservadas 718 bactérias para análises subsequentes. Ao se avaliar as colônias bacterianas formadas após o cultivo em meio sólido, observou-se uma variedade de características morfológicas entre as diferentes colônias. As colônias apresentaram uma ampla gama de tamanhos, formas e cores. Foram observadas colônias pequenas, grandes e difusas, circulares, irregulares e filamentosas. Além disso, a cor das colônias variou consideravelmente, com tonalidades desde branco, creme e amarelo até tons mais escuros (Figura 1).

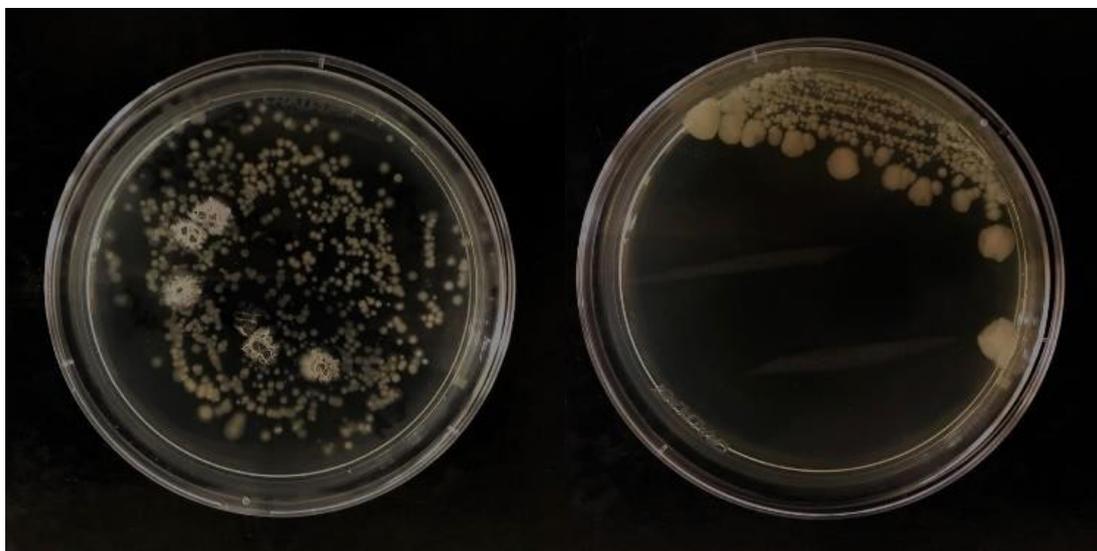


Figura 1. Caracterização morfológica de cepas bacterianas isoladas de amostras de solo.

Dentre essas bactérias, foram identificadas 89 colônias que cresceram em concentrações elevadas de NaCl e sorbitol, indicando sua capacidade de sobreviver e se adaptar às condições de estresses hídrico e salino.

Ao analisar a amplificação das sequências utilizando o primers ERIC, foi possível observar padrões distintos de fragmentos amplificados, fornecendo uma visão abrangente sobre a variabilidade genética entre as bactérias isoladas (Figura 2).

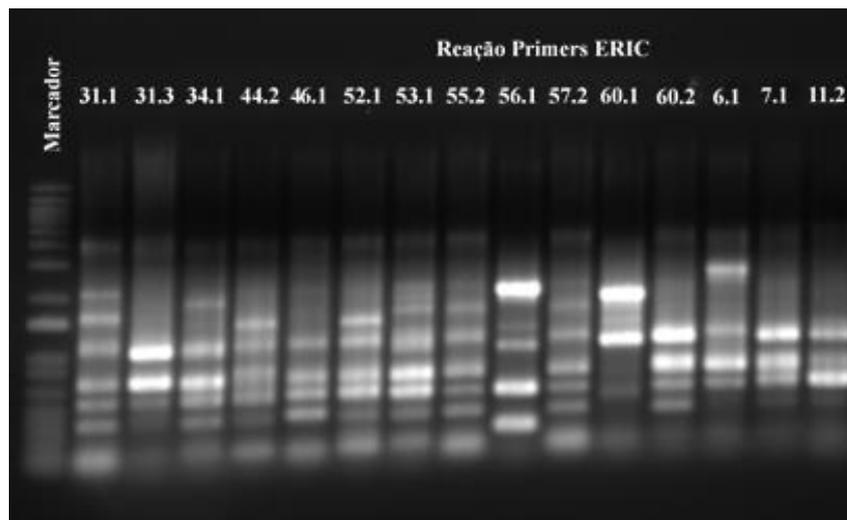


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por ERIC-PCR para análise da diversidade genética bacteriana. Os números indicam a identificação dos isolados. A partir dos resultados obtidos por ERIC-PCR, bem como da análise da diversidade morfológica e de origem das bactérias selecionadas, um grupo de 27 estirpes foi escolhido para o sequenciamento do gene 16S rRNA. Esses primers foram selecionados estrategicamente para amplificar regiões específicas do gene 16S rRNA, que são altamente conservados em todas as células bacterianas, mas também contêm regiões variáveis que permitem a diferenciação entre gêneros ou espécies. Os resultados dessas análises foram compilados e estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Identificação molecular baseada no sequenciamento do gene 16S rDNA de isolados bacterianos capazes de

Isolado	Local de coleta	Identificação Molecular
3.2	Caatinga, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
6.1	Mombaça, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
7.1	São Miguel, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
9.1	Quiterianópolis, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
9.2	Quiterianópolis, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
9.4	Quiterianópolis, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
10.2	Piquet Carneiro, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
11.1	Arneiroz, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
11.2	Arneiroz, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
17.1	Piranji, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
17.2	Piranji, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
19.2	Aceguá, RS	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
23.1	Rio Verde, GO	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
23.2	Rio Verde, GO	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
24.1	Rio Verde, GO	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
31.1	Ipiaçu, MG	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
31.3	Ipiaçu, MG	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
34.1	Ipiaçu, MG	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>
44.2	Antonina de Norte, CE	<i>Priestia megaterium</i>
46.1	Sertão, CE	<i>Priestia megaterium</i>
52.1	Amazônia	<i>Bacillus safensis</i>
53.1	Amazônia	<i>Bacillus</i> sp.
55.2	Caatinga, CE	<i>Bacillus licheniformis</i>
56.1	Caatinga, CE	<i>Priestia megaterium</i>
57.2	Caatinga, CE	<i>Priestia aryabhatai</i>
60.1	Caatinga, CE	<i>Priestia megaterium</i>
60.2	Caatinga, CE	<i>Priestia megaterium</i>

crescer em meio de cultura LB sólido contendo NaCl 10% (m/v) e sorbitol 520 g/L.

A capacidade dessas bactérias de crescer em concentrações elevadas de NaCl e sorbitol sugere que elas possuem mecanismos adaptativos para enfrentar condições adversas. Esses mecanismos podem incluir a produção de compostos compatíveis com a tolerância ao estresse, a regulação do balanço osmótico e a ativação de rotas metabólicas específicas que permitem a sobrevivência e o crescimento nessas condições desfavoráveis (Embrapa, 2017). Esses microrganismos podem ter implicações significativas para a agricultura, especialmente quando utilizados em regiões propensas à escassez de água e à elevada salinidade do solo.

A utilização desses microrganismos promissores como agentes promotores de crescimento em culturas agrícolas pode ser uma estratégia viável para aumentar a tolerância das plantas ao estresse hídrico e salino (Espínola, 2020). As BPCP têm sido estudadas pela capacidade de estimular o crescimento das plantas, aumentar a absorção de nutrientes, melhorar a tolerância ao estresse e proteger as plantas contra patógenos (Rezende et al., 2021). Nesse contexto, as cepas selecionadas neste estudo podem ser candidatas potenciais para futuros testes de inoculação de sementes, visando melhorar o rendimento das culturas em condições de estresses hídrico e salino. No entanto, é necessário destacar que os resultados obtidos neste estudo representam uma etapa inicial de investigação. Ainda são necessárias pesquisas adicionais para melhor entendimento dos mecanismos associados à promoção de crescimento de plantas dessas estirpes. É fundamental compreender como elas interagem com as plantas hospedeiras, como afetam o equilíbrio do solo e como podem ser aplicadas de maneira eficiente na agricultura.

Conclusão

Todos os isolados obtidos foram do gênero *Priestia* ou *Bacillus*, indicando que a metodologia utilizada no isolamento foi eficiente na seleção de microrganismos que produzem esporos. Os resultados deste estudo revelaram um potencial significativo biotecnológico dos microrganismos isolados a partir de amostras de solos de diferentes ecossistemas brasileiros. A capacidade dessas bactérias de tolerar os estresses hídrico e salino indica que podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias de manejo na agricultura. A aplicação desses microrganismos como agentes promotores de crescimento pode oferecer soluções inovadoras para aumentar a produtividade das culturas e enfrentar os desafios impostos pelas condições adversas do ambiente agrícola.

Agradecimentos

À Embrapa e ao CNPq.

Referências

ABREU, C. S.; FIGUEIREDO, J. E.; OLIVEIRA, C. A.; SANTOS, V. L. dos; GOMES, E. A.; RIBEIRO, V. P.; BARROS, B. A.; LANA, U. G. P.; MARRIEL, I. E. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, gmr16019294, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16019294>.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.

J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.

ANDRADE, F. M. de; PEREIRA T. de A.; SOUZA, T. P.; GUIMARÃES, P. H. S.; MARTINS, A. D.; SCHWAN, R. F.; PASQUAL, M.; DÓRIA, J. Beneficial effects of inoculation of growth- promoting bacteria in strawberry. **Microbiological Research**, v. 223/225, p. 120-128, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.04.005>.

EMBRAPA. **Scientists use bacteria to help plants resist droughts**. Brasília, DF, 23 maio 2017. Notícia. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/22885691/cientistas-usam-bacterias-para-ajudar-plantas-a-resistir-a-seca>. Acesso em: 31 jul. 2023.

ESPÍNOLA, M. V. P. C. **Identificação e caracterização regulatória de bactérias termofílicas e termotolerantes isoladas do solo da caatinga do cariri paraibano**. 2020. 93 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/17549>. Acesso em: 13 jul. 2023.

FRACASSO, A.; TELÒ, L.; LANFRANCO, L.; BONFANTE, P.; AMADUCCI, S. Physiological beneficial effect of *Rhizopagus intraradices* inoculation on tomato plant yield under water deficit conditions. **Agronomy**, v. 10, n. 1, article 71, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy10010071>.

HODKINSON, B. P.; LUTZONI, F. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. **Symbiosis**, v. 49, n. 3, p. 163-180, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13199-009-0049-3>.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (ed.). **Nucleic acids techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley, 1991. p. 115- 148.

MIRANSARI, M. Soil microbes and the availability of soil nutrients. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 3075-3084, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1338-2>.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **GenBank**. Disponível em: <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em: 13 jul. 2023.

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. L. de M.; FARIA, D. R.; FILIPPI, M. C. C. de; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, e50810212725, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12725>.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v2n3p287-294>.

SCARSANELLA, J. D. A. **Microrganismos promotores do crescimento vegetal em *Paspalum notatum* Flügge cultivado em solo construído para reabilitação de áreas degradadas pela mineração de carvão**. 2022. 66 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/234713>. Acesso em: 14 jul. 2023.

SILVA, H. P.; ANDRADE, S. M. Brasil um país de terras secas: problemática, dimensão e alternativas de tecnologias apropriadas para o semiárido. In: CIRELLI, A. F.; ABRAHAM, E. (ed.). **El agua en Iberoamérica: aspectos de la problemática de las tierras secas**. Buenos Aires: CYTED, 2003. p. 55-64.

SILVA, M. A.; NASCENTE, A. S.; FILIPPI, M. C. C. D.; LANNA, A. C.; SILVA, G. B. D.; SILVA, J. F. A. E. Individual and combined growth-promoting microorganisms affect biomass production, gas exchange and nutrient content in soybean plants. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 3, p. 619-632, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n305rc>.

Isolamento, identificação e avaliação do potencial biotecnológico de fungos associados a esporos de fungos micorrízicos arbusculares⁽¹⁾

Jéssica Campelo Martins de Moura⁽²⁾, Mário Sergius de Sousa e Silva⁽³⁾, Ana Carolina Binder D'Amato Horta⁽⁴⁾ e Francisco Adriano de Souza⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Trabalho financiado pelo CNPq/Embrapa SEG. ⁽²⁾ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽³⁾ Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas, Bolsista PIBIC (ou BIC JR) do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ FAPED. ⁽⁴⁾ Bacharela em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Sete Lagoas, Bolsista do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽⁵⁾ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

Resumo - Fungos micorrízicos arbusculares (MA) estabelecem simbiose com plantas atuando como extensões de seus sistemas radiculares. O micélio e os esporos dos fungos MA são nicho para diversos microrganismos, porém pouco se sabe sobre esses microrganismos, em especial, fungos que ocorrem em esporos de fungos MA. Neste sentido, este estudo teve por objetivo isolar, identificar e avaliar o potencial biotecnológico de fungos associados a esporos de fungos MA. Fungos filamentosos foram isolados de esporos desinfestados de fungos MA. Foram obtidas 44 estirpes, 16 foram identificadas por homologia com sequências depositadas no GenBank. O gênero mais frequente foi *Fusarium* (5), seguido de *Talaromyces* (4), *Aspergillus* (2), *Serendipita* (2), *Trichoderma* (2) e *Clonostachys* (1). *Serendipita*, foram os únicos Basidiomycota, Agaricomycetes associados aos esporos de fungos MA avaliados. Dentre os gêneros encontrados temos fungos simbiotes de plantas (*Serendipita*), micofagos (*Trichoderma*), entomopatogênicos (*Clonostachys*) dentre outros com potencial ação fitopatogênica como *Fusarium* e *Aspergillus*. Nosso estudo demonstrou que esporos de fungos MA apresentam um micóbio associada diversa em termos de riqueza biológica e funcional. Pesquisas futuras são necessárias para avaliar o efeito sinérgico ou antagonista desses fungos em relação aos fungos MA.

Termos para indexação: Glomeromycota, esporos, *Fusarium*, *Talaromyces*, *Aspergillus*, *Serendipita*, *Trichoderma*, *Clonostachys*, diversidade, micorizas.

Isolation, identification and evaluation of the biotechnological potential of fungi associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungi⁽¹⁾

Abstract - Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi establish symbiosis with plants acting as extensions of their root systems. The mycelium and spores of AM fungi are a niche for several microorganisms, but little is known about these microorganisms, especially fungi that occur in AM fungal spores. In this sense, this study aimed to isolate, identify and evaluate the biotechnological potential of fungi associated with AM fungal spores. Filamentous fungi were isolated from disinfected spores of AM fungi. A total of 44 strains were obtained, 16 of which were identified by homology with sequences deposited in GenBank. The most frequent genus was *Fusarium* (5), followed by *Talaromyces* (4), *Aspergillus* (2), *Serendipita* (2), *Trichoderma* (2) and *Clonostachys* (1). *Serendipita* were the only Basidiomycota - Agaricomycetes associated with AM fungal spores evaluated. Among the genera found, we have plant symbiotic fungi (*Serendipita*), mycophagous (*Trichoderma*) and, entomopathogenic fungi

(*Clonostachys*) among others with potential phytopathogenic action such as *Fusarium* and *Aspergillus*. Our study demonstrated that spores of AM fungi present a diverse associated mycota in terms of biological and functional richness. Future research is needed to evaluate the synergistic or antagonistic effect of these fungi in relation to AM fungi.

Index terms: Glomeromycota, spores, *Fusarium*, *Talaromyces*, *Aspergillus*, *Serendipita*, *Trichoderma*, *Clonostachys*, diversity, mycorrhiza.

Introdução

Fungos micorrízicos arbusculares (MA), pertencentes ao filo Glomeromycota, são conhecidos por promover o crescimento de plantas (Azcón-Aguilar; Barea 1997; Baum et al., 2015; Khan et al., 2022). O micélio micorrízico estabelece simbiose com as raízes de plantas e é capaz de explorar os recursos do solo (água e nutrientes), com grande eficiência, e entregá-los as plantas em troca de açúcares e lipídios (Ferrol et al., 2019).

No solo os fungos MA interconectam diferentes plantas e interagem com diversos microrganismos (Turrini et al., 2018; Abdellatif et al., 2019). Identificar e avaliar o papel da microbiota associada a esses fungos é fundamental para entender sua ecologia e desenvolver tecnologias capazes de amplificar os benefícios da simbiose micorrízica.

Este estudo teve por objetivo isolar, identificar e avaliar o potencial biotecnológico de fungos associados a esporos de fungos MA.

Material e métodos

Culturas mono específicas de fungos MA mantidas em sistema de vasos de cultivo e vasos armadilha, foram utilizadas neste estudo. Os esporos foram extraídos de 50 mL de amostras do substrato dos vasos por peneiramento úmido (Gerdemann; Nicolson, 1963) e centrifugações em água e em solução açúcar à 50% (Jenkins, 1964). Posteriormente os esporos foram limpos em banho de ultrason por 4 vezes de 20 segundos cada ciclo. Seguido de desinfestação superficial conforme descrito por de Souza e Berbara (1999). Após desinfestação, os esporos foram distribuídos asépticamente em placas de Petri contendo meio MSR (Strullu; Romand, 1987) e incubados à 25 a 29 oC no escuro.

O crescimento de fungos filamentosos foi monitorado e quando presentes o micélio desses fungos foi transferido para novas placas de Petri contendo meio batata glucose agar comercial (Sigma-Aldrich 70139). Após isolamento em cultura pura, mono específica, os fungos foram crescidos em meio MSR líquido suplementado com extrato de levedura. A biomassa obtida após 10 dias de cultivo foi colhida e utilizada para extração de ácidos dexoxirribonucleicos segundo de Souza et al. (2018).

O gene ribossomal nuclear (rRNA) foi amplificado e sequenciado com os primers ITS1F (Gardes; Bruns, 1993) e NDL22 (Van Tuinen et al., 1998) que amplificam a região ITS e as regiões D1 e D2 do 25S. Em seguida foram obtidas sequencias consenso e realizada análise BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch). A avaliação do potencial biotecnológico/função do fungo foi obtido por revisão bibliográfica com buscas na Web of Science (<https://www.webofscience.com/wos/woscc/basic-search>) utilizando-se o gênero ou espécie do fungo indentificado pela ferramenta BLASTN.

Resultados e discussão

Das 44 estirpes isoladas, 16 foram identificadas por homologia com sequências depositadas no GenBank através por análise BLASTN (Tabela 2). O gênero mais frequente foi *Fusarium* (5), seguido de *Talaromyces* (4), *Aspergillus* (2), *Serendipita* (2), *Trichoderma* (2) *Clonostachys* (1). *Serendipita*, foram os únicos Basidiomycota, Agaricomycetes associados aos esporos de fungos MA avaliados. Todas as demais espécies encontradas pertencem ao Filo Ascomycota. Sendo a maioria pertencentes a ordem *Hypocreales* exceto *Aspergillus* – ordem *Eurotiales*.

Dentre os gêneros encontrados *Serendipita* são considerados fungos micorrízicos da ordem Sebaciales (Weiß et al., 2016) e utilizados como bioinsumos para diversas espécies de plantas (Franken, 2012). Espécies de *Trichoderma* são utilizadas comercialmente como agentes de controle biológico de doenças fúngicas e como promotores do crescimento de plantas dentre outras aplicações biotecnológicas (Tyśkiewicz et al., 2022). O gênero *Clonostachys* apresenta fungos com ação endofítica, micofago e entomopatogênica (Kaewchai et al., 2009; Anwar et al., 2018; Mascarin et al., 2022). *Talaromyces* tem potencial para produção de antibióticos e pigmentos (Santos et al., 2015; Parul et al., 2020). Diversas espécies de *Aspergillus* tem potencial biotecnológico principalmente para a produção de enzimas e ácidos orgânicos (ácido cítrico, glucônico e gálico) (Li et al., 2009; Nascimento et al., 2021; Bhunjun et al., 2024), porém algumas espécies causam doenças em seres humanos (<https://pt.wikipedia.org/wiki/Aspergillus>). *Fusarium* são frequentemente associados às doenças em plantas e produzem micotoxinas (<https://pt.wikipedia.org/wiki/Fusarium>).

Tabela 1. Estirpes de fungos isoladas de esporos de fungos micorrízicos arbusculares e sua identificação ao nível de gênero por BlastN e seu potencial biotecnológico.

Estirpe	Gênero	BlastN	Similaridade (%)	Acesso	Potencial
2	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i>	97,04	KF918581	Patógeno de plantas (Arie 2019)
3	<i>Talaromyces</i>	<i>T. purpureogenus</i>	98,31	MH877076	Produção de Pigmentos (Parul et al. 2020)
4	<i>Clonostachys</i>	<i>C. rosea</i>	100	KX958035	Controle Biológico ; (Anwar et al. 2018, Kaewchai et al. 2009; Mascarin et al. 2022)
5	<i>Talaromyces</i>	<i>T. purpureogenus</i>	96,7	MH877076	Produção de Pigmentos (Parul et al. 2020)
7	<i>Aspergillus</i>	<i>A. pseudodeflectus</i>	97,6	OL711759	Produção de ácidos orgânicos, fitase (Li et al. 2009; Nascimento et al. 2021)
9	<i>Talaromyces</i>	<i>T. purpureogenus</i>	97,6	OQ550089	Produção de Pigmentos (Parul et al. 2020)
10	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i>	97,6	MH055400	Patógeno de plantas
11	<i>Serendipita</i>	<i>Serendipita sp.</i>	99,51	KC176327	Micorrizas (Franken 2012)
12	<i>Trichoderma</i>	<i>T. asperillum</i>	99,06	KR856222	Controle Biológico (Tyśkiewicz et al. 2022)
13	<i>Fusarium</i>	<i>F. verticillioides</i>	97,14		Patógeno de plantas
32	<i>Serendipita</i>	<i>Serendipita sp.</i>	99,51	KC176327	Micorrizas (Franken 2012)
34	<i>Trichoderma</i>	<i>T. harzianum</i>	97,27	KR856210	Controle Biológico (Tyśkiewicz et al. 2022)
35	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium sp.</i>	95,38	GU170637	Patógeno de plantas (Arie 2019)
37	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	92,13	OP237480	Produção de ácidos orgânicos, fitase (Li et al. 2009; Nascimento et al. 2021)
38	<i>Talaromyces</i>	<i>T. purpureogenus</i>	92,5	LT558946	Produção de Pigmentos (Parul et al. 2020)

Conclusão

Esporos de fungos MA apresentam um micota associada diversa em termos de riqueza biológica e funcional. No entanto, pesquisas futuras são necessárias para avaliar o efeito sinérgico ou antagonista desses fungos em relação aos fungos MA e sua contribuição para o desenvolvimento de plantas.

Referências

- ABDELLATIF, L.; LOKURUGE, P.; HAMEL, C. Axenic growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* and growth stimulation by coculture with plant growth-promoting rhizobacteria. **Mycorrhiza**, v. 29, p. 591-598, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00924-z>.
- ARIE, T. Fusarium diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. **Journal of Pesticide Science**, v. 25, n. 4, p. 275-281, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1584/jpestics.J19-03>.
- ANWAR, W.; ALI, S.; NAWAZ, K.; IFTIKHAR, S.; JAVED, M. A.; HASHEM, A.; ABD-ALLAH, E. F.; AKHTER, A. Entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* as a biocontrol agent against whitefly (*Bemisia tabaci*). **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 8, p. 750-760, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1487030>.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, v. 68, p. 1-24, 1997.
- BAUM, C.; EL-TOHAMY, W.; GRUDA, N. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: a review. **Scientia Horticulturae**, v. 187, p. 131- 141, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.002>.
- BHUNJUN, C. S.; CHEN, Y. J.; PHUKHAMSAKDA, C.; BOEKHOUT, T.; GROENEWALD, J. Z.; MCKENZIE, E. H. C.; FRANCISCO, E. C.; FRISVAD, J. C.; GROENEWALD, M.; HURDEAL, V. G.; LUANGSA-ARD, J.; PERRONE, G.; VISAGIE, C. M.; BAI, F. Y.; BŁASZKOWSKI, J.; BRAUN, U.; SOUZA, F. A. de; QUEIROZ, M. B. de; DUTTA, A. K. et al. What are the 100 most cited fungal genera? **Studies in Mycology**, v. 108, n. 1, p. 1-412, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3114/sim.2024.108.01>.
- FERROL, N.; AZCÓN-AGUILAR, C.; PÉREZ-TIENDA, J. Review: Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: an overview on the mechanisms involved. **Plant Science**, v. 280, p. 441-447, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.011>.
- FRANKEN, P. The plant strengthening root endophyte *Piriformospora indica*: Potential application and the biology behind. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1455-1464, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4506-1>.
- GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 235-244, 1963. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0).

- JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.
- KAEWCHAI, S.; SOYTONG, K.; HYDE, K. D. Mycofungicides and fungal biofertilizers. **Fungal Diversity**, v. 38, p. 25-50, 2009.
- KHAN, Y.; SHAH, S.; TIAN, H. The roles of arbuscular mycorrhizal fungi in influencing plant nutrients, photosynthesis, and metabolites of cereal crops: a review. **Agronomy**, v. 12, n. 9, 2191, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy12092191>.
- LI, G.; YANG, S.; LI, M.; QIAO, Y.; WANG, J. Functional analysis of an *Aspergillus ficuum* phytase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its root-specific, secretory expression in transgenic soybean plants. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 8, p. 1297-1303, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9992-6>.
- MASCARIN, G. M.; SILVA, A. V. R. da; SILVA, T. P. da; KOBORY, N. N. *Clonostachys rosea*: production by submerged culture and bioactivity against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bemisia tabaci*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 851000, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.851000>.
- NASCIMENTO, J. M. do; NETTO, J. A. F. V.; VALADARES, R. V.; MENDES, G. de O.; SILVA, I. R. da; VERGÜTZ, L.; COSTA, M. D. *Aspergillus niger* as a key to unlock fixed phosphorus in highly weathered soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 156, 108190, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108190>.
- PARUL; THIYAM, G.; DUFOSSÉ, L.; SHARMA, A. K. Characterization of *Talaromyces purpureogenus* strain F extrolites and development of production medium for extracellular pigments enriched with antioxidant properties. **Food and Bioprocess Processing**, v. 24, p. 143-158, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.012>.
- SANTOS, F. F. dos; NASCIMENTO, M. R. F. do; CARVALHO, D. B. de; LEÃO, M. H. M. da R.; AMARAL, P. F. F. Identificação e produção de pigmento por fungo *Talaromyces* sp. In: SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA, 5., 2015, Londrina. **Anais...** São Paulo: Blucher, 2015. p. 131-134. DOI: <https://doi.org/10.5151/biochem-vsimbteec-22061>.
- SOUZA, F. A. de; BERBARA, R. L. L. Ontogeny of *Glomus clarum*, in Ri T-DNA transformed roots. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 343-350, 1999.
- SOUZA, F. A. de; SILVA, I. R. da; BARRETO, M. B. B. de B.; OEHL, F.; GOTO, B. T.; MAIA, L. C. *Racocetra crispa* (Glomeromycotina) delimited by integrative evidence based on morphology, long continuous nuclear rDNA sequencing and phylogeny. **Mycological Progress**, v. 17, p. 999-1011, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1410-9>.
- STRULLU, D. G.; ROMAND, C. Culture axénique de vésicules isolées à partir d'endomycorhizes et ré-association in vitro à des racines de tomate. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 292, p. 153-156, 1987.
- TURRINI, A.; AVIO, L.; GIOVANNETTI, M.; AGNOLUCCI, M. Functional complementarity of arbuscular mycorrhizal fungi and associated microbiota: the challenge of translational research. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 10-13, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01407>.
- TYŚKIEWICZ, R.; NOWAK, A.; OZIMEK, E.; JAROSZUK-ŚCISEŁ, J. Trichoderma: the current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, 2329, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>.
- VAN TUINEN, D.; JACQUOT, E.; ZHAO, B.; GOLLOTTE, A.; GIANINAZZI-PEARSON, A.

Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25s rDNA-targeted nested PCR. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 7, p. 879-887, 1987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00410.x>.

WEIß, M.; WALLER, F.; ZUCCARO, A.; SELOSSE, M.-A. Sebaciales - one thousand and one interactions with land plants. **New Phytologist**, v. 211, p. 20-40, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.13977>.

Localização subcelular de proteínas baseada em co-localização com marcadores celulares⁽¹⁾

Maria Regina Fernandes Gonçalves⁽²⁾, Beatriz de Almeida Barros⁽³⁾, Vanessa de Almeida Barros⁽²⁾ e Jurandir Vieira de Magalhães⁽⁴⁾

⁽¹⁾Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig, ⁽²⁾Estudante do Curso de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa, ⁽³⁾Analista, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, ⁽⁴⁾ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

Resumo - Uma informação importante para a análise funcional de proteínas é a sua localização subcelular, e uma das técnicas mais utilizadas para esse fim é a expressão de uma proteína cuja localização deseja-se estabelecer, simultaneamente a uma ou mais proteínas de localização conhecida fusionadas a proteínas fluorescentes marcadoras. A expressão deste tipo de fusão traducional, em uma célula vegetal, pode ser observada por microscopia de fluorescência. O objetivo do presente trabalho é implementar a utilização de proteínas conhecidas como marcadoras de organelas para estudos de localização subcelular na Embrapa Milho e Sorgo. Para isso, células da epiderme de *Nicotiana benthamiana* foram infiltradas com culturas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 contendo um vetor binário que continha, individualmente, cada proteína marcadora fusionada a uma proteína fluorescente. A transformação transiente de *Nicotiana benthamiana* usando a estirpe da bactéria GV3101 mostrou-se eficiente para estudos de localização subcelular das proteínas. Pelos perfis de localização obtidos, considera-se que o conjunto de marcadores de organelas utilizado neste estudo é adequado para estudos de localização subcelular de proteínas de plantas.

Termos para Indexação: *Nicotiana benthamiana*, marcadores moleculares, transformação de plantas, genes repórteres, transformação transiente

Subcellular localization of proteins based on co-localization with cellular markers⁽¹⁾

Abstract - An important piece of information for the functional analysis of proteins is their subcellular localization. One of the most commonly used techniques for this purpose is the expression of a protein whose localization is to be established, simultaneously with one or more proteins of known localization fused to fluorescent marker proteins. The expression of this type of translational fusion in a plant cell can be observed by fluorescence microscopy. The objective of the present work is to implement the use of proteins known as organelle markers for subcellular localization studies at Embrapa Milho e Sorgo. For this purpose, epidermal cells of *Nicotiana benthamiana* were infiltrated with cultures of *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 harboring a binary vector that contained, individually, each marker protein fused to a fluorescent protein. The transient transformation of *Nicotiana benthamiana* using the GV3101 bacterial strain proved to be efficient for subcellular localization studies of

proteins. Based on the localization profiles obtained, it is considered that the set of organelle markers used in this study is suitable for subcellular localization studies of plant proteins.

Index terms: *Nicotiana benthamiana*, molecular markers, plant transformation, reporter gene, transient transformation

Introdução

Nicotiana benthamiana é uma das espécies de plantas modelo mais comumente usadas para pesquisas de interações planta-microrganismo, bem como em outras áreas da ciência vegetal (Goodin et al., 2008). As folhas grandes do tabaco e sua suscetibilidade a patógenos foram exploradas como uma forma de expressar proteínas de forma transiente, usando vírus manipulados ou por meio de infiltração de culturas da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (Chapman et al., 1992; Tang et al., 1996; Van Der Hoorn et al., 2000; Wagner et al., 2004; Ma et al., 2012). As células vegetais são sistemas altamente complexos, que realizam numerosas funções bioquímicas. Para permitir a execução coordenada e eficiente dessas funções, as células dos organismos eucarióticos são organizadas em subcompartimentos ou organelas, que são delimitadas por membranas biológicas. São eles: o núcleo celular, as mitocôndrias, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, o lisossomo, o peroxissomo, os plastídios (como os cloroplastos) e o vacúolo. Nestas organelas, ocorrem diferentes processos bioquímicos. Por exemplo, a fotossíntese, que ocorre nos cloroplastos; a síntese de lipídios e proteínas no retículo endoplasmático; a modificação, armazenamento e transporte de proteínas e lipídios no complexo de Golgi e a respiração mitocondrial. A capacidade bioquímica ou função de uma organela é definida pelas proteínas e ou enzimas que estão presentes nos diferentes compartimentos celulares (Lunn, 2007). Portanto, uma informação muito importante para inferências sobre função das proteínas é exatamente a sua localização subcelular. Uma das técnicas mais usadas para este fim é a expressão de uma dada proteína de interesse fusionada com uma proteína fluorescente, utilizando um sistema de transformação genética transiente.

A infiltração de culturas de *A. tumefaciens* em folhas de tabaco (Xu et al., 2011) permite uma síntese proteica considerável em poucos dias, sendo essa uma estratégia eficiente para estudos de localização subcelular de proteínas em plantas. Esta técnica, também denominada de *Agrobacterium tumefaciens transient expression* (ATTE), baseia-se na capacidade natural destas bactérias de transferirem uma parte do seu material genético para a planta hospedeira (Circelli et al., 2010; Wang et al., 2017).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi catalogar o perfil de localização de marcadores de organelas já conhecidos, bem como da proteína SbMATE, que confere tolerância ao alumínio em sorgo (Magalhães et al., 2004).

Material e métodos

A linhagem *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 foi transformada com o vetor pSoup (Hellens et al., 2005) por eletroporação (Ward et al., 1988), plaqueada em ágar com meio YEP (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 0,5%) suplementado com tetraciclina (12,5 mg. mL⁻¹) e rifampicina (50 mg. mL⁻¹), seguindo-

se cultivo a 28°C por 48 horas.

Foi realizado um pré-inóculo a partir de colônias isoladas de bactérias, que foram transferidas individualmente para erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml do meio YEP suplementado com antibióticos como descrito acima. Esses erlenmeyers foram mantidos sob agitação a 150 *rpm/overnight* a 28 °C, até que a cultura atingisse uma densidade ótica (*optical density*) OD600 de 0,5-1,0. Posteriormente, as culturas foram transferidas para tubos de 50 mL e centrifugadas a 5000 *rpm* por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas por quatro vezes em 40 mL de água estéril gelada. Logo após essa lavagem foi feita a ressuspensão das células em 2 mL de meio GYT (glicerol 10%, triptona 0,25%, extrato de levedura 0,125%), seguindo-se distribuição em alíquotas de 50 µL, que foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

A partir do estoque de células competentes de *A. tumefaciens* GV3101 contendo o plasmídeo *helper* (pSOUP) foram feitas as transformações por eletroporação da seguinte construção:

Marcador de retículo endoplasmático (RE), criado combinando o peptídeo sinal de AtWAK2 à sequência de retenção no RE, HDEL, fusionados à proteína ciano fluorescente (Cyan Fluorescent Protein, CFP) (Nelson et al., 2007);

Apartir do estoque de células competentes de *A. tumefaciens* GV3101 foram feitas as transformações por eletroporação das seguintes construções:

Proteína WWP1 (WW domain-containing protein) de *Arabidopsis thaliana*, AtWWP1, fusionada com mCherry, usada como marcador de núcleo.

Proteína FLS2 (FLAGELIN-SENSITIVE2), fusionada à mCherry, usada como marcador de membrana.

Proteína SbMATE fusionada com GFP (*green fluorescent protein*).

A partir das colônias de GV3101 transformadas com os plasmídeos de interesse, foram feitos inóculos das mesmas em 10 mL de meio YEP acrescido dos antibióticos rifampicina (50 mg.mL⁻¹) e canamicina (50 mg.mL⁻¹), seguindo-se o cultivo *overnight* a 28-30°C com agitação a 180 rpm. As colônias de GV3101 que continham o plasmídeo *helper* pSOUP foram crescidas como descrito anteriormente acrescentando-se tetraciclina (12,5 mg.mL⁻¹) ao meio. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas por 3 minutos a 5000 *rpm* e cada pellet foi ressuscitado em 1 mL de tampão de infiltração (acetoseringona 100 µM, MES 10 mM, MgCl₂ 10 mM) e centrifugado a 5.000 *rpm* por 3 min. Esse passo foi repetido por duas vezes. Após a última centrifugação, os pellets foram novamente ressuscitados em 1 mL do tampão de infiltração e a OD600 foi ajustada para 0,5-0,6. Logo em seguida foi feita a infiltração no lado abaxial das folhas de *N. benthamiana* com tempo de crescimento entre 4 a 5 semanas, utilizando uma seringa descartável de 1 ml (sem agulha).

Após três dias a 22 °C sob fotoperíodo 16 horas/8 horas (claro/escuro), amostras de tecido vegetal próximas aos sítios de infiltração foram cortadas com auxílio de um bisturi e visualizadas utilizando um microscópio Zeiss AxioObserver Z1 Apoptome 2.0. Os comprimentos de onda utilizados para capturar as imagens fluorescentes estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Comprimentos de onda utilizados para obtenção de imagens

Proteína fluorescente	Excitação (nm)	Emissão (nm)
GFP	498	500-550
mCherry	543	608-680
CFP	433-445	475-503

Resultados e discussão

Localização subcelular

A Figura 1 mostra o perfil de fluorescência do marcador de membrana plasmática, FLS2::mCherry, destacando-se a cor vermelha no contorno da células, onde encontram-se, em proximidade, a parede celular e a membrana plasmática. Nesse caso, a plasmólise celular poderia ser utilizada para retração da membrana plasmática da parede celular, individualizando o sinal proveniente de membrana plasmática e/ou da parede celular.

Uma das moléculas excretoras derivadas de bactérias mais ativas em células vegetais é a flagelina (Felix et al., 1999), que induz respostas de defesa rápidas (Gómez-Gómez; Boller, 2000) e desencadeia a ativação de uma cascata de fosforilação em plantas. A proteína FLS2 possui três domínios: um extracelular, um transmembrana e um intracelular, sendo que o domínio transmembrana é responsável pela associação da proteína com a membrana plasmática. Portanto, estudos prévios indicam a localização primária da proteína FLS2 na membrana plasmática, consistente com os nossos resultados.

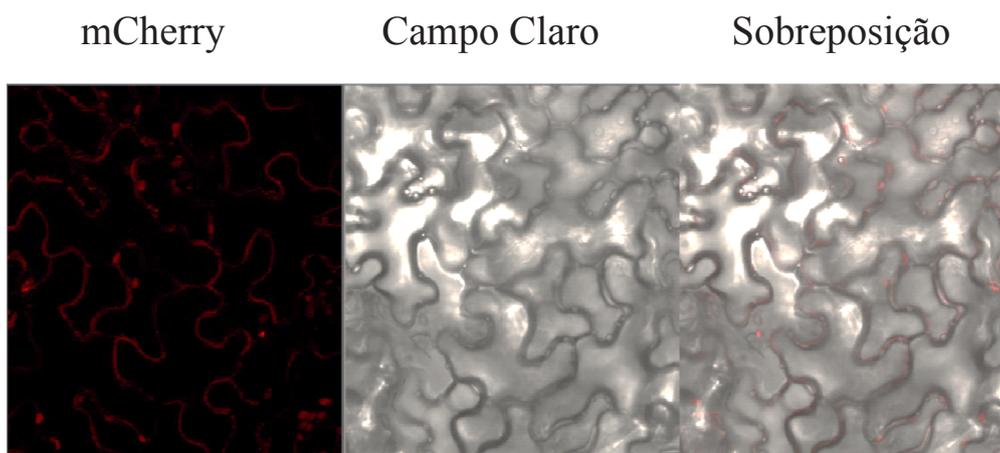


Figura 1: Localização da proteína FLS2 fusionada a mCherry em folhas de *Nicotiana benthamiana*. As imagens no espectro de fluorescência do tecido vegetal próximas aos sítios de infiltração foram visualizadas com 3 dias de transformação transiente.

Na Figura 2, a proteína transportadora SbMATE fusionada à proteína fluorescente GFP, produziu perfil de fluorescência no contorno celular, de forma semelhante ao perfil obtido com a proteína marcadora, FLS2. Esses resultados estão de acordo com a localização conhecida da proteína SbMATE na membrana plasmática das células radiculares, onde ela medeia a exsudação de citrato ativada pelo alumínio, conferindo tolerância ao metal

(Magalhães et al., 2007). Do ponto de vista formal, haveria necessidade de transformação simultânea (i.e. cotransformação) de FLS2:mCherry e SbMATE::GFP, onde a sobreposição das fluorescências vermelha e verde confirmaria a localização na membrana plasmática. Entretanto, essa etapa não foi aqui apresentada, uma vez que já foi feita em outros estudos. Mediante a fusão tradicional da proteína SbMATE com GFP e transformação em células epidérmicas de cebola plasmolizadas, Magalhães et al. (2007), descartaram uma possível localização da proteína SbMATE na parede celular, confirmando a localização na membrana plasmática.

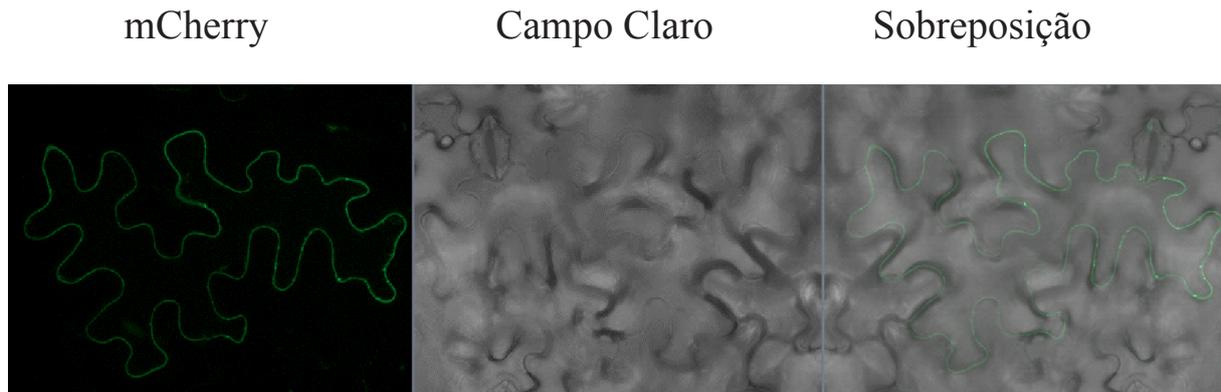


Figura 2. Localização subcelular da proteína SbMATE fusionada com GFP em folhas de *Nicotiana benthamiana*. As imagens no espectro de fluorescência do tecido vegetal próximas aos sítios de infiltração foram visualizadas com 3 dias de transformação transiente.

No caso da proteína AtWWP1, a fluorescência vermelha proveniente da fusão com mCherry foi observada em uma organela delimitada, de forma circular, no interior da célula (Figura 3). Esse perfil é claramente proveniente do núcleo celular, de forma consistente com a localização conhecida de AtWWP1. AtWWP1 é uma proteína de 463 aminoácidos que contém domínios WW, que formam corpos nucleares imunes (NBs). Esses corpos são estruturas celulares importantes que atuam como mediadores chave da resistência intrínseca contra muitos vírus em espécies que vão desde humanos até plantas (Calil et al., 2018).

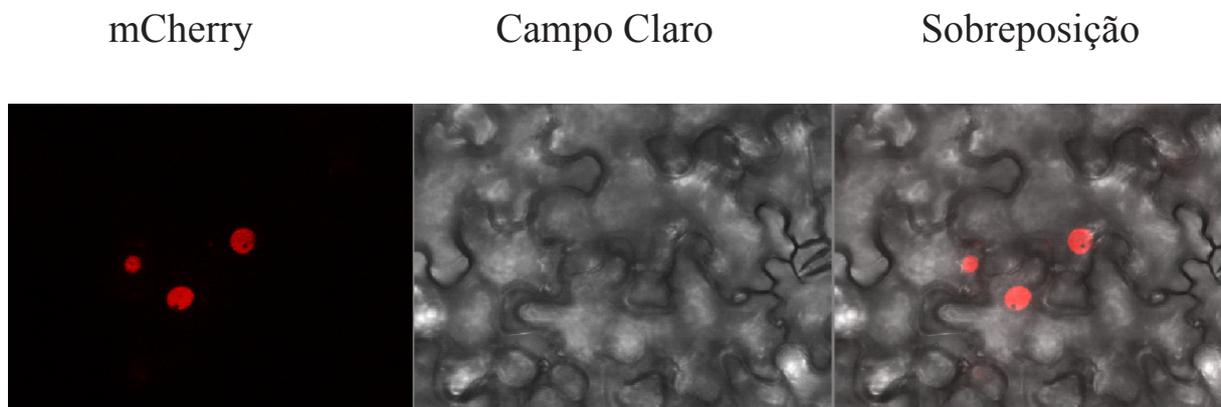


Figura 3. Localização da proteína AtWWP1 fusionada a mCherry em folhas de *Nicotiana benthamiana*. As imagens de fluorescência do tecido vegetal próximas aos sítios de infiltração foram visualizadas com 3 dias de transformação transiente, confirmando a localização do núcleo.

A fluorescência azul proveniente da proteína fluorescente CFP fusionada ao marcador

de Retículo Endoplasmático (RE) foi observada no citoplasma, definindo uma estrutura reticular, inclusive circundando uma estrutura intracelular circular, que é provavelmente o núcleo celular (Figura 4). Uma confirmação formal disso pode ser feita mediante a cotransformação dos marcadores de núcleo e de RE, ou mesmo pela coloração com o marcador DAPI.

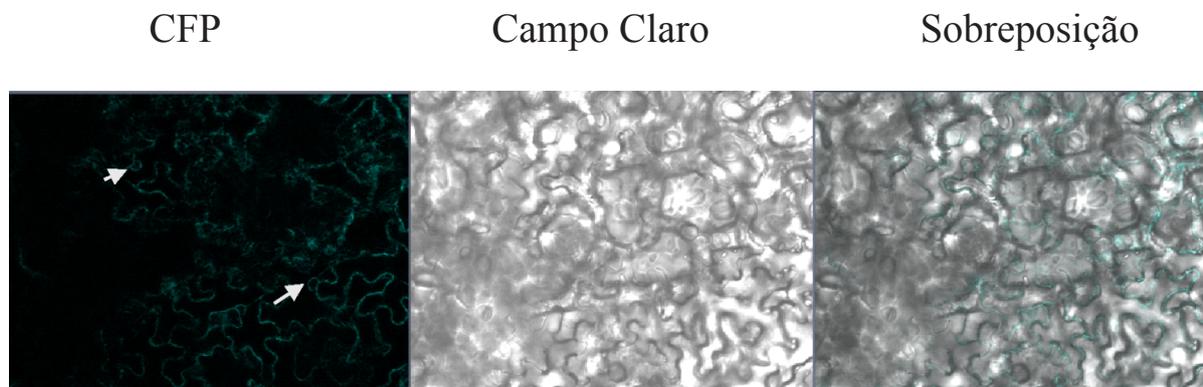


Figura 4. Localização do marcador de Retículo Endoplasmático (RE) fusionado com a proteína CFP em folhas de *Nicotiana benthamiana*. As imagens no espectro de fluorescência do tecido vegetal próximas aos sítios de infiltração foram visualizadas com 3 dias de transformação transiente, confirmando a localização do emaranhado de células no retículo endoplasmático. Setas brancas indicam a delimitação do núcleo.

Quando células totalmente expandidas são visualizadas em um plano medial, o RE é visto apenas na fina camada de citoplasma abaixo da membrana plasmática e ao redor do núcleo. O RE cortical geralmente assume uma aparência pontilhada resultante de seu caráter de rede, como observado acima na Figura 4. A marcação perinuclear, no entanto, é mais uniforme porque o RE é contínuo com o envelope nuclear. O marcador RE pode também, portanto, revelar a morfologia dinâmica do núcleo (Collings et al., 2000).

Conclusão

Foi possível estabelecer a localização dos marcadores de organelas, de forma consistente com a literatura, na Embrapa Milho e Sorgo. Ainda é preciso estabelecer a metodologia para marcadores de mitocôndrias, plastídios e complexo de Golgi, de forma a expandir esse catálogo para outras proteínas em investigação nos projetos de pesquisa da unidade. Esse catálogo será fundamental para a caracterização funcional de outras proteínas de interesse agrônômico.

Referências

CALIL, I.; QUADROS, I. P. S.; ARAÚJO, T. C.; DUARTE, C. E. M.; GOUVEIA-MAGESTE, B. C.; SILVA, J. C. F.; BRUSTOLINI, O. J. B.; TEIXEIRA, R. M.; OLIVEIRA, C. N.; MILAGRES, R. W. M. M.; MARTINS, G. S.; CHORY, J.; REIS, P. A. B.; MACHADO, J. P. B.; FONTES, E. P. B. A WW

- domain-containing protein forms immune nuclear bodies against begomoviruses. **Molecular Plant**, v. 11, n. 2, p. 1449-1465, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.09.009>.
- CHAPMAN, S.; KAVANAGH, T.; BAULCOMBE, D. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. **Plant Journal**, v. 2, n. 4, p. 549-557, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1992.t01-24-00999.x>.
- CIRCELLI, P.; DONINI, M.; VILLANI, M. E.; BENVENUTO, E. Efficient agrobacterium-based transient expression system for the production of biopharmaceuticals in plants. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 3, p. 221-224, 2010. DOI: <https://doi.org/10.4161%2Fbbug.1.3.11722>.
- COLLINGS, D. A.; CARTER, C. N.; RINK, J. C.; SCOTT, A. C.; WYATT, S. E.; ALLEN, N. S. Plant nuclei can contain extensive grooves and invaginations. **The Plant Cell**, v. 12, n. 12, p. 2425-2439, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1105%2Ftpc.12.12.2425>.
- FELIX, G.; DURAN, J. D.; VOLKO, S.; BOLLER, T. Plants recognize bacteria through the most conserved domain of flagellin. **Plant Journal**, v. 18, p. 265-276, 1999.
- GÓMEZ-GÓMEZ, L.; BOLLER, T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. **Molecular Cell**, v. 5, n. 6, p. 1003-1011, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80265-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80265-8).
- GOODIN, M. M.; ZAITLIN, D.; NAIDU, R. A.; LOMMEL, A. A. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 8, p. 1015-1026, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1094/mpmi-21-8-1015>.
- HELLENS, R. P.; ALLAN, A. C.; FRIEL, E. N.; BOLITHO, K.; GRAFTON, K.; TEMPLETON, M. D.; KARUNAIRETNAM, S.; GLEAVE, A. P.; LAING, W. A. Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. **Plant Methods**, v. 1, article 13, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-1-13>.
- LUNN, J. E. Compartmentation in plant metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 1, p. 35-47, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erl134>.
- MA, L.; LUKASIK, E.; GAWEHNS, F.; TAKKEN, F. L. W. The use of agroinfiltration for transient expression of plant resistance and fungal effector proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves. **Methods Molecular Biology**, v. 835, p. 61-74, 2012. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5_4.
- MAGALHÃES, J. V. de; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. de P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y.-H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng2074>.
- MAGALHÃES, J. V.; GARVIN, D. F.; WANG, Y. H.; SORRELLS, M. E.; KLEIN, P. E.; SCHAFFERT, R. E.; LI, L.; KOCHIAN, L. V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the poaceae. **Genetics**, v. 167, n. 4, p. 1905-1914, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.103.023580>.

- NELSON, B. K.; CAI, X.; NEBENFÜHR, A. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. **The Plant Journal**, v. 51, n. 6, p. 1126-1136, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03212.x>.
- TANG, X.; FREDERICK, R. D.; ZHOU, J.; HALTERMAN, D. A.; JIA, Y.; MARTIN, G. B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. **Science**, v. 274, n. 5295, p. 2060-2063, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.274.5295.2060>.
- VAN DER HOOR, R.; LAURENT, F.; ROTH, R.; DE WIT, P. J. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 4, p. 439-446, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1094/mpmi.2000.13.4.439>.
- WAGNER, B.; FUCHS, H.; ADHAMI, F.; MA, Y.; SCHEINER, O.; BREITENEDER, H. Plant virus expression systems for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*. **Methods**, v. 32, n. 3, p. 227-234, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.08.005>.
- WANG, G.; HUANG, M.; NIELSEN, J. Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 48, p. 77-84, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.03.017>.
- WARD, M.; WILSON, L. J.; CARMONA, L. C.; TURNER, G. The oliC3 gene of *Aspergillus niger*: isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation. **Current Genetics**, v. 14, n. 1, p. 37-42, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00405851>.
- XU, J.; CHEN, H.; KÁDÁR, Z.; THOMSEN, A. B.; SCHMIDT, J. E.; PENG, H. Optimization of microwave pretreatment on wheat straw for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 9, p. 3859-3864, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.054>.

Manejo do complexo dos enfezamentos com uso intensivo de inseticidas⁽¹⁾

Valquíria A. Carvalho⁽²⁾, Nathan M. Santos⁽³⁾, Guilherme S. Avellar⁽⁴⁾, Poliana S. Pereira⁽⁵⁾, Nathalia Damasceno⁽⁵⁾, Ivênio R. de Oliveira⁽⁶⁾, Luciano V. Cota⁽⁶⁾, Dagma D. da Silva Araújo⁽⁶⁾ e Simone M. Mendes⁽⁶⁾

⁽¹⁾Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig. ⁽²⁾ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽³⁾ Estudante do curso de Engenharia Agrônoma, Universidade Federal de São João del Rei, Campus de Sete Lagoas. ⁽⁴⁾ Engenheiro Agrônomo, Bolsista de doutorado, Universidade Federal de São João Del Rei, São João del Rei-MG, Brasil. Campus Dom Bosco/LANEC. ⁽⁵⁾ Bióloga, Bolsista de produtividade científica, Centro Universitário Monsenhor Messias, Sete Lagoas – MG. ⁽⁶⁾ Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo.

Resumo - A cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* é uma praga de importância econômica para a cultura, em razão de sua capacidade de transmitir patógenos como o fitoplasma e o espiroplasma, causadores do enfezamento do milho. O manejo eficaz dessa praga e do complexo dos enfezamentos tem sido desafiador, sobretudo em função da dificuldade de detectar a proporção de insetos infectivos em campo. Neste estudo, conduzido em área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, foi avaliado o efeito do número de aplicações de inseticidas na redução da infestação de cigarrinhas e das doenças por ela transmitidas em campo. Foi realizado tratamento de sementes com os inseticidas imidacloprido e tiodicarbe em todos os tratamentos, sendo T1: uma pulverização com acefato; T2: uma aplicação de acefato e sete dias depois uma aplicação de metomil; T3: uma aplicação de acefato, duas de metomil com sete dias de intervalo; T4: uma aplicação de acefato, três de metomil com sete dias de intervalo entre elas; e T5: uma aplicação de acefato, quatro de metomil com sete dias de intervalo entre elas. Os resultados indicam que o aumento no número de aplicações de inseticidas não resultou em uma redução significativa na infestação de cigarrinhas nem na incidência das doenças associadas a elas. Observou-se que o estágio de desenvolvimento da planta de milho influenciou na presença de cigarrinhas, com um pico observado no estágio V5. Além disso, não houve diferenças significativas na severidade dos sintomas de raiado-fino e dos enfezamentos entre os diferentes tratamentos. O aumento no número de aplicações com inseticidas não gera efeito além do esperado na redução de cigarrinhas e na redução da doença. Esses achados sugerem que estratégias complementares de manejo, além do controle químico, podem ser necessárias para mitigar os danos causados pela cigarrinha-do-milho e as doenças por ela transmitidas.

Termos para indexação: *Dalbulus maidis*, cigarrinha-do-milho, milho, controle químico.

Management of the stunt complex with intensive use of insecticides

Abstract - The maize leafhopper *Dalbulus maidis* is a pest of economic importance for the crop, due to its ability to transmit pathogens such as phytoplasma and spiroplasma, which

cause maize stunting. Effective management of this pest and the stunt complex has been challenging, especially due to the difficulty in detecting the proportion of infective insects in the field. In this study, conducted in an experimental area at Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, the effect of the number of insecticide applications on reducing leafhopper infestation and the diseases transmitted by it in the field was evaluated. Seed treatment was carried out with the insecticides imidacloprid and thiodicarb in all treatments: T1: an application of acephate; T2: an application of acephate and seven days later an application of methomyl; T3: one application of acephate, two of methomyl, seven days apart; T4: one application of acephate, three of methomyl with a seven-day interval between them; and T5: one application of acephate, four of methomyl with a seven-day interval between them. The results indicate that the increase in the number of insecticide applications did not result in a significant reduction in leafhopper infestation nor in the incidence of diseases associated with them. It was observed that the development stage of the maize plant influenced the presence of leafhoppers, with a peak observed at the V5 stage. Furthermore, there were no significant differences in the severity of fine streak symptoms and stunting between the different treatments. The increase in the number of insecticide applications does not have an effect beyond that expected in reducing leafhoppers and reducing the disease. These findings suggest that complementary management strategies, in addition to chemical control, may be necessary to mitigate the damage caused by the maize leafhopper and the diseases it transmits.

Index terms: *Dalbulus maidis*, maize leafhopper, maize, chemical control.

Introdução

A cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (Delong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae), é uma praga de importância econômica para o milho, por ser vetor de três patógenos importantes da cultura: o fitoplasma causador do enfezamento-vermelho (*Maize bushy stunt phytoplasma*), o espiroplasma causador do enfezamento-pálido (*Spiroplasma kunkelii*) e o vírus-da-risca-do-milho (*Maize rayado fino virus*) (Gonçalves et al., 2000; Waquil et al., 2000; Sabato et al., 2014). O complexo dos enfezamentos está relacionado à incidência na mesma planta dos dois enfezamentos, pálido e vermelho, e à ocorrência da cigarrinha, que causam perdas na produção e, em alguns casos, podem até devastar uma lavoura (Querino et al., 2017; Coll-Aráoz et al., 2020).

A identificação do enfezamento em campo tem se baseado principalmente em sintomas característicos observados nas plantas, como estrias nas folhas, nanismo, enrugamento e deformações das espigas. Além deles, são usados testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), para confirmar a presença dos patógenos causadores das doenças, o fitoplasma do enfezamento-vermelho e o espiroplasma do enfezamento-pálido, em amostras de plantas infectadas (Shepherd et al., 2010; Carloni et al., 2011).

O manejo dessa praga tem sido difícil e oneroso, em virtude de o problema ser ocasionado pela transmissão dos patógenos (Contini et al., 2019), e pela dificuldade de detecção da proporção de insetos infectivos em campo. Diante da dificuldade em se manejar a cigarrinha, medidas conjuntas devem ser adotadas a fim de minimizar o efeito

das doenças na produtividade da lavoura. Tais medidas fazem parte do manejo integrado de pragas (MIP), em que medidas culturais, preventivas e de controle são indicadas, tais como aplicação dos inseticidas, eliminação do milho voluntário da área e sincronização da época de plantio, entre outras (Cota et al., 2021).

Não existe nível de controle para a cigarrinha no campo, uma vez que não se consegue detectar a proporção de insetos infectivos. Sendo assim, é indicado o uso de inseticidas com a detecção da presença do inseto na lavoura até o estágio vegetativo de oito folhas completamente formadas (em torno de 40 dias após germinação (Cota et al., 2021)). Contudo, a eficácia dessa recomendação é questionada. Assim, para subsidiar as estratégias de manejo da cigarrinha e do complexo dos enfezamentos em campo, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do número de aplicações de inseticidas na redução de infestação de cigarrinhas e das doenças por ela transmitidas em campo.

Material e métodos

O experimento foi conduzido em área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, (19°28' latitude sul e longitude 44°15'08" W GrW), no período de março a julho de 2023. Foi feito o plantio em 31 de março de 2023, com o híbrido AS 1844 PRO 3, em delineamento em blocos casualizados. Cada parcela foi composta por 10 linhas com 11 metros de comprimento, com população de 60.000 plantas/ha, e espaçamento entre linhas de 0,5 metro. Os tratamentos foram o número de aplicações de inseticidas, totalizando cinco formas de manejo e quatro repetições, totalizando 20 parcelas. Foi realizado tratamento de sementes com os inseticidas imidacloprido e tiodicarbe em todos os tratamentos sendo: 1 (T1): uma pulverização com acefato. 2 (T2): uma aplicação de acefato e sete dias depois aplicação de metomil. 3 (T3): uma aplicação de acefato, duas de metomil com sete dias de intervalo. 4 (T4): uma aplicação de acefato, três de metomil com sete dias de intervalo entre elas. 5 (T5): uma aplicação de acefato, quatro de metomil com sete dias de intervalo entre elas. As pulverizações foram realizadas com pulverizador pressurizado a CO₂, com seis bicos espaçados a 0,5 metro. O tipo de bico utilizado foi leque com volume de calda de 100 litros por hectare.

As avaliações foram feitas visualmente, contabilizando o número de cigarrinha no cartucho do milho em 20 plantas em cada parcela, semanalmente, do estágio V4 ao V7, sendo contada a presença de ninfas e adultos. As avaliações foram feitas 48 horas após a aplicação dos tratamentos iniciais.

Foram feitas também avaliações de raiado-fino e enfezamento. Em 20 plantas por parcela, anotou-se a presença de plantas com sintoma de raiado-fino. Foram observados também sintomas iniciais de ferrugem e mancha-de-turcicum. Embora os sintomas nas parcelas tenham sido baixos, as plantas ao lado apresentavam muitos sintomas de enfezamento e raiado-fino. A avaliação foi feita 48 dias após o plantio (24/5).

Foram feitas duas avaliações de severidade de enfezamentos, 109 e 116 dias após o plantio. Foi utilizada uma escala de notas variando de 1 a 6, referentes à média dos sintomas das plantas na parcela, em que 1: ausência de sintomas; 2: plantas com menos de 25% das folhas com sintomas, ou seja, folha avermelhada ou amarelada, ou apresentando faixas cloróticas em sua inserção; 3: plantas com 25% a 50% das folhas com sintomas; 4:

plantas com 50% a 75% das folhas com sintomas; 5: plantas com mais de 75% das folhas com sintomas; e 6: plantas com morte precoce causada por enfezamentos (Silva et al., 2003).

Os resultados das avaliações foram submetidos à análise estatística utilizando o programa Sisvar. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5% de significância).

Resultados e discussão

A interação do número de aplicações realizadas semanalmente para o controle de cigarrinhas e o estágio de desenvolvimento do milho não foi significativa ($F=0,931$ e $p=0,5208$). Também não houve significância para o número de aplicações realizadas para o controle de cigarrinhas no número médio de cigarrinhas observadas/cartucho do milho semanalmente ($F=0,0465$ e $P=0,7612$).

Contudo, verificou-se significância para o número médio de cigarrinhas encontradas no cartucho do milho, nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta avaliados ($F=14,040$ e $P=0,00$) (Figura 1). O ajuste da curva mostrou que no estágio de desenvolvimento V5 foi coletado um maior número de cigarrinhas, independentemente do tratamento, com redução do número de cigarrinhas nos estádios V6 e V7. Esses dados divergem dos de Carvalho et al. (2022), que encontraram o pico populacional no estágio V7. Muito provavelmente, o maior número de insetos em estágio fenológico anterior deve-se à área experimental onde o ensaio foi plantado, pois nessa área havia outros plantios de milho com estádios fenológicos avançados, o que pode ter feito com que esses insetos migrassem para o presente ensaio mais rapidamente. Segundo Cota et al. (2021), essa migração de cigarrinhas entre lavouras é tão frequente que se costuma recomendar evitar, em lavoura comerciais, o plantio de lavouras novas perto de lavouras mais velhas, onde a presença do inseto já foi constatada.

Contudo, de maneira geral, são registrados picos populacionais de cigarrinhas em lavouras de milho V4 e V6, como verificado por Santos et al. (2022), indicando que o manejo da área pode alterar a infestação do inseto, mas que permanece dentro de um período já relatado na literatura.

Na avaliação dos sintomas de raiado-fino e enfezamentos, cujos patógenos são transmitidos pela cigarrinha, também não se verificou efeito significativo da aplicação de inseticidas, sendo a nota média de raiado de 0,143, e de 2,6 a nota média de enfezamentos.

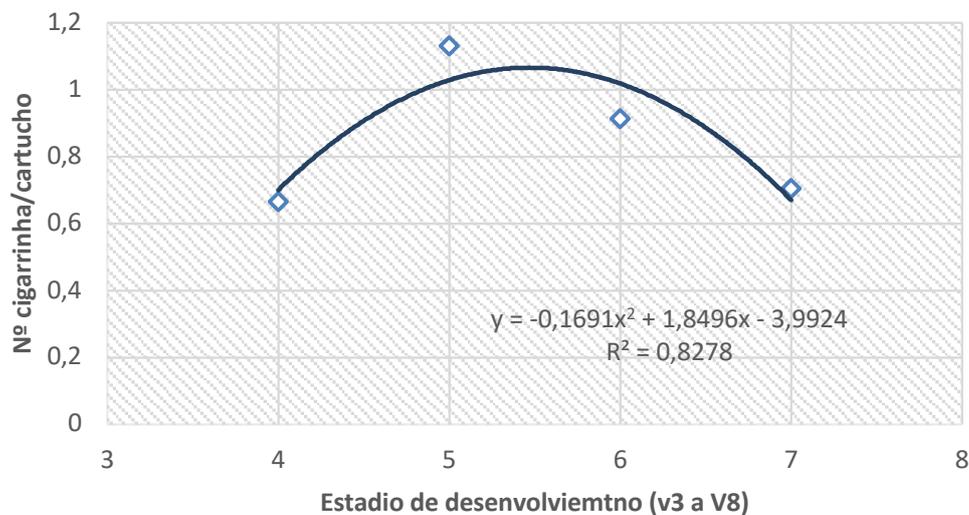


Figura 1. Número médio de cigarrinha *Dalbulus maidis* por cartucho de milho AS 1844 PRO3 em diferentes estádios de desenvolvimento, variando do V3 ao V8. Sete Lagoas, MG.

Esses resultados sugerem que não existe a necessidade de aumentar o número de aplicações para o controle de cigarrinhas em lavouras de milho, pois não houve eficiência do aumento do número de aplicações nem para a redução do número de insetos no campo nem para a incidência das doenças de raiado-fino e enfezamentos. Vale ressaltar a necessidade de avaliação em áreas maiores com menor interferência de plantios de milho em áreas adjacentes ao ensaio. Contudo, por se tratar de insetos transmissores de patógenos, a presença de poucos insetos pode ser suficiente para transmissão à planta.

Conclusão

O aumento no número de aplicações com inseticidas não gera efeito além do esperado na redução de cigarrinhas e dos patógenos transmitidos. Estratégias complementares de manejo devem ser necessárias para mitigar os danos causados pela cigarrinha-do-milho e as doenças por ela transmitidas.

Agradecimentos

CNPq e SENAR/FAEP-PR

Referências

CARLONI, E.; VIRLA, E.; PARADELL, S.; CARPANE, P.; NOME, C.; LAGUNA, I.; GIMÉNEZ PECCI, M. P. *Exitianus obscurinervis* (Hemiptera: Cicadellidae), a new experimental vector of *Spiroplasma kunkelii*. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 6, p. 1793-1799, 2011.

DOI: <https://doi.org/10.1603/ec11156>.

CARVALHO, V. A.; AVELLAR, G. S. de; SANTOS, N. M. dos; SANTOS, D. G. dos; DAMASCENO, N. C. R.; OLIVEIRA, I. R. de. Flutuação populacional de *Dalbulus maidis* em milho segunda safra em Sete Lagoas-MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 33. 2022, Sete Lagoas. **Brasil: 200 anos de independência: sustentabilidade e desafios para a cadeia produtiva de grãos: resumos**. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2022.

COLL-ARÁOZ, M. V.; HILL, J. G.; LUFT-ALBARRACIN, E.; VIRLA, E. G.; FERNANDEZ, P. C. Modern maize hybrids have lost volatile bottom-up and top-down control of *Dalbulus maidis*, a specialist herbivore. **Journal of Chemical Ecology**, v. 46, p. 906-915, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-020-01204-3>.

CONTINI, E.; MOTA, M. M.; MARRA, R.; BORGHI, E.; MIRANDA, R. A. de; SILVA, A. F. da; SILVA, D. D. da; MACHADO, J. R. de A.; COTA, L. V.; COSTA, R. V. da; MENDES, S. M. **Milho: caracterização e desafios tecnológicos**. [Brasília, DF: Embrapa; Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo], 2019. 45 p. (Desafios do Agronegócio Brasileiro, 2). Nota técnica.

COTA, L. V.; OLIVEIRA, I. R. de; SILVA, D. D. da; MENDES, S. M.; COSTA, R. V. da; SOUZA, I. R. P. de; SILVA, A. F. da. **Manejo da cigarrinha e enfezamentos na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2021. 16 p. Cartilha.

GONCALVES, R.; GALVAO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; SILVA, E. do C.; CORREA, L. A.; PICANCO, M. C. Densidade populacional de *Dalbulus maidis* e de sintomas semelhantes ao complexo enfezamento em cultivares de milho na safrinha. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23., 2000, Uberlândia. **A inovação tecnológica e a competitividade no contexto dos mercados globalizados: resumos**. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo; Embrapa Milho e Sorgo; Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2000. p. 186.

QUERINO, R. B.; MENEZES, A. R.; ALBARRACIN, E. L.; OLIVEIRA, C. M.; TRIAPITSYN, S. V. Biological control of *Dalbulus maidis* in Brazil: an overview of the parasitoids. In: OLIVEIRA, C. M. de; SABATO, E. de O. (ed.). **Diseases in maize: insect vectors, mollicutes and viruses**. Brasília, DF: Embrapa, 2017. p. 119-138.

SABATO, E. de O.; LANDAU, E. C.; OLIVEIRA, C. M. de. **Recomendações para o manejo de doenças do milho disseminadas por insetos-vetores**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. 15 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 205).

SANTOS, N. M.; CARVALHO, V.; AVELLAR, G. S. de; SANTOS, D. G. dos; DAMASCENO, N.; OLIVEIRA, I. R. de. Cigarrinha-do-milho: infestação em diferentes cultivares e estádios fenológicos. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 33., 2022, Sete Lagoas. **Brasil: 200 anos de independência: sustentabilidade e desafios para a cadeia produtiva de grãos: resumos**. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2022.

SHEPHERD, D. N.; MARTIN, D. P.; VAN DER WALT, E.; DENT, K.; VARSANI, A.; RYBICKI, E. P. Maize streak virus: an old and complex 'emerging' pathogen'. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 1, 1-12, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00568.x>.

SILVA, R. G.; GALVÃO, J. C.; MIRANDA, G. V.; OLIVEIRA, E. Controle genético da resistência aos enfezamentos do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 921-928, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000800004>.

WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A.; CRUZ, I.; SANTOS, J. P. Aspectos biológicos de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) em híbridos de milho (*Zea mays*). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 2, p. 347-352, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0301-80592000000200017>.

Produtividade da cultura do sorgo granífero e de *Urochloa ruziziensis* em cultivo intercalar nas entrelinhas da soja através do Sistema Antecipe⁽¹⁾

Tamiris da Graça Rocha Freitas⁽²⁾, Emerson Borghi⁽³⁾, Décio Karam⁽³⁾ e Júlia Resende Oliveira Silva⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Trabalho financiado pela Fundação Agrisus. ⁽²⁾ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa/Fapemig. ⁽³⁾ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo. ⁽⁴⁾ Estudante de Doutorado em Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras

Resumo - O trabalho objetivou avaliar as culturas da soja, do sorgo granífero e da braquiária semeadas antecipadamente nas entrelinhas da soja considerando o cultivo intercalar antecipado realizado por meio do Sistema Antecipe. O experimento foi instalado na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, no município de Sete Lagoas, MG, no ano agrícola 2022/2023. Os tratamentos foram compostos pelos seguintes sistemas de cultivo: 1: soja no verão – sorgo pós-colheita da soja. 2: soja no verão – sorgo antecipado. 3: soja no verão – sorgo + braquiária antecipada. 4: soja no verão – braquiária antecipada. 5: soja no verão – braquiária pós-colheita da soja. Para os tratamentos antecipados, foi utilizada semeadora-adubadora específica desenvolvida para o Sistema Antecipe, com quatro linhas espaçadas em 50 cm cada, equipada com terceira caixa para semeadura da braquiária. A colheita da soja foi realizada de forma mecanizada, em todos os tratamentos. Foram analisadas as produtividades de grãos da soja, de matéria seca de braquiária e de grãos do sorgo. A produtividade de grãos de soja foi influenciada pelos tratamentos, com maiores valores para o tratamento em que a oleaginosa foi semeada sobre palha de sorgo pós-colheita da soja, e menores valores na soja semeada sobre a braquiária antecipada. A presença da braquiária em consórcio, mesmo com 20 dias de antecipação na semeadura em relação ao tratamento sorgo pós-colheita da soja, diminuiu a produtividade de grãos em 50% em relação aos demais tratamentos. A antecipação da semeadura do sorgo granífero em 20 dias não reflete em maior produtividade de grãos. A semeadura da braquiária 20 dias antes da colheita da soja proporciona maior produtividade de forragem, possibilitando sua utilização no período de outono-primavera ou como opção de cobertura vegetal para o sistema plantio direto na região de Sete Lagoas.

Termos para indexação: consórcio, sistema de plantio direto, semeadura antecipada.

Grain sorghum and *Urochloa ruziziensis* productivity in intercropping in soybean rows using the Sistema Antecipe⁽¹⁾

Abstract - The work aimed to evaluate soybean, grain sorghum and brachiaria crops sown in advance between the soybean rows considering the early intercropping carried out through the Sistema Antecipem. The experiment was installed in the experimental area of Embrapa

Milho e Sorgo, in the municipality of Sete Lagoas, MG, in the 2022/2023 agricultural year. The treatments were composed of the following cultivation systems: 1: soybeans in summer – sorghum post-soybean harvest. 2: soybeans in summer – sorghum in advance. 3: soybeans in summer – sorghum + early brachiaria. 4: soybeans in summer – early brachiaria. 5: soybeans in summer – brachiaria after soybean harvest. For early treatments, a specific seeder-fertilizer developed for the Sistema Antecipe was used, with four rows spaced 50 cm each, equipped with a third box for sowing brachiaria. Soybean harvesting was carried out mechanized in all treatments. The productivity of soybean grains, brachiaria dry matter and sorghum grains were analyzed. Soybean grain productivity was influenced by treatments, with higher values for the treatment in which the oilseed was sown on sorghum straw post-soybean harvest, and lower values for soybean sown on early brachiaria. The presence of brachiaria in a consortium, even 20 days earlier in sowing in relation to the soybean post-harvest sorghum treatment, reduced grain productivity by 50% in relation to the other treatments. Bringing grain sorghum sowing forward by 20 days does not result in greater grain productivity. Sowing brachiaria 20 days before harvesting soybeans provides greater forage productivity, enabling its use in the autumn-spring period or as a cover crop option for the direct planting system in the region of Sete Lagoas.

Index terms: consortium, direct planting system, early sowing.

Introdução

O sorgo cultivado em segunda safra vem aumentando de proporção anualmente, sendo a principal época de cultivo desse cereal no Brasil. Um dos fatores limitantes à produtividade na safrinha depende principalmente da época de semeadura, por causa, sobretudo, da redução da disponibilidade de água no solo e das temperaturas do ar no inverno. Quanto mais tarde for semeado, menor será o potencial produtivo e maior o risco de perdas por geadas e/ou seca.

Desenvolvido ao longo de 16 anos de pesquisas, o Sistema Antecipe–cultivo intercalar antecipado de milho nas entrelinhas de soja, é um sistema de cultivo inovador e disruptivo, pois, segundo Karam et al. (2020), é possível realizar o cultivo de milho safrinha antes da colheita da soja. Para que o sistema possa ser implementado, os autores consideram dois critérios básicos: a) até o estágio de desenvolvimento V5, o ponto de crescimento do milho encontra-se abaixo da superfície do solo. Mesmo com a redução da área foliar provocado pela colheita mecânica da soja, o milho é capaz de continuar seu crescimento, sem prejuízo à produção de grãos; e b) foi desenvolvida pela Embrapa uma semeadora-adubadora específica para este sistema de cultivo, com patente requerida ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) em 2020, (BR 10 2020 009566 8).

A inovação permite a antecipação da implantação do milho em até 20 dias, em determinadas regiões do País. O Antecipe possibilita o cultivo de milho na sequência da soja, mesmo para cultivares de soja de ciclo mais longo, com ganhos consideráveis no sistema de sucessão e/ou rotação soja/milho. Em regiões limitadas pelo Zoneamento de Risco Climático (Zarc), com maior estabilidade na safrinha, esse sistema reduz os riscos de frustração perante condições climáticas mais adversas no final do período de verão e início de outono. Para a

região Central de Minas Gerais, com condições climáticas restritivas no final do período de verão, o Antecipe poderá desenvolver novos modelos de cultivos consorciados como o sorgo granífero, além da possibilidade do cultivo de gramíneas forrageiras dos gêneros *Urochloa* (*Syn Brachiaria*).

Assim, para comprovar a eficiência dessa técnica e difundir esta tecnologia visando aumentar a produção de grãos em sistema plantio direto (SPD) e Integração Lavoura-Pecuária (ILP) na região Central de Minas Gerais, este trabalho teve como objetivo avaliar as culturas da soja, do sorgo granífero e da braquiária semeadas antecipadamente nas entrelinhas da soja por meio do cultivo intercalar antecipado realizado por meio do sistema Antecipe em Sete Lagoas, MG.

Material e métodos

O experimento foi instalado na área experimental pertencente à Embrapa Milho e Sorgo, no município de Sete Lagoas, MG (19° 28'S; 44° 15'W e altitude de 732 m). A pesquisa foi conduzida durante o ano agrícola 2022/2023. O clima da região é classificado, segundo Köppen (1948), tipo Cwa (com inverno seco e verão quente), com temperatura média anual de 21,8 °C e precipitação média anual de 1.345 mm. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Distroférico muito argiloso (660 g kg⁻¹ de argila).

Os tratamentos foram compostos pelos seguintes sistemas de cultivo: **Tratamento 1:** soja no verão – sorgo pós-colheita da soja. **Tratamento 2:** soja no verão – sorgo antecipado. **Tratamento 3:** soja no verão – sorgo + braquiária antecipada. **Tratamento 4:** soja no verão – braquiária antecipada. **Tratamento 5:** soja no verão – braquiária pós-colheita da soja.

A área total do experimento possui cerca de três hectares, com declive uniforme, e foi dividida em faixas para acomodar os tratamentos. Todos os tratamentos foram semeados mecanicamente, inclusive o cultivo antecipado. Neste, foi utilizada semeadora-adubadora específica desenvolvida para o sistema Antecipe, conforme descrito em Karam et al. (2020), com quatro linhas espaçadas em 50 cm cada. Além da semeadura, na colheita da soja e das culturas em safrinha foi utilizada colhedora automotriz New Holland modelo TC 57, cortando toda a massa vegetal presente nos tratamentos simultaneamente à colheita da soja.

Em 13/10/2022, a cobertura vegetal foi dessecada para semeadura da soja. Foi utilizada a cultivar de soja RK 7518 IPRO, de ciclo precoce e GMR de 7.5, recomendada para a região macrosojícola 3, com população inicial de 16 sementes por metro (320.000 plantas por hectare). A cultivar foi inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*. A adubação de semeadura constou da aplicação na linha de 16 kg ha⁻¹ de N, 56 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 32 kg ha⁻¹ de K₂O, correspondendo a 200 kg ha⁻¹ do fertilizante formulado 08- 28- 16. Durante todo o desenvolvimento da cultura da soja, todos os tratos culturais foram realizados conforme os princípios das boas práticas agrícolas.

Em 17/2/2023, para os tratamentos em que foi realizado o cultivo intercalar antecipado, a semeadura ocorreu quando a soja encontrava-se em estágio R7, segundo a escala descrita em Farias et al. (2007), correspondendo a 113 dias após a semeadura da soja e 20 dias antes da colheita da oleaginosa. Nos cultivos que envolveram a semeadura da braquiária antecipada, as sementes da forrageira foram acondicionadas na terceira caixa acoplada à semeadora-adubadora, e a deposição das sementes ocorreu no sulco de deposição do fertilizante, posicionando o tubo de descarga da semente após a abertura do

sulco.

A Tabela 1 mostra as datas de realização das semeaduras em cada um dos tratamentos analisados.

O híbrido de sorgo granífero selecionado foi o BRS 3318, oriundo do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. Independentemente da época de semeadura, utilizaram-se as densidades de 10 sementes por metro para o sorgo granífero, objetivando 200.000 plantas ha⁻¹. Para a braquiária *Urochloa ruziziensis* (*Syn Brachiaria*), a densidade de semeadura foi de 10 kg de sementes por hectare.

A adubação de semeadura para o sorgo, inclusive no tratamento consorciado com a braquiária, constou da aplicação de 200 kg ha⁻¹ de 08-28-16, correspondendo a 54 kg ha⁻¹ de N, 78,4 kg ha⁻¹ de P2O5 e 44,8 kg ha⁻¹ de K2O. Nos tratamentos referentes à semeadura somente da braquiária, não foi feita adubação.

Tabela 1. Tratamentos e respectivas datas de semeadura das culturas de milho, sorgo e *Urochloa ruziziensis* (braquiária) nos sistemas de cultivo avaliados. Sete Lagoas, MG, safra 2022/2023.

Tratamentos	Datas de semeadura	
	Antecipe	Pós-colheita da soja
1. Soja no verão – sorgo antecipado	17/02/2023	–
2. Soja no verão – sorgo pós-colheita da soja	–	14/03/2023
3. Soja no verão – sorgo + braquiária antecipada	17/02/2023	–
4. Soja no verão – braquiária antecipado	16/02/2023	–
5. Soja no verão – braquiária pós-colheita da soja	–	14/03/2023

Datas de semeadura

A colheita da soja para quantificação da produtividade em cada tratamento foi efetuada manualmente nos dias 7 e 8/3/2023 e, após essa coleta, procedeu-se à colheita mecânica da soja em 9/3/2023, em todos os tratamentos, correspondendo a 133 após a semeadura da soja, utilizando-se colhedora automotriz New Holland modelo TC 57. Toda a massa vegetal foi cortada, inclusive nos tratamentos em que a semeadura ocorreu antecipadamente. Para essa operação, a altura da plataforma de corte da colhedora foi regulada para operar na altura de inserção da primeira vagem da soja, diminuindo os danos por perda de área foliar nas culturas do sorgo e da braquiária.

No dia 14/3/2023, correspondendo ao dia seguinte à colheita da soja, no tratamento com semeadura antecipada de sorgo, foi realizada adubação de cobertura por meio da aplicação de 200 kg de ureia ha⁻¹, correspondendo a 90 kg ha⁻¹ de N, utilizando-se adubador de discos para plantio direto. Para o tratamento do sorgo semeado após a colheita da soja, a cobertura foi realizada em 10/4/2023, utilizando-se a mesma quantidade de ureia.

Foram realizadas as seguintes avaliações: produtividade de grãos da soja na maturidade fisiológica (avaliação de duas linhas de cinco metros de comprimento), produtividade de matéria

seca de braquiária (corte da parte aérea utilizando quadro de 0,5 m²) e produtividade de grãos do sorgo (avaliação de duas linhas de cinco metros de comprimento). Para todas as avaliações, foram efetuadas cinco repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste LSD (DMS) a 5% utilizando-se o programa Sisvar® (Ferreira, 2011).

Resultados e discussão

Não foi constatada perda de grãos, vagens ou ramos durante a passagem da semeadora-adubadora. A produtividade de grãos de soja foi influenciada pelos tratamentos (Tabela 2), com maiores valores para o tratamento em que a oleaginosa foi semeada sobre palha de sorgo pós-colheita da soja, e menores valores na soja semeada sobre a braquiária antecipada. Esses resultados são decorrentes das condições do ano agrícola anterior (safra 2021/2022). A produtividade de grãos de sorgo também foi influenciada pelos tratamentos (Tabela 2). A presença da braquiária em consórcio, mesmo com 20 dias de antecipação na semeadura em relação ao tratamento sorgo pós-colheita da soja, diminuiu a produtividade de grãos em relação aos demais tratamentos em 50%. É importante salientar que a competição entre o sorgo e a braquiária ocorreu pois não houve controle de crescimento da forrageira. Essa afirmação é respaldada pela análise dos dados de produtividade de matéria seca de braquiária (Tabela 2), em que a semeadura da forrageira antecipada, mesmo no consórcio com o sorgo, foi semelhante entre os dois tratamentos e maior que a semeadura pós-colheita da soja.

Tabela 2. Produtividade de grãos de soja, sorgo granífero e matéria seca de *U. Ruziziensis* (braquiária) em diferentes sistemas de cultivo. Sete Lagoas, MG, Embrapa Milho e Sorgo, ano agrícola 2022/2023.

Tratamentos	Produtividade Kg ha ⁻¹		
	Soja	Sorgo	Braquiária
Sorgo antecipado	3.310 ab	2.681 a	–
Sorgo pós-colheita da soja	3.594 a	2.845 a	–
Sorgo + braquiária antecipada	3.414 ab	1.345 b	8.768 a
Braquiária antecipada	3.120 b	–	8.744 a
Braquiária pós-colheita da soja	3.302 ab		3.817 b
Média	3.452	2.290	7.547
CV (%)	12,9	14,6	31,4

Médias seguidas de letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste LSD (DMS) a 5% de probabilidade.

Conclusões

A antecipação da semeadura do sorgo granífero em 20 dias não reflete em maior produtividade de grãos. Além disso, a competição dessa cultura com a braquiária em consórcio simultâneo e antecipado reduz a produtividade de grãos em 50%.

A semeadura da braquiária 20 dias antes da colheita da soja proporciona maior produtividade de forragem, o que possibilita sua utilização no período de outono- primavera ou como opção de cobertura vegetal para o sistema plantio direto na região de Sete Lagoas.

Referências

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 8 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 48). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/470308>. Acesso em: 10 mar. 2023.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>.

KARAM, D.; BORGHI, E.; MAGALHÃES, P. C.; PAES, M. C. D.; PEREIRA FILHO, I. A.; MANTOVANI, E. C.; SOUZA, T. C. de; ADEGAS, F. S. **Antecipe**: cultivo intercalar antecipado. Brasília, DF: Embrapa, 2020. 120 p.

KÖPPEN, W. **Climatologia**: con un estudio de los climas de la tierra. México: Fondo de Cultura Economica, 1948. 478 p.

Resistência de híbridos experimentais de milho aos enfezamentos em Sete Lagoas, MG¹

Laura Cristiny Souza Maia⁽²⁾, Luciano Viana Cota⁽³⁾, Dagma Dionisia da Silva⁽³⁾ e Rodrigo Veras da Costa⁽³⁾

⁽¹⁾ Trabalho financiado pelo CNPq. ⁽²⁾ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽³⁾ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Resumo - Os mollicutes são os patógenos responsáveis pelos enfezamentos do milho. Dois tipos de enfezamento são conhecidos: o enfezamento-pálido e o enfezamento-vermelho. Ambos são transmitidos de forma persistente propagativa pela cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis*. A incidência de enfezamentos pode resultar em grandes perdas na produtividade do milho, podendo chegar a 100%, em função da época de infecção e da suscetibilidade da cultivar. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência genética de híbridos experimentais de milho aos enfezamentos. O experimento foi conduzido na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas, MG. O experimento foi conduzido com 94 híbridos experimentais e seis testemunhas (híbridos comerciais). Aos 90 dias após o plantio, avaliou-se a severidade dos enfezamentos, utilizando-se escala de notas variando de 1 a 6, referentes à média dos sintomas das plantas na parcela, em que 1: ausência de sintomas e 6: plantas com morte precoce causada por enfezamentos. Os genótipos de milho avaliados variam quanto ao nível de resistência aos enfezamentos. As notas médias de severidade da doença variam de 1,75 (plantas com poucos sintomas) a 6 (mais de 75% das plantas com sintomas e plantas mortas). Baseado nos resultados obtidos, os híbridos experimentais com bons níveis de resistência aos enfezamentos maior resistência aos enfezamentos (nota inferior a dois) e com alto potencial produtivo (acima de 7.500 Kg/ha) foram 1T2794, 1T2790 e 1T2789. Esses híbridos deverão ser avaliados em outros locais e regiões para avaliação da estabilidade da resistência e potencial produtividade.

Termos para indexação: enfezamentos, resistência, cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis*, manejo

Resistance of experimental hybrids to corn stunting in Sete Lagoas, MG

Abstract - Mollicutes are the pathogens responsible for corn stunting. Two types of there are known stunting plants: pale stunting and maize bushy stunt. Both are transmitted in a persistent propagative manner by the corn leafhopper *Dalbulus maidis*. The incidence of stunting can result in major losses in corn productivity, which can reach 100%, depending on the season of infection and the susceptibility of the hybrid. Thus, the objective of this work was to evaluate the genetic resistance of experimental hybrids of corn to stunting. The experiment was conducted in the experimental area of Embrapa Milho e Sorgo, located in Sete Lagoas, MG. The experiment was conducted with 94 experimental hybrids and six controls (commercial hybrids). At 90 days after planting, the severity of stunting was evaluated, using a rating scale varying from 1 to 6, referring to the average of plant symptoms in the plot, where 1: absence of symptoms and 6: plants with early death caused by stunting. Corn genotypes evaluated vary in terms of the level of resistance to stunting. The average

grades of disease severity ranges from 1.75 (plants with few symptoms) to 6 (more than 75% of plants with symptoms and dead plants). Based on the results obtained, the hybrids experimental studies with good levels of resistance to stunting, greater resistance to stunting (grade less than two) and with high productive potential (above 7,500 kg/ha) they were 1Q2794, 1Q2790 and 1Q2789. These hybrids should be evaluated in other locations and regions to evaluate resistance stability and potential productivity.

Index terms: corn stunting, resistance, corn leafhoppers, *Dalbulus maidis*, management.

Introdução

Os mollicutes são os patógenos responsáveis pelos enfezamentos do milho, doença sistêmica ocasionada pela infecção dos tecidos do floema das plantas. Dois tipos de enfezamento são conhecidos: o enfezamento-pálido e o vermelho, o primeiro causado pelo procarionte *Spiroplasma kunkelli* Whitcomb (Corn Stunt Spiroplasma) e o segundo por *Phytoplasma* (*Maize bushy stunt phytoplasma*). Ambos são transmitidos de forma persistente propagativa pela cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* DeLong & Wolcott (Homoptera: Cicadellidae) (Waquil, 1997). A incidência de enfezamentos pode resultar em grandes perdas na produtividade do milho, podendo chegar a 100%, em função da época de infecção e da suscetibilidade da cultivar (Nault, 1990).

Entre os efeitos nas plantas devidos aos enfezamentos estão redução de crescimento e desenvolvimento das plantas, proliferação e malformação de espigas, espigas improdutivas, enfraquecimento dos colmos das plantas, favorecimento de infecções dos colmos que resulta em tombamento, entre outros que irão afetar a produtividade (Oliveira; Frizzas, 2022). Segundo Waquil (1997), plântulas de milho infestadas com até 10 cigarrinhas adultas/planta sofrem redução de 40 e 62% de peso seco da parte aérea e sistema radicular, respectivamente. Assim, nas fases iniciais da lavoura, quanto maior a população de cigarrinha estiver, maior será a necessidade de proteção das plantas. De acordo com Massola Júnior et al. (1999), quanto mais cedo os sintomas se manifestarem, maiores serão os prejuízos, sendo que, para cada 1% de aumento na incidência de enfezamentos, ocorre 0,8% de redução em produção.

Em relação ao manejo, existe ainda muita dificuldade em razão da baixa eficiência de controle da cigarrinha com inseticidas, o que pode estar relacionado ao caráter migrador do inseto. Não há nenhum produto registrado para controle dos mollicutes e e ainda existem poucas informações sobre a reação das cultivares às doenças (Silva et al., 2017). Diante desses fatos, há que se considerar que a resistência genética ainda é a estratégia mais indicada para os enfezamentos.

Porém, embora existam relatos de variabilidade genética entre cultivares e trabalhos que mostram a herança da resistência, ainda faltam informações sobre a reação à doença para a grande maioria das cultivares disponíveis no mercado (Costa et al., 2019; Cota et al., 2018). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência genética de híbridos experimentais de milho aos enfezamentos em Sete Lagoas, Minas Gerais.

Material e métodos

O experimento foi conduzido na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas, MG. O experimento foi conduzido em uma área com histórico de elevada severidade na ocorrência de enfezamentos. O plantio foi realizado em abril de 2022. A adubação de plantio consistiu da aplicação de 300 kg de adubo NPK (4-30-16). Aplicou-se Carbofuran (Furadan 50 GR®) nas linhas de plantio. Aos 31 e 38 dias do plantio (DAP) foi realizada uma aplicação de Deltrametrina (Decis Ultra 100EC®) e Espinosade (Tracer ®), respectivamente, para o controle da lagarta-do-cartucho. Aos 27 e 50 DAP foram realizadas duas aplicações de ureia (100 kg/ha por aplicação).

Cada parcela experimental foi constituída de quatro linhas de 5 m, com o espaçamento de 0,8 m entre linhas e 0,2 m entre plantas. O experimento foi conduzido com 94 híbridos experimentais e seis testemunhas (híbridos comerciais) (Tabela 1). O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com duas repetições para cada genótipo.

Aos 90 dias após o plantio, avaliou-se a severidade dos enfezamentos conforme recomendação Silva et al. (2021), utilizando-se escala de notas variando de 1 a 6, referentes à média dos sintomas das plantas na parcela, em que 1: ausência de sintomas; 2: plantas com menos de 25% das folhas com sintomas, ou seja, folha avermelhada ou amarelada, ou apresentando faixas cloróticas em sua inserção; 3: plantas com 25% a 50% das folhas com sintomas; 4: plantas com 50% a 75% das folhas com sintomas; 5: plantas com mais de 75% das folhas com sintomas e 6: plantas com morte precoce causada por enfezamentos (Silva et al., 2003). Os valores de notas de severidade foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos, quando necessário, foram comparadas utilizando-se o método de agrupamento com teste de Scott & Knott ($P < 0,05$).

Resultados e discussão

Os genótipos de milho avaliados variam quanto ao nível de resistência aos enfezamentos. As notas médias de severidade da doença variam de 1,75 (plantas com poucos sintomas) a 6 (mais de 75% das plantas com sintomas e plantas mortas) (Tabela 1). Os híbridos experimentais com menores valores de severidade dos enfezamentos, nota menor que 2 (plantas com menos de 25% das folhas com sintomas, ou seja, folha avermelhada ou amarelada, ou apresentando faixas cloróticas em sua inserção), foram 1T2788, 1T2789, 1T2804, 1T2803, 1T2790, 1T2794, 1T2793, 1T2791 e 1T2792 (Tabela 1).

Quanto à produção, 58 híbridos experimentais obtiveram médias de produção maior do que a média das testemunhas utilizadas no experimento. As maiores produções (acima de 7500 Kg/ha) foram registradas nos híbridos 1T2813, 1T2851, 1T2852, 1T2794, 1T2790, 1T2824, 1T2802, 3T2807, 1T2789 (Tabela 2)

Tabela 1. Notas de severidade do enfezamento em híbridos de milho plantados em Sete Lago

GENÓTIPOS	Nota	Grupos*
1T2788, 1T2789, 1T2804, 1T2803, 1T2790, 1T2794, 1T2793, 1T2791, 1T2792	1,75-1,75	A
1T2796, 1T2802, 1QPF790 1QPF825, 1T2807, 1T2805, 1T2813, 1QPF844, 1T2854, 1T2851, 1T2850	2,25-2,75	B
1T2824, 1T2845, 1T2823, 1QPF820, 1T2826, 1QPF823, 1T2849, 1T2814, 1QPF835, AG8061 PRO2	2,25-3,1	C
1T2832, 1T2828, 1T2827, 1T2825, 1T2841, 1T2863, 1T2859, 1T2866, 1T2864, BRS 1055, 1T2846, BM270 PRO2, 1QPF819, 1T2815, 1T2798, 1T2812, 1T2810, 1T2811, 1T2817, 1T2800, 1T2799,	3,75-3,75	D
1QPF880, 1T2819, 1T2821, 1T2852, 1T2853, BRS 3042 PRO2, 1T2806, 1T2833, 1T2830, 1T2862, 1T2831	4-4,25	E
SHS7930 PRO2, 1T2843, 1T2860, 1QPF871, 1T2861, 1T2797, 1T2816, 1QPF854, 3T2808, 1T2822, 1T2795,	4,5-4,75	F
1T2840, 1T2809, 1T2865, 1T2837		
1QPF891, 1T2839, 1T2820, 1T2857, 1T2856, 1T2836, 1T2842, 1T2834, 1T2818, 1T2829, 1T2844, 1T2801, 1QPF799, 1QPF874, 1T2848	5-5,25	G
Status VipTera, 1T2835, 1QPF856, 1QPF793, 1T2838, 1T2858, 1T2855, 1T2847	5,75-6,0	H

*Grupos de médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo método de agrupamento de Scott & Knott $P < 0,05$.

Tabela 2. Produtividade de grãos (Kg/ha) em híbridos de milho plantados em Sete Lagoas, MG.

GENÓTIPOS	Prod. (Kg/ha)	Grupos
1QPF793, BRS 1055 , 1T2838, 1T2858, 1T2835, 1T2806, 1QPF790, 1QPF799, 1T2843, 1T2801, 1QPF891, Status VipTera , 1QPF835, 1T2840, 1T2847, 1T2844, 1T2797, 1T2845, 1QPF856, 1T2812, 1T2814, 1T2841, 1QPF880, 1T2800, 1T2809, 1QPF854,	1.120,0-3.869,5	A
1T2855, 1T2854, 1T2816, 1QPF820, 1QPF819, 1T2831, 1T2834, 1T2842, 1T2818, 1QPF823, BRS 3042 PRO2 , 1QPF825, 1T2837, 1QPF871, 1T2864, 1T2839, SHS7930 PRO2 , 1T2788, 1T2822, 1T2811, 1T2829, 3T2808, 1T2866, 1QPF874, 1T2862, 1T2795, 1QPF844, 1T2856, 1T2827, 1T2828, 1T2820, 1T2861, 1T2798, 1T2799, 1T2859, 1T2823, 1T2836, 1T2860	3.929,0-5.338,9	B
1T2804, 1T2865, 1T2853, 1T2848, 1T2826, 1T2825, 1T2863, 1T2832, 1T2830, 1T2803, 1T2810, 1T2821, 1T2817, 1T2849, 1T2815, 1T2805, AG8061 PRO2 , 1T2833, 1T2796, 1T2846, 1T2819, 1T2792, 1T2857, 1T2791, 1T2793, 1T2850, BM270 PRO2	5.622,4-7249,0	C
1T2813, 1T2851, 1T2852, 1T2794, 1T2790, 1T2824, 1T2802, 3T2807, 1T2789	7.511,7-9.930,0	D
Média testemunhas (BRS 1055, Status VipTera, BRS 3042 PRO2, SHS7930 PRO2, AG8061 PRO2, BM270 PRO2)	4.559,06	

*Grupos de médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo método de agrupamento de Scott & Knott $P < 0,05$.

Os enfezamentos, atualmente, estão entre as principais doenças da cultura do milho. A resistência genética é a principal estratégia para o manejo dos enfezamentos, porém as avaliações para resistência genética de milho aos enfezamentos precisam ser baseadas em

alguns fatores específicos de epidemia, como o inóculo natural proporcionado por cigarrinhas infectantes que migram de outras lavouras. O semeio deve ser preferencialmente na segunda safra ou na fase reprodutiva da safra de milho antecedente. É importante também incluir cultivar suscetível em parcelas intercaladas como indicadora e referência da doença (Oliveira et al., 2013; Sabato, 2017). Na condição onde o experimento foi conduzido tínhamos todas estas condições disponíveis, uma vez que a doença se expressou em alta intensidade nas cultivares suscetíveis.

Resultados obtidos neste trabalho corroboram com aqueles descritos na literatura quando à existência de cultivares com níveis de resistência/tolerância aos enfezamentos, caracterizando uma resistência horizontal ou poligênica (Cota et al., 2018; Costa et al., 2019). No entanto, entre as cultivares avaliadas, nenhuma foi completamente imune à doença, o que reforça a necessidade de adoção de medidas de manejo integrado para reduzir os danos provocados pelos enfezamentos na cultura do milho (Alves et al., 2020; Cota et al., 2021).

Conclusão

Baseado nos resultados obtidos, conclui-se que existe variabilidade genética quanto a resistência aos enfezamentos nas cultivares avaliadas. Os híbridos experimentais com bons níveis de resistência aos enfezamentos e com alto potencial produtivo foram: 1T2788, 1T2789, 1T2804, 1T2803, 1T2790, 1T2794, 1T2793, 1T2791, 1T2792. Os híbridos com maior potencial produtivo (acima de 7.500 Kg/ha) e maior resistência aos enfezamentos (nota inferior a dois) foram 1T2794, 1T2790 e 1T2789. Estes híbridos deverão ser avaliados em outros locais e regiões para avaliação da estabilidade da resistência e potencial produtividade.

Referências

ALVES, A. P.; PARODY, B.; BARBOSA, C. M.; OLIVEIRA, C. M. de; SACHS, C.; SABATO, E. de O.; GAVA, F.; DANIEL, H.; OLIVEIRA, I. R. de; FORESTI, J.; COTA, L. V.; CAMPANTE, P.; GAROLLO, P. R.; PALATNIK, P.; ARAÚJO, R. M. **Guia de boas práticas para o manejo dos enfezamentos e da cigarrinha-do-milho**. São Paulo: Croplife Brasil; Brasília, DF: Embrapa, 2020. 33 p.

COSTA, R. V.; SILVA, D. D.; COTA, L. V.; CAMPOS, L. J. M.; ALMEIDA, R. E. M.; BERNARDES, F. P. Incidence of corn stunt disease in off-season corn hybrids in different sowing seasons. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, e00872, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00872>.

COTA, L. V.; OLIVEIRA, I. R. de; SILVA, D. D. da; MENDES, S. M.; COSTA, R. V. da; SOUZA, I. R. P. de; SILVA, A. F. da. **Manejo da cigarrinha e enfezamentos na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2021. 16 p. Cartilha.

COTA, L. V.; SILVA, D. D. da; AGUIAR, F. M.; COSTA, R. V. da. **Resistência de genótipos de milho aos enfezamentos**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 11p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 247).

MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BEDENDO, I.; AMORIM, L.; LOPES, J. R. S.

Quantificação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido do milho em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 136-142, 1999.

NAULT, L. R. Evolution of insect pest: maize and leafhopper, a case study. **Maydica**, v. 35, n. 2, p. 165-175, 1990.

OLIVEIRA, C. M.; FRIZZAS, M. R. Eight decades of *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) in Brazil: what we know and what we need to know. **Neotropical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 1-17, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13744-021-00932-9>.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S.; NAULT, L. R. Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maze off-season in Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 147, p. 141-153, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/eea.12059>.

SABATO, E. de O. Enfezamento do milho. In: OLIVEIRA, C. M. de; SABATO, E. de O. (ed.). **Doenças em milho: insetos-vetores, mollicutes e vírus**. Brasília, DF: Embrapa, 2017. p. 11-24.

SILVA, D. D. da; AGUIAR, F. M.; COTA, L. V.; COSTA, R. V. da; MENDES, S. M. Mollicutes em milho: a diversificação de sistemas de produção pode ser a solução? In: MEDEIROS, F. H. V.; PEDROSO, L. A.; GUIMARÃES, M. de R. F.; SILVA, B. A. A. de S. e; ALMEIDA, L. G. F. de; SILVA, F. de J.; SILVA, R. L. M. da; FERREIRA, L. C.; PEREIRA, A. K. M.; COUTO, T. B. R.; GOMES, V. A.; MEDEIROS, R. M.; VEIGA, C. M. de O.; SILVA, M. de F.; FIGUEIREDO, Y. F.; GATTI, G. V. N.; NICOLLI, C. P. (ed.). **Novos sistemas de produção**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2017. p. 32-52.

SILVA, R. G.; GALVÃO, J. C.; MIRANDA, G. V.; OLIVEIRA, E. Controle genético da resistência aos enfezamentos do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 921-928, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000800004>.

SILVA, D. D. da; SOUZA, I. R. P. de; OLIVEIRA, I. R. de; MENDES, S. M.; COTA, L. V.; COSTA, R. V. da; OLIVEIRA, C. M. de; MEIRELLES, W. F.; BORDIN, I.; BIANCO R.; ANDROCIOLO, H. G.; SILVA, M. R. L. da; LEMISKA, A.; ARAÚJO, M. M. **Protocolos para experimentação, identificação, coleta e envio de amostras da cigarrinha *Dalbulus maidis* e de plantas com enfezamentos em milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2021. 23 p. Cartilha.

WAQUIL, J. M. Amostragem e abundância de cigarrinhas e danos de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) em plântulas de milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 1, p. 27-33, 1997.

Seleção de cultivares de sorgo granífero para características que promovam a saúde humana⁽¹⁾

Luana Teodoro da Silva⁽²⁾, Karla Jorge da Silva⁽³⁾, Cícero Beserra de Menezes⁽⁴⁾, Valéria Aparecida Vieira Queiroz⁽⁵⁾ e Robert Eugene Schaffert⁽⁴⁾

⁽¹⁾Trabalho financiado pelo CNPq. ⁽²⁾ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽³⁾ Doutora em genética e melhoramento de planta pela Universidade Federal de Viçosa. ⁽⁴⁾ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo. ⁽⁵⁾ Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

Resumo - No Brasil, o sorgo é usado quase que em sua totalidade para alimentação animal, mas o mercado para alimentação humana possui grande potencial de crescimento. Os grãos de sorgo são isentos de glúten e possuem sabor suave e uma variedade de compostos bioativos, como antocianinas, ácidos fenólicos, antioxidante, entre outros, os quais podem contribuir para promoção da saúde humana. Nesse sentido, a Embrapa Milho e Sorgo vem desenvolvendo uma linha de pesquisa visando avaliar e identificar genótipos de sorgo superiores nessas características, para uso na alimentação humana, sendo esse o objetivo desse trabalho. Foram avaliados 50 híbridos de sorgo granífero, 46 em fase experimental e quatro testemunhas (BRS 305, SC 319, SC 105 e A9104). Observou-se efeito significativo para a fonte de variação genótipos para todas as características avaliadas, demonstrando suficiente variabilidade entre eles. Quanto às estimativas da herdabilidade, que mostra o quanto da variação total se deve a efeitos genotípicos, observaram-se valores de alta magnitude (>97%) para todas as características. Os híbridos de sorgo 1831053, 1831061 e 1831019 possuem altos teores de tanino, fenóis totais e atividade antioxidante, podendo ser utilizados para produção de alimentos funcionais para alimentação humana.

Termos para indexação: compostos fenólicos, capacidade antioxidante, alimentos sem glúten, alimentos funcionais.

Selection of grain sorghum cultivars for traits that promote human health⁽¹⁾

Abstract - In Brazil, sorghum is used almost entirely for animal feed, but the human food market has great potential for growth. Sorghum grains are gluten-free and have a mild flavor and a variety of bioactive compounds, such as anthocyanins, phenolic acids, antioxidants, among others, which can contribute to promoting human health. In this sense, Embrapa Maize and Sorghum has been developing a line of research aimed at

evaluating and identifying sorghum genotypes superior in these characteristics, for use in human food, which is the objective of this study. Fifty grain sorghum hybrids were evaluated, 46 in the experimental phase and four controls (BRS 305, SC 319, SC 105 and A9104). A significant effect was observed for the source of variation genotypes for all the evaluated characteristics, demonstrating sufficient variability among them. Regarding heritability estimates, which show how much of the total variation is due to genotypic effects, high magnitude values (>97%) were observed for all characteristics. Sorghum hybrids 1831053, 1831061 and 1831019 have high levels of tannin, total phenols and antioxidant activity, and can be used for the production of functional foods for human consumption.

Index terms: phenolic compounds, antioxidant capacity, gluten-free foods, functional foods.

Introdução

O sorgo (*Sorghum bicolor* L.) é o quinto cereal mais importante do mundo, superado apenas por trigo, arroz, milho e cevada. O sorgo grão como alimento humano tem crescido, por não possuir glúten. Por isso, é totalmente seguro para pessoas celíacas, possui sabor neutro, uma grande vantagem na indústria de alimentos, e apresenta uma variedade de compostos bioativos, como antocianinas, ácidos fenólicos, antioxidante, entre outros (Awika et al., 2009).

Muitos desses compostos são capazes de eliminar radicais livres e modular várias vias de sinalização relevantes para a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, como obesidade e inflamação, câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (Yang et al., 2012; Girard; Awika, 2018).

Resultados de pesquisas realizadas no Brasil mostraram elevada aceitação de produtos elaborados com farinha de sorgo, comprovando, dessa forma, grande potencial do cereal para uso na alimentação humana no País. O sorgo possui grande potencial não só para ser utilizado como ingrediente na produção de alimentos sem glúten, mas também na produção de alimentos funcionais.

No Brasil, o sorgo é usado quase que em sua totalidade para alimentação animal, mas o mercado de alimentação humana possui grande potencial de crescimento, podendo o grão substituir o trigo em várias receitas. A Embrapa Milho e Sorgo desenvolveu uma linha de pesquisa com o objetivo de identificar e avaliar genótipos de sorgo que pudessem atender a esse mercado. Dentre as características avaliadas estão a atividade antioxidante e os fenóis totais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar híbridos de sorgo quanto a essas características, buscando selecionar híbridos potenciais para o mercado nacional.

Material e métodos

Foram avaliados 50 híbridos de sorgo granífero, 46 em fase experimental da Embrapa e quatro testemunhas (BRS 305, SC 319, SC 105 e A9104). BRS 305 e A9104 são híbridos e possuem tanino. Já SC 319 e SC 105 são linhagens que se destacaram em análises anteriores com altos teores de fenóis totais. Os genótipos foram plantados na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, onde foram avaliados para rendimento de grãos.

Após colhidos, os grãos inteiros de sorgo foram encaminhados ao laboratório, para obtenção da farinha de sorgo integral, com partículas de 0,5 mm. Posteriormente, a farinha foi armazenada em sacos plásticos de polietileno sob refrigeração (1 ± 4 °C) até o uso.

O extrato fenólico utilizado na análise de antocianinas totais, os compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante foram obtidos conforme metodologia descrita por Singleton et al. (1999), com modificações: 0,25 g das amostras foi extraído em 25 mL de 1% HCl /metanol (v/v) por duas horas em um shaker (Nova Ethics, 109).

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu (Kaluza et al., 1980), e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g de amostra (EAG eq/g).

Os teores totais de antocianinas foram obtidos de acordo com a metodologia de Fuleki e Francis (1968), com modificações (Barbosa et al., 2021). A absorbância das amostras foi lida a 480 nm em um espectrofotômetro (Instrutherm® Modelo UV-2000 A), e as concentrações de antocianina foram calculadas com base na absorbância da luteolinidina (480 nm) utilizando a equação $C \text{ (mol/L)} = A/\epsilon$, em que C é a concentração da amostra, A é a absorbância e ϵ é o coeficiente de extinção molar da luteolinidina, que é 29,157 (Njongmeta, 2009). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de luteolinidina (EL)/g de amostra.

A capacidade antioxidante foi determinada de acordo com Awika et al. (2003) utilizando o reagente 2,2' – azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS+) e os resultados foram expressos em μ mol de Trolox /g de amostra. Avaliou-se os taninos condensados pelo método vanilina- HCl descrito por Price et al. (1978) e os resultados demonstrados em mg de equivalentes de catequina (EC)/g de amostra.

Resultados e discussão

Observou-se efeito significativo ($p < 0,05$) para a fonte de variação genótipos para todas as características avaliadas (Tabela 1), denotando existir suficiente variabilidade entre os genótipos de sorgo.

O coeficiente de variação ficou abaixo de 20%, ressaltando a qualidade experimental satisfatória para o teste. Quanto às estimativas da herdabilidade, que mostra o quanto da variação total se deve a efeitos genotípicos, observaram-se valores de alta magnitude (>97%) para todas as características.

Tabela 1. Resumo da análise de taninos (TAN), fenólicos totais (FEN), atividade antioxidante (AA), antocianinas totais (ANT) de 50 genótipos, em Sete Lagoas, MG

FV	GL	QM			
		TAN* mg EC/g	FEN mg EAG/g	AA μ Mol TE /g	ANT μ g EL/g
Blocos	2	261,91	55,98	11.114,53	512,87
Genótipos	49	1.042,35 **	125,15 **	31.414,06 **	5.313,14 **
Erro	98	21,62	2,87	758,84	97,56
Média		52,58	19,27	321,10	59,25
CV (%)		8,84	8,80	8,58	16,67
h^2 (%)		97,93	97,70	97,58	98,16

* Taninos (TAN); fenólicos totais (FEN); atividade antioxidante (AA); antocianinas totais (ANT). CV: coeficiente de variação. ** Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Dentre os materiais avaliados, seis híbridos (1831019, 1831027, 1831037, 1831053, 1831061 e 1920010) apresentaram teores de taninos superiores a BRS 305 e SC319 (testemunhas para tanino), e todos apresentaram compostos fenólicos totais superiores ao BRS 305. A linhagem SC319 comprovou seus altos teores de tanino e fenóis totais, devendo ser inserida no programa de melhoramento para cruzamentos com linhagens-elites.

Considerando os materiais avaliados, taninos (TAN) e fenólicos totais (TP), os genótipos 1831061, 1831019 e 1831053 tiveram comportamento semelhante e foram os que mais se aproximaram da testemunha SC319.

Os genótipos CMSXS 180R, BRS 330, BRS 373, BRS 3318, BRS 310 foram classificados como de baixo teor de taninos, fenólicos totais e atividade antioxidante.

Para a característica atividade antioxidante (AA), a testemunha SC 319, apresentou os maiores valores (518,2 μ Mol TE/g), já entre os híbridos, o 1831053 obteve valor superior entre os materiais experimentais, com 448,0 μ Mol TE /g. Este híbrido está no grupo de maiores teores de taninos e fenóis totais. Os outros dois híbridos com altos teores de taninos e fenóis totais (1831061 e 1831019) obtiveram atividade antioxidante menores que o 1831053, mas similares ao BRS 305.

Os híbridos 1831057, 1831035, 1831023, 1831039 e 1831041 apresentaram as maiores concentrações de antocianinas totais, com teores bem superiores a BRS 305 e SC 319 (Tabela 2).

Os genótipos que se destacaram para altos teores de tanino, fenóis totais e atividade antioxidantes apresentaram baixa antocianina, devendo a seleção ser distinta para essa característica. Os trabalhos realizados com antocianina buscam diferenciar o grão de sorgo para alimentação humana (grão mais escuro) do grão de sorgo para alimentação animal (grão vermelho), mas os resultados de pesquisa mostram que nem sempre o grão mais escuro vai possuir mais antocianina. A seleção de sorgo com altos teores de antocianina deverá continuar, mas com objetivo de atender ao mercado de corantes naturais.

Tabela 2. Médias para as características taninos (TAN, mg EC/g), fenólicos totais (FEN, mg EAG/g), atividade antioxidante (AA, μ Mol TE /g), antocianinas totais (ANT, μ g LE/g), em Sete Lagoas, MG.

Híbridos	Tanino	FEN	AA	ANT
1831001	53,2 c	21,08 d	309,7 d	67,9 e
1831003	55,1 c	18,59 e	330,7 d	58 e
1920007	61 b	24,97 b	351,6 c	81,5 d
1831007	52,6 c	17,91 e	295,8 d	102,3 c
1831009	51,2 c	20,29 d	365,3 c	93,8 c
1831011	62,7 b	22,16 c	349,1 c	20,8 g
1831013	60,9 b	21,81 c	351,1 c	37,2 f
1831015	62,6 b	18h37 e	318,8 d	64,6 e
1920008	64,1 b	24,49 b	368,1 c	71,1 d
1831019	68,8 a	24,61 b	348,5 c	54,5 e
1831021	60,1 b	20,66 d	362,2 c	27,9 g
1831023	49 d	18,87 e	318,3 d	139,4 b
1831025	60,3 b	21,69 c	350,8 c	37,8 f
1831027	66 a	22,82 c	368,4 c	76,7 d
1831029	60,1 b	22,09 c	348,1 c	24,2 g
1831031	56,7 c	22,92 c	360,9 c	11,1 g
BRS 310	1,5 f	2,69 g	46,7 e	75,2 d
1831035	48,5 d	16,31 f	277 d	181,5 a
1831037	74,4 a	22,9 c	365,9 c	107,6 c
1831039	54 c	19,95 d	325,1 d	128,1 b
1831041	51,8 c	19,15 d	283,7 d	127,3 b
BRS 330	0,7 f	1,66 g	42 e	46,8 f
1831045	53,6 c	18,07 e	354 c	22,8 g
1831047	55 c	19,52 d	374 c	52,4 e
1831049	61,4 b	22,3 c	365,5 c	15,6 g
1831051	48,1 d	19,75 d	300,9 d	94,4 c
1831053	72,9 a	26,96 b	448 b	42,2 f
1831055	58,3 b	20,26 d	376,5 c	11,6 g
1831057	58,1 b	18,28 e	340,8 c	166,1 a
1831059	51,8 c	20,54 d	359,7 c	42,3 f
1831061	66,1 a	25,09 b	337,8 c	40,2 f
1831063	58,2 b	23,75 c	376,5 c	12,9 g
1831065	63,5 b	21,92 c	380,2 c	44,3 f
1920010	68,1 a	21,69 c	379,7 c	54,5 e
1920011	62,2 b	21,66 c	363,1 c	96,6 c
1831071	51,8 c	21,64 c	362,4 c	20,9 g
1831073	56,6 c	20,91 d	353 c	17 g
1831075	58,1 b	20,75 d	336 c	20,1 g
1831077	56,1 c	20,33 d	344,4 c	36,5 f
1831079	64,1 b	21,6 c	407,3 c	19,4 g
1831081	58,8 b	23,95 c	360,8 c	41,6 f
1831083	62,3 b	22,65 c	403,1 c	75,4 d
CMSXS 180R	0,6 f	1,01 g	38,9 e	9,3 g
BRS 305	64,6 b	19,4 d	346,6 c	65,4 e
BRS 3318	1,4 f	1,06 g	41 e	75,5 d
BRS 373	1,4 f	2,15 g	43,2 e	26,5 g
1167048	50 c	18,49 e	353,1 c	9,7 g
SC 319	66,2 a	29,82 a	518,2 a	72,8 d
SC 105	46,3 d	18,95 e	293,7 d	20,4 g
A 1904	38,1 e	15,07 f	259,2 d	120,9 b

Médias seguidas pelas mesmas letras constituem um grupo estatisticamente homogêneo pelo agrupamento de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

Conclusão

Os híbridos de sorgo 1831053, 1831061 e 1831019 possuem altos teores de tanino, fenóis totais e atividade antioxidante, podendo ser trabalhos para confecção de produtos funcionais para alimentação humana.

Referências

- AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WU, X.; PRIOR, R. L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6657- 6662, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf034790i>.
- AWIKA, J. M.; YANG, L.; BROWNING, J. D.; FARAJ, A. Comparative antioxidant, antiproliferative and phase II enzyme inducing potential of sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 6, p. 1041-1046, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.02.003>.
- BARBOSA, M. P.; RIGOLON, T. B.; BORGES, L. R.; QUEIROZ, V. V.; STRINGHETA, P. C.; BARROS, F.R. Effect of light, food additives and heat on the stability of sorghum 3-deoxyanthocyanins in model beverages. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 9, p. 4746-4755, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.15123>.
- FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. **Journal of Food Science**, v. 33, n. 1, p. 72-77, 1968. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1968.tb00887.x>.
- GIRARD, A. L.; AWIKA, J. M. Sorghum polyphenols and other bioactive components as functional and health promoting food ingredients. **Journal of Cereal Science**, v. 84, p. 112-124, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.10.009>.
- KALUZA, W. Z.; MCGRATH, R. M.; ROBERTS, T. C.; SCHRÖDER, H. H. Separation of phenolics of *Sorghum bicolor* (L.) Moench grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1191-1196, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60232a039>.
- NJONGMETA, N. L. A. **Extractability profiling and antioxidant activity of flavonoids in sorghum grain and non-grain materials**. 2009. 213 f. Tese (Doutorado) - Texas A&M University, College Station, 2009.
- PRICE, M. L.; SCOYOC, A. V.; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1214-1218, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60219a031>.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; LESTER, P. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: PACKER, L. (ed.). **Oxidants and antioxidants: part A**. New York: Academic Press, 1999. p. 152-178. (Methods in Enzymology, v. 299).
- YANG, L.; ALLRED, K. F.; GEERA, B.; ALLRED, C. D.; AWIKA, J. M. Sorghum phenolics demonstrate estrogenic action and induce apoptosis in nonmalignant colonocytes. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 3, p. 419-427, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2012.657333>.

Resposta de genótipos de milho à inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas

André Luís Martins Maia², Roberto dos Santos Trindade³, Christiane Abreu de Oliveira Paiva³, Eliane Aparecida Gomes³, Ubiraci Gomes de Paula Lana³, Sylvia Morais de Sousa Tinôco³, Jonnathan Whiny Moraes dos Santos⁴, Rafaela Ferreira de Ávila Souza⁴, Douglas Venâncio Alexandre da Silva⁴, e Isabela Figueiredo de Oliveira⁴.

¹Trabalho financiado pelo Embrapa/Finep/CNPq, ²Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas (UNIFEMM) a Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/Faped, ³ Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, ⁴ Bolsista da Embrapa Milho e Sorgo.

Resumo - O milho é um dos cereais mais importantes globalmente. No entanto, a maioria dos solos brasileiros possui baixa fertilidade natural, representando um desafio para a agricultura. Para aumentar a produtividade e reduzir o impacto ambiental, novas tecnologias, como os inoculantes microbianos, têm sido desenvolvidas. Esses inoculantes contêm microrganismos que promovem o crescimento das plantas, oferecendo uma alternativa mais sustentável em comparação aos fertilizantes químicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar híbridos de milho em pré-lançamento e comerciais quanto à responsividade à inoculação por bactérias promotoras de crescimento de plantas em condição controlada. Foram avaliados 42 híbridos de milho quanto à resposta à inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas em condições controladas. Após o período de crescimento, foram analisadas características do sistema radicular e do peso seco das plantas. Os resultados mostraram que houve variação na resposta à inoculação entre os genótipos de milho, com alguns híbridos apresentando respostas positivas, negativas ou neutras. Essa variação também foi observada quando as cepas bacterianas foram avaliadas separadamente. A interação entre as plantas e as bactérias promotoras de crescimento é influenciada por diversos fatores, incluindo o genótipo da planta e das bactérias. Embora as BPCPs possam estimular o crescimento radicular e aumentar a absorção de nutrientes, o sucesso dessa associação depende de mecanismos complexos, destacando a importância do background genético das plantas e das bactérias na regulação dessa interação.

Palavras-chave: Bioinoculante, fenotipagem, híbrido, raiz, *Zea mays*.

Response of corn genotypes to inoculation with plant growth-promoting bacteria

Abstract - Corn is one of the most important cereals globally. However, most Brazilian soils have low natural fertility, posing a challenge for agriculture. To increase productivity and reduce environmental impact, new technologies, such as microbial inoculants, have been developed. These inoculants contain microorganisms that promote plant growth, offering a more sustainable alternative

to chemical fertilizers. The objective of this study was to evaluate pre-release and commercial corn hybrids for their responsiveness to inoculation with plant growth-promoting bacteria under controlled conditions. Forty-two corn hybrids were evaluated for their response to inoculation with plant growth-promoting bacteria under controlled conditions. After the growth period, root system characteristics and plant dry weight were analyzed. The results showed variation in response to inoculation among corn genotypes, with some hybrids exhibiting positive, negative, or neutral responses. This variation was also observed when the bacterial strains were evaluated separately. The interaction between plants and growth-promoting bacteria is influenced by several factors, including the genotype of both the plant and the bacteria. Although BPCPs can stimulate root growth and increase nutrient uptake, the success of this association depends on complex mechanisms, highlighting the importance of the genetic background of both plants and bacteria in regulating this interaction.

Index terms: Bioinoculant, phenotyping, hybrid, root, *Zea mays*.

Introdução

O milho está entre os cereais mais produzidos, consumidos e exportados no mundo por causa da sua ampla utilização na alimentação humana e animal, e em indústrias de alta tecnologia (FAO, 2019). Na safra 2021/2022, o Brasil obteve um aumento de 32,8% na produção de milho, chegando a 115,66 milhões de toneladas cultivadas numa área de 21,665 milhões hectares (Conab, 2022). Apesar de o Brasil apresentar uma crescente produção deste cereal, a maior parte dos solos brasileiros apresenta baixa fertilidade natural. Além disso, cerca de 30% dos solos agricultáveis brasileiros estão na região do Cerrado, que, apesar das vantagens agrônômicas relacionadas à topografia e às condições físicas do solo, apresentam sérias limitações químicas.

O milho possui alta variabilidade genética, o que permite seu cultivo em climas tropicais, subtropicais e temperados. No entanto, os sistemas de produção atuais são altamente dependentes de insumos químicos, que aumentam o custo de produção e têm impacto ecológico, quando usados em excesso. Novas tecnologias têm sido desenvolvidas a cada ano com o objetivo de aumentar a produtividade, reduzir o impacto ambiental e promover a sustentabilidade com maior rentabilidade para os agricultores. Os microrganismos promotores de crescimento de plantas são alternativas atraentes e viáveis para aumentar a produção agrícola e fazem parte de uma nova revolução verde. Dentre os insumos biológicos mais utilizados estão os inoculantes microbianos. Um inoculante microbiano é caracterizado como um produto que contém uma ou mais cepas de microrganismos que atuam no desenvolvimento das plantas, incluindo bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) (Calvo et al. 2014). Existem diversos inoculantes comerciais disponíveis no mercado, formulados a partir de estirpes bacterianas capazes de promover aumento da produção de biomassa, do conteúdo de nutrientes e da área de superfície radicular em milho e da produção de grãos (de Sousa et al, 2020; Oliveira-Paiva et al., 2020). Os inoculantes microbianos têm sido cada vez mais utilizados na cultura do milho, por serem uma alternativa de baixo impacto ambiental que leva à maior produtividade com melhor custo-benefício do que o uso isolado de fertilizantes químicos.

Apesar do grande êxito dos bioinoculantes, há diversos parâmetros que podem influenciar a interação planta-microrganismo. As características moduladas pelas bactérias promotoras de

crescimento de plantas (BPCPs) diferem de acordo com a interação com diferentes espécies e genótipos inoculados (Vidotti et al., 2019; Velloso et al., 2020). Dessa forma, é importante compreender as características das estirpes e a resposta à inoculação com BPCPs em diferentes genótipos de milho. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar híbridos de milho em pré-lançamento e comerciais quanto à responsividade à inoculação por bactérias promotoras de crescimento de plantas em condição controlada.

Material e métodos

Sementes de 44 híbridos de milho (Tabela 1) foram inoculadas com duas cepas de *Bacillus*, previamente selecionadas como eficientes na solubilização de fosfatos. Após a inoculação, as sementes foram secas em temperatura ambiente e colocadas a seguir em papel de germinação em câmara de crescimento por sete dias. Dois híbridos foram descartados das avaliações por apresentarem desuniformidades na germinação, sendo, portanto, avaliados 42 genótipos. Após a germinação, plântulas uniformes foram transplantadas para um sistema floating, formado por bandejas contendo oito litros de solução nutritiva Hoagland meia força pH 5,65 (Liu et al., 1998), com copos de polietileno, dispostos em placas plásticas. A cada três dias, a solução nutritiva foi substituída. As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento sob condições controladas, com temperatura diurna de 27 °C e noturna de 20 °C, fotoperíodo de 12 horas e aeração contínua, onde permaneceram por quatorze dias. O delineamento foi inteiramente casualizado, com três repetições, com três plantas em cada repetição. Foram montados quatro experimentos com 14 híbridos de milho, sendo quatro híbridos comerciais usados como testemunhas (Tabela 1), com inoculação e sem inoculação em cada experimento.

Tabela 1. Genótipos de milho avaliados quanto à resposta à inoculação sob condições controladas. T: testemunhas comuns.

Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3		Experimento 4	
Genótipo		Genótipo		Genótipo		Genótipo	
1	1Q2366	11	3R2575	21	1R2539	31	1R2530
2	1Q2403	12	1R2628	22	1N1958	32	2R2642
3	1P2215	13	1Q2423	23	1R2622	33	1F640PRO2
4	3P2200	14	1Q2359	24	1R2521	34	1P2181
5	1Q2370	15	1R2629	25	1Q2427	35	1Q2400
6	1Q2473	16	1Q2425	26	1R2529	36	2R2643
7	1P2206	17	1Q2363	27	3R2593	37	BM709Pro2
8	1Q2461	18	BRS 1055	28	1R2526	38	P30F53
9	1R2536	19	1R2540	29	1R2546	39	AG8061VTPro2
10	AG8088PRO2	20	1R2620	30	1R2631	40	DKB310VTPro2
T1	DKB390VTPro2	T1	DKB390VTPro2	T1	DKB390VTPro2	T1	DKB390VTPro2
T2	BRS3042VTPro2	T2	BRS3042VTPro2	T2	BRS3042VTPro2	T2	BRS3042VTPro2
T3	SHS7930Pro2	T3	SHS7930Pro2	T3	SHS7930Pro2	T3	SHS7930Pro2
T4	AG8088VTPro2	T4	AG8088VTPro2	T4	AG8088VTPro2	T4	AG8088VTPro2

Após o término do experimento, o sistema radicular foi separado da parte aérea e foi avaliado com o software Winrhizo v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), acoplado ao escâner Epson XL 10000 equipado com unidade de luz adicional (TPU), a fim de analisar parâmetros da morfologia radicular, de acordo com de Sousa et al. (2012). Foram avaliados o volume radicular total, o diâmetro médio das raízes, a área total superficial das raízes, o volume e a área superficial das raízes com diâmetros entre 0 mm e 1 mm (superfinas), entre 1 mm e 2 mm (finas) e maior que 2 mm (grossas). Posteriormente, as raízes foram secas em estufa com circulação de ar a 65 °C durante 72 horas, e em seguida o peso seco foi aferido com uma balança de precisão.

Todas as diferenças entre as médias ajustadas dos tratamentos foram comparadas para cada característica utilizando o teste de Tukey com nível de significância 5% do programa R (versão 3.6.1), utilizando o pacote Agricolae (Mendiburu, 2015).

Resultados e discussão

Neste trabalho, diversos genótipos de milho foram avaliados com e sem inoculação com duas estirpes de *Bacillus* previamente identificadas como promotoras de crescimento de plantas e solubilizadoras de fosfatos, em condições de hidroponia, para screening precoce. O sistema hidropônico é um método rápido e eficaz para a análise da morfologia radicular e para a triagem de BPCPs no estágio de plântulas antes de experimentos em campo, os quais são mais trabalhosos e demandam maior tempo (de Sousa et al., 2021). A análise de variância das características morfológicas do sistema radicular e do peso seco para os 42 híbridos de milho avaliados com e sem inoculação com duas estirpes de BPCPs mostrou que há variabilidade entre genótipos, inoculação e experimentos (Tabela 1). Os genótipos 1R2629 e 1Q2425 não apresentaram germinação, portanto não foram considerados nas análises. Foi observado coeficiente de variação médio para a maioria das características (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para as médias das características radiculares e de peso seco para 42 genótipos de milho inoculados com duas cepas de BPCPs.

	GL	Quadrado Médio						
		C (cm)	AS (cm ²)	AS1 (cm ²)	AS2 (cm ²)	PSPA (g)	PSR (g)	PST (g)
Genótipo	41	637396***	15213,7***	5995,0***	746,11***	0,0310***	0,0043***	0,0401***
Inoculante	1	1897389***	19655,3**	14083,7***	4,73ns	0,00996ns	0,0068**	0,0339**
Experimento	3	445805*	10347,7***	3539,4*	739,36***	0,08840***	0,3335**	0,1221***
Erro	259	163781	2459,1	1198,1	100,81	0,0035	0,0008	0,004
Total	304							
CV (%)		29,69	24,54	28,38	28,65	23,54	27,18	17,96
Média Geral		1362,98	202,08	121,96	35,04	0,25	0,1	0,35

Comprimento total de raiz (C); área de superfície total de raiz (AS); áreas de superfície de raízes de 0 cm² a 1 cm² (AS1) e 1 cm² a 2 cm² (AS2); peso seco da raiz (PSR), da parte aérea (PSPA) e peso seco total (PST); ns=não significativo; *=significativo a 5%; **= significativo a 1%; ***= significativo a 0,1% de probabilidade pelo teste Tukey.

Houve resposta positiva, negativa e neutra para a inoculação com as duas cepas de BPCPs, dependendo dos genótipos de milho e das características. O híbrido 1P2215 apresentou resposta

positiva para todas as características avaliadas, enquanto os híbridos 1R2622, AG8088VTPro2, 1Q2427, 1R2530, 3R2593, P30F53, SHS7930Pro2, 1R2521, 1R2629, 2R2642, 1P2181, DKB310VTPro2, AG8061VTPro2, 1R2536, 1R2540, 1R2546 apresentaram resposta negativa à inoculação para todas as características avaliadas (Figura 1). Os demais genótipos apresentaram respostas tanto positivas quanto negativas, dependendo da característica avaliada. Esta variação foi também observada quando avaliados genótipos de milho inoculados com duas cepas bacterianas separadamente (Velloso et al., 2020). As BPCPs podem estimular o crescimento radicular nos estágios iniciais do desenvolvimento das plantas, promovendo uma maior absorção de nutrientes e o crescimento das plantas, compensando o custo inicial da associação planta-bactéria. No entanto, o estabelecimento da associação planta-BPCPs envolve mecanismos complexos, sendo que o background genético da planta hospedeira e das bactérias desempenha um papel crucial na regulação dessa associação (Vidotti et al., 2019).

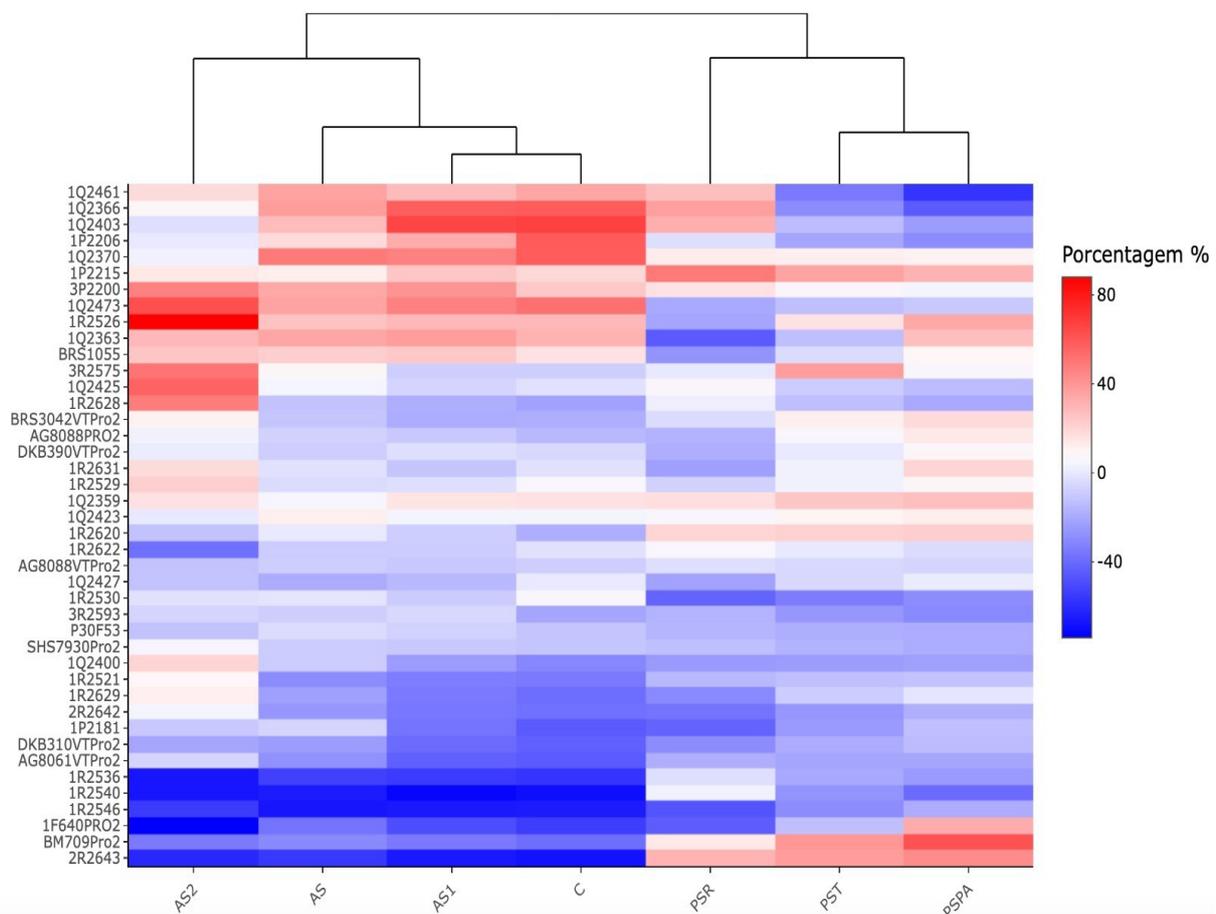


Figura 1. Mapa de calor de genótipos de milho inoculados com duas cepas de BPCPs comparados com controle não inoculado. C: comprimento total de raiz (cm); AS: área de superfície total de raiz (cm²); AS1 e AS2 (cm²): áreas de superfície de raízes de 0 a 1 cm² e 1 a 2 cm², respectivamente; PSR: peso seco de raiz (g); PSPA: peso seco de parte aérea (g); PST: peso seco total (g).

Conclusão

A magnitude da resposta à inoculação com bactérias promotoras de crescimento é dependente do genótipo da planta. O genótipo 1P2215 apresentou resposta positiva para todas as características radiculares e de peso seco em ensaios conduzidos em solução nutritiva. Para melhor entendimento de respostas genéticas, fisiológicas e morfológicas de cultivares de milho à

inoculação, e das possíveis interações entre plantas e cepas de BPCPs, são necessários ensaios complementares, inclusive de resposta em campo.

Referências

- CALVO, P.; NELSON, L.; KLOPPER, J.W.; (2014). **Agricultural uses of plant biostimulants**. Plant Soil, v. 383, n. 1-2), p. 3-41.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). (2023). Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>.
- DE SOUSA, S. M.; CLARK, R. T.; MENDES, F. F.; DE OLIVEIRA, A. C.; DE VASCONCELOS, M. J. V.; PARENTONI, S. N.; KOCHIAN, L. V.; GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, J. V. (2012). **A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize**. Functional Plant Biology, v. 39, n. 11, p. 925-935, 2012.
- DE SOUSA, S.M.; DE OLIVEIRA, C.A.; ANDRADE, D.L.; CARALHO, C.G.; RIBEIRO, P. V.; PASTINA, M.M.; MARRIEL, I.E.; LANA, U.G.P.; GOMES, E.A. (2021). **Tropical *Bacillus* strains inoculation enhances maize root surface area, dry weight, nutrient uptake and grain yield**. Journal of Plant Growth Regulation, v. 40, p. 867-877.
- FAO - **Food and Agricultural Organization (2023)**. FAOSTAT, FAO Statistical Databases. Disponível em:<<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>
- OLIVEIRA-PAIVA, C.A.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; COTA, L.V.; SANTOS, F.C.; DE SOUSA, S.M.; LANA, U.G.P.; OLIVEIRA, M.C.; MATTOS, B.B.; ALVES, V.M.C.; RIBEIRO, V.P.; VASCO-JUNIOR, R. **Recomendação agrônômica de cepas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2020 (Circular Técnica).
- LIU, C.; MUCHHAL, U.S.; UTHAPPA, M. et al. (1998). **Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus**. Plant Physiol. v. 116, p. 91–99.
- MENDIBURU, F.D. agricolae: **Statistical Procedures for Agricultural Research**. R Package V. 1.2-3. (2015). Disponível em: <<https://cran.rproject.org/web/packages/agricolae/index.html>> .
- VELLOSO, C.C.V.; OLIVEIRA-PAIVA, C.A.; GOMES, E.A.; LANA, U.G.P.; CARVALHO, G.C.; GUIMARÃES, L.J.M.; PASTINA, M.M.; DE SOUSA, S.M. (2020). **Genome-guided insights of tropical *Bacillus* strains efficient in maize growth promotion**, FEMS Microbiology Ecology, v. 9, n. 9, f157.
- VIDOTTI, M. S.; MATIAS, F. I.; ALVES, F. C.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, P.; BELTRAN, G. A.; BURGUEÑO, J.; CROSSA, J.; FRITSCHÉ-NETO, R. (2019). **Maize responsiveness to *Azospirillum brasilense*: Insights into genetic control, heterosis and genomic prediction**. PloS One, v. 14, n. 6, p. e0217571.

Seleção de linhagens de sorgo resistentes ao pulgão-da-cana-de-açúcar⁽¹⁾

Iasmim Marrony Damasceno Reis⁽²⁾, Marcelo Augusto Vieira Santos⁽³⁾, Isadora Cristina Martins Oliveira⁽⁴⁾, Paula Silva Mirante⁽⁵⁾, Douglas Graciel dos Santos⁽⁶⁾, Natalia Cristina Damasceno⁽⁶⁾, Simone Martins Mendes⁽⁷⁾ e Cícero Beserra de Menezes⁽⁷⁾

⁽¹⁾Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig. ⁽²⁾ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽³⁾ Doutorando em Produção Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa. ⁽⁴⁾ Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade Federal de Viçosa. ⁽⁵⁾ Doutorando em Biotecnologia da Universidade Federal de São João del-Rei. ⁽⁶⁾ Bolsista DTI-C Embrapa/CNPq. ⁽⁷⁾ Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo.

Resumo - O cultivo de sorgo granífero está em expansão contínua, em razão das características agrônômicas da cultura, que permitem uma alta adaptação aos diferentes ambientes. Porém, apesar do crescimento, o desempenho produtivo apresenta-se abaixo do real potencial, como consequência dos ataques do pulgão-da-cana-de-açúcar, uma das principais pragas do sorgo. O objetivo do trabalho foi selecionar linhagens que apresentassem melhor resistência ao pulgão, observando-se os dados de infestação e correlacionando com os danos causados, e ratificar a metodologia empregada. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 78 linhagens, incluindo duas testemunhas, consideradas fonte de resistência à praga, em Sete Lagoas, MG. Os caracteres avaliados foram infestação e injúria, baseados em uma escala de notas de 1 a 6. A maioria das linhagens apresentou notas baixas para injúria, expressando um bom nível de tolerância ao patógeno. Dentre as linhagens, destacaram-se 14 plantas, que, apesar de obterem alta infestação, apresentaram poucos danos. A resistência dessas linhagens necessita de mais pesquisas para comprovação da tolerância ao pulgão. Foi possível autenticar a metodologia empregada por permitir a distinção das linhagens de sorgo como suscetíveis e resistentes ao pulgão.

Termos para indexação: *Melanaphis sorghi*, metodologia, resistência.

Selection of sorghum lines resistant to sugarcane aphid⁽¹⁾

Abstract- The cultivation of grain sorghum is continually expanding, due to the agronomic characteristics of the crop, which allow it to adapt to different environments. However, despite the growth, production performance is below the real potential, because of attacks by the sugarcane aphid, one of the main pests of sorghum. The objective of the work was to

select strains that presented better resistance to the aphid, observing infestation data and correlating it with the damage caused, and ratifying the methodology used. A completely randomized design was used, with 78 lines, including two controls, considered a source of resistance to the pest, in Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil. The characters evaluated were infestation and injury, based on a rating scale from 1 to 6. The majority of lines presented low scores for injury, expressing a good level of tolerance to the pathogen. Among the lineages, 14 plants stood out, which, despite having high infestation, showed little damage. The resistance of these strains requires further research to prove tolerance to the aphid. It was possible to authenticate the methodology used by allowing the distinction of sorghum lines as susceptible and resistant to the aphid.

Index terms: *Melanaphis sorghi*, methodology, resistance.

Introdução

A área cultivada de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] vem apresentando um crescimento significativo nos últimos anos, em razão do maior conhecimento de manejo da cultura, da valorização dos grãos no mercado, dos híbridos com maior rendimento e da intensificação das pesquisas, tornando-se um dos cinco principais cereais cultivados no mundo (FAO, 2019).

O sorgo é de origem africana e possui alta adaptabilidade às condições edafoclimáticas do Brasil. Associado a isso, as inúmeras funções, como alimentação humana e animal, fazem o sorgo obter destaque na produção de grãos nacional, principalmente na segunda safra, em cultivos de sequeiro (Menezes et al., 2021). Por outro lado, há uma dificuldade no alcance do máximo potencial de rendimento do sorgo em razão de manejos inadequados, principalmente com relação a pragas, ressaltando-se os prejuízos agronômicos provenientes do pulgão-da-cana-de-açúcar (Avellar et al., 2022).

O pulgão-da-cana-de-açúcar (*Melanaphis sorghi*) é a principal praga do sorgo no Brasil, causando perdas econômicas significativas para a cultura. Sua alta taxa reprodutiva aliada à sucção da seiva, ao instalar seus estiletes no interior dos vasos do xilema e do floema, causam o enfraquecimento ou mesmo a morte da planta, e como consequência grandes prejuízos aos produtores. Por causa do seu hábito alimentar, há uma redução da taxa fotossintética da planta e na capacidade de absorção nutricional, impedindo o enchimento dos grãos ou a não emissão da panícula, além de ser vetor de vírus responsáveis por doenças de importância agronômica (Fernandes et al., 2021). Ademais, o pulgão proporciona o aparecimento da fumagina (mofo-preto) mediante a produção da substância açucarada e pegajosa (*honeydew*), cobrindo toda a face da planta, o que prejudica a fotossíntese e a transpiração.

Tendo isso em vista, os programas de melhoramento vegetal visam o desenvolvimento de novos genótipos com resistência ao pulgão, auxiliando no manejo mais eficaz para essa

praga (Menezes, 2021).

O presente trabalho teve como objetivo validar a metodologia de seleção de cultivares de sorgo resistentes ao pulgão em tubetes, e selecionar as linhagens mais resistentes para uso no programa de melhoramento de sorgo granífero da Embrapa.

Material e métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação, na estação da Embrapa Milho e Sorgo, situada em Sete Lagoas, MG. Foram avaliadas 78 linhagens de sorgo, incluindo duas testemunhas (Tx2783R e SC110), consideradas fontes de resistência ao pulgão-da-cana-de-açúcar. Os tratamentos foram conduzidos em tubetes (7 x 27 cm), com substrato tipo tropstrato, em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Cada tubete foi considerado uma parcela.

Ao se atingir o estágio de quatro folhas completas, realizou-se a infestação. Efetuaram-se três infestações, com intervalo de três dias. Na sequência, foram feitas as avaliações de injúrias, com periodicidade de sete dias.

As avaliações de infestação (INF) e de injúrias (INJ) foram baseadas em uma escala de notas de 1 a 6, na qual a nota 1 designa plantas com uma porcentagem de danos de 10% a 20%, consideradas com menor infestação e/ou menos injúria. O aumento progressivo de notas, até 5, significa um nível de dano de até 100%, até atingir a nota 6, que significa a morte da planta (Fernandes et al., 2021). Salienta-se que a alta porcentagem de infestação não significa um maior dano na planta, uma vez que dependerá do genótipo, se será expressa maior suscetibilidade aos ataques dessa praga agrícola.

Durante o ensaio, executou-se o monitoramento diário, além dos cuidados com relação à irrigação e à obtenção de dados.

Para a análise dos resultados, adotou-se o software R (R Core Team, 2023), e as médias de INJ1, INJ2 e INJ3 foram transformadas para $\sqrt{x+0,5}$. Posteriormente, as médias de todas as características foram comparadas utilizando o teste de Scott & Knott ao nível de 5% de probabilidade, de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij},$$

em que:

Y_{ij} = valor observado do genótipo i na repetição j .

μ = média geral; G_i = efeito do genótipo, com $i = 1$ a 78.

e_{ij} = erro experimental associado aos valores observados (Y_{ij}).

Resultados e discussão

Os resultados da análise de variância para as características de infestação e injúria estão apresentados na Tabela 1. As linhagens apresentaram significância a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$) para ambas as características, nas três avaliações, confirmando que

existe variabilidade entre os genótipos para resistência a pulgão. O coeficiente de variação (CV) para as avaliações de injúria foi menor que 30%, sendo 25,94 o menor e 28,26 o maior coeficiente, que pode ser considerado um índice de média precisão experimental, considerando a natureza dos dados obtidos no presente estudo (Pimentel-Gomes, 2009).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para infestação (INF) e injúria (INJ) de pulgão, em três avaliações, em linhagens de sorgo. Sete Lagoas, MG, 2023.

GL	QM						
		INF1	INJ1	INF2	INJ2	INF3	INJ3
Genótipos	77	1,82*	0,18*	2,18*	0,20*	2,06*	0,24*
Resíduo	156	0,81	0,12	0,81	0,13	0,86	0,12
Total	233						
Média		4,64	3,3	4,74	3,46	4,95	3,89
CV (%)		19,47	28,08	19	28,26	18,71	25,94

¹Médias transformadas para $\sqrt{x+0,5}$; * = significativo a 5% de probabilidade e ns = não significativo pelo teste F.

Nas três avaliações de injúrias (Tabela 2), as testemunhas TX2783R e SC110 apresentaram as notas baixas para infestação e injúrias, mostrando a resistência dessas linhagens e validando a metodologia de avaliação. Esses resultados corroboram com os encontrados por Fernandes et al. (2021), que constataram a resistência genética dessas linhagens ao pulgão.

Tabela 2. Notas para infestação e injúria de linhagens de sorgo, quando infestadas com pulgão-da-cana-de-açúcar, em três avaliações, em Sete Lagoas, MG, 2023.

TRAT	INF1	INJ1	INF2	INJ2	INF3	INJ3
G13	4a	2b	4a	1b	5a	1b
G28	5a	1b	5a	1b	5a	2b
G29	3b	2b	2b	2b	2b	2b
G33	4a	2b	4a	2b	4a	2b
G40	5a	3b	5a	2b	4a	2b
G43	4a	2b	4a	2b	5a	3b
G44	5a	2b	5a	2b	5a	3b
G48	4a	2b	4a	4a	5a	2b
G53	5a	3a	5a	2b	4a	2b
G55	4a	2b	5a	2b	5a	2b
G56	4a	3b	5a	3b	5a	2b
G58	5a	2b	5a	3b	5a	2b
G62	2b	1b	2b	2b	2b	2b
G70	4a	1b	4a	1b	4a	2b
G71	4a	2b	4a	2b	4a	3b
G75	4a	2b	5a	3b	4a	2b
Tx2783	3b	1b	2b	2b	2b	1b
SC110	1b	1b	2b	2b	2b	3b

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

Na Tabela 2, estão representados os materiais com melhores notas nas características de injúria. Os outros materiais foram descartados por efeito de maior suscetibilidade, por mostrarem maiores danos ou por alcançarem 100% no percentual da característica avaliada. Sendo assim, ao se analisar a primeira injúria (INJ1), observou-se que a maioria dos tratamentos mencionados na tabela apresentaram menores notas de injúrias, assemelhando-se às testemunhas, apesar de algumas apresentarem alta infestação. Ressalta-se que o material G53 obteve uma maior taxa de injúria nesse primeiro momento.

Ao se analisar a segunda injúria (INJ2), todos os tratamentos, exceto o G48, apresentaram uma taxa de injúria semelhante às testemunhas. Esse mecanismo de defesa da planta, que confere um maior bloqueio aos danos ocasionados pelo pulgão, é de extrema relevância para seleção de cultivares, uma vez que essa praga desencadeia uma série de prejuízos para a produção da panícula.

Ao se analisar a última injúria (INJ3), todos os tratamentos conferiram menores danos, pelos valores de injúrias serem iguais aos das testemunhas. Por consequência, esse resultado qualifica esses tratamentos como fontes de alta capacidade defensiva ao pulgão-da-cana-de-açúcar (Fernandes et al., 2021).

Pode-se observar na Tabela 2 que quase todos os materiais, exceções feitas para as testemunhas e os materiais G29 e G62, apresentaram alta infestação e baixa injúria, o que significa bom nível de tolerância ao pulgão. Novas avaliações com plantas adultas serão realizadas para confirmação dessa tolerância em planta adulta, na fase de produção de grãos.

Conclusão

A metodologia de avaliação para pulgão-da-cana-de-açúcar realizada em tubetes e em fase de plântulas permitiu a separação de linhagens de sorgo quanto à resistência ou suscetibilidade.

Quatorze linhagens com alta infestação apresentaram baixa nota para injúria, mostrando bom nível de tolerância ao inseto.

Referências

AVELLAR, G. S.; MENDES, S. M.; MARRIEL, I. E.; MENEZES, C. B. de; PARRELLA, R. A. da C.; SANTOS, D. G. Resistance of sorghum hybrids to sorghum aphid. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, e264139, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.264139>.

FAO. **Faostat 2019**. Roma, 2019. Disponível em: <http://www.faostat.org/site/567/>. Acesso em: 20 ago. 2023.

FERNANDES, F. O.; SOUZA, C. da S. F.; AVELLAR, G. S. de; NASCIMENTO, P. T.; DAMASCENO, N. C. R.; SANTOS, N. M. dos; LIMA, P. F.; SANTOS, V. M. C. dos; SIMEONE, M. L. F.; PARRELLA, R. A. da C.; MENEZES, C. B. de; OLIVEIRA, I. R. de; MENDES, S. M. **Manejo do pulgão da cana-de-açúcar (*Melanaphis sacchari/sorghii*) na cultura do sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2021. 24 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico, 249).

JULIO, B. H. M.; PARRELLA, N. N. L. D.; SANTOS, C. V.; SILVA, K. J. da; CAMPOS, A. F.; REIS, I. M. D.; MIRANTE, P. S.; MENEZES, C. B. de. Phenotypic selection of grain sorghum restorer lines. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 21, e1230, 2022.

JULIO, B. H. M.; REIS, Y. M. D.; CAMPOS, A. F.; SILVA, K. J. da; SANTOS, C. V. dos; MENEZES, C. B. de. Adaptabilidade e estabilidade de híbridos de sorgo granífero. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 33., 2022, Sete Lagoas. **Brasil: 200 anos de independência: sustentabilidade e desafios para a cadeia produtiva de grãos: resumos**. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2022.

MENEZES, C. B. de (ed.). **Melhoramento genético de sorgo**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. 546 p.

MENEZES, C. B. de; FERNANDES, E. de A.; PARRELLA, R. A. da C.; SCHAFFERT, R. E.; RODRIGUES, J. A. S. Importância do sorgo para o abastecimento de grãos, forragem e bioenergia no Brasil. In: MENEZES, C. B. de (ed.). **Melhoramento genético de sorgo**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. p. 13-58.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15. ed. Piracicaba: FEALQ, 2009. 451 p.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing: version 4.2.0**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2023. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 15 mar. 2023.

Apoio

