

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA  
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE MILHO**

**Laiana Lana Bentes Lobo**

**Engenheira Agrônoma**

**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA  
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE MILHO**

**Laiana Lana Bentes Lobo**

**Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

**2018**

L799p Lobo, Laiana Lana Bentes  
Potencial de bactérias endofíticas na promoção de crescimento em plantas de milho / Laiana Lana Bentes Lobo. -- Jaboticabal, 2018  
vii, 55p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018  
Orientador: Everlon Cid Rigobelo  
Banca examinadora: Leonardo Lucas Madaleno, Maria Rita Scotti  
Muzzi  
Bibliografia

1. *Bacillus subtilis*. 2. Fixação de nitrogênio. 3. Inoculação. 4. Produtividade. 5. Solubilização de fósforo. 6. *Zea mays*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:633.15

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

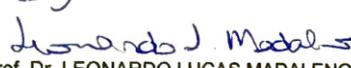
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE MILHO

AUTORA: LAIANA LANA BENTES LOBO

ORIENTADOR: EVERLON CID RIGOBELLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO  
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dr. LEONARDO LUCAS MADALENO  
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP

  
Profa. Dra. MARIA RITA SCOTTI MUZZI  
Instituto de Ciências Biológicas / Belo Horizonte/MG

Jaboticabal, 10 de agosto de 2018

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Laiana Lana Bentes Lobo** – nascida em 14 de setembro de 1990, na cidade de Belém-PA, Brasil. Filha de Cristiano Bernardo da Cruz Lobo Filho e Lia Silvia Bentes da Silva. Em junho de 2016 se graduou como engenheira agrônoma pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM – Manaus), durante a graduação foi bolsista de iniciação científica e estagiou no Laboratório de princípios bioativos de origem microbiana / UFAM, tendo aí sua primeira experiência na área de microbiologia agropecuária, atuando em temas como isolamento, purificação, microcultivo e identificação de fungos filamentosos endofíticos e fitopatogênicos e controle biológico de fungos fitopatogênicos. Em agosto de 2016 ingressou no curso de Mestrado da Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) / Unesp – Jaboticabal. Dando continuidade aos estudos na área de microbiologia agropecuária, trabalhando atualmente com bactérias promotoras do crescimento de plantas.

## **EPIGRAFE**

“Amor...

Pois de amor andamos todos precisados, em dose tal que nos alegre,  
nos reumanize, nos corrija, nos dê paciência e esperança,  
força, capacidade de entender, perdoar, ir para frente.

Amor que seja navio, casa, coisa cintilante que nos vacine contra o feio, o errado,  
o triste, o mau, o absurdo e o mais que estamos vivendo ou precisando”

(Carlos Drummond de Andrade)

## DEDICO

A Deus por ser meu melhor amigo e a origem da minha força, me  
permitindo completar mais uma etapa na vida.

A minha família por sempre acreditar em mim.

Em especial ao meu avôhai, Álvaro Nunes da Silva (*in memorian*), um exemplo de  
vida que me ensinou respeito, persistência e o amor presente em cuidar e repartir  
tudo, até seu abacate.

E ao meu amado irmão, Ismael que sempre será meu pequeno alecrim.

## AGRADECIMENTOS

**A Deus** pelas bênçãos diárias

**Ao meu orientador professor Everlon Cid Rigobelo** por me aceitar no grupo e acreditar no meu trabalho, sempre incentivando a buscar o melhor, não apenas na pesquisa, mas também como ser humano, obrigada por todo aprendizado e paciência.

**Aos membros da banca examinadora** pelo seu tempo e contribuição.

**A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal** pela oportunidade de realização do curso.

**A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudos durante todo mestrado.

**Aos Professores do curso de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da UNESP - FCAV**, pelas disciplinas ministradas e pelo aprimoramento acadêmico.

**Aos companheiros de laboratório e amigos** em especial a **Vanessa Moura, Natália Sarmanho, Roberta Mendes, Luan Adames, Paola Escobar, Fernanda Nascimento e Noemi** por todos os momentos compartilhados e por fazerem o ambiente de trabalho e a vida bem mais felizes.

**A minha mãe Lia**, por todo esforço, dedicação e amor dados a mim, que este trabalho represente um pequeno presente.

**A toda minha família**, em especial a minha avó, **Maria Selma**, as minhas primas e tias amadas, **Israely, Thayza, Leona, Andreza, Mara e Silvéria (in memorian)** pelo apoio transmitido nas horas difíceis, para as quais liguei inúmeras vezes para desabafar e vocês me ouviram com todo amor.

**Ao Bruno**, grande amigo e meu amor, obrigado por toda sua ajuda, estímulo e companhia em todos os momentos, juntos conquistaremos nossas metas.

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2. 1. A cultura do milho .....	3
2.1.1. Produção de Milho no Brasil .....	5
2.1. 2. Importância dos nutrientes nitrogênio e fósforo para a cultura do milho....	6
2.2. Bactérias promotoras do crescimento em plantas .....	8
2.2.1. Mecanismos diretos de promoção de crescimento .....	8
2.2.1.1. Fixação biológica do nitrogênio.....	8
2.2.1.2. Solubilização de fósforo .....	10
2.2.1.3. Produção de fitormônios .....	12
2.2.1.4. (ACC) deaminase .....	12
2.2.2. Mecanismos indiretos .....	13
2.2.2.1. Biocontrole .....	13
2.3. Gênero <i>Bacillus</i> .....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1. Experimento I – Seleção de inoculantes em casa de vegetação .....	18
3.1.1. Delineamento experimental .....	19
3.1.2. Avaliações na planta.....	20
3.1.2.1. Altura e massa seca .....	20
3.1.2.2. Teor de clorofila nas folhas.....	20
3.1.2.3. Concentração de nitrogênio na parte aérea e na raiz .....	20

3.1.2.4. Concentração de fósforo na parte aérea e na raiz.....	21
3.1.3. Avaliações no solo .....	22
3.1.3.1. Preparação das amostras.....	22
3.1.3.2. Fósforo solúvel.....	22
3.1.3.3. Contagem de <i>Bacillus</i> spp. ....	23
3.1.4. Seleção dos isolados para experimento em campo.....	23
3.2. Experimento II – Seleção de inoculantes em campo .....	23
3.2.1. Plantio.....	23
3.2.2. Delineamento experimental .....	25
3.2.3. Avaliações na planta.....	25
3.2.3.1. Massa seca e concentrações de nitrogênio e fósforo da parte aérea ....	25
3.2.3.2. Produtividade do milho .....	26
3.2.4. Avaliações no solo .....	26
3.3. Análise dos dados.....	26
4. RESULTADOS .....	27
4.1. Experimento I – Seleção de inoculantes em casa de vegetação .....	27
4.2. Seleção dos isolados .....	32
4.3. Experimento II – Seleção de inoculantes em campo .....	33
5. DISCUSSÃO .....	38
6. CONCLUSÕES .....	43
7. REFERÊNCIAS.....	44

## POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE MILHO

**RESUMO** – O milho é uma das culturas mais cultivadas em todo o mundo e atualmente o grande desafio na produção agrícola é manter os índices de produtividade, reduzindo o custo de produção, e ainda minimizar o impacto ambiental causado pelo uso excessivo de fertilizantes químicos. Nesse contexto a utilização das bactérias promotoras de crescimento de plantas pode ser uma estratégia eficaz para a prática de uma agricultura mais econômica e sustentável. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* quanto a ação de promoção de crescimento de plantas de milho em casa de vegetação e no campo. O experimento foi dividido em dois. O experimento I, foi conduzido em casa de vegetação, constituído de 11 tratamentos, compostos por dez isolados de *Bacillus*, sendo um de *B. amyloliquefaciens*, um de *B. velezensis*, oito de *B. subtilis* e um controle sem inoculação, dispostos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. O isolado BS-320 proporcionou incremento na altura, este juntamente com o isolado BS-248 apresentou maior acúmulo em massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR). Em relação às concentrações de nitrogênio (N) na planta os isolados BS-290, BS-320 e BS-248 promoveram um aumento deste macronutriente nas raízes, e as concentrações fósforo (P) na parte aérea também foram aumentadas pelos isolados BA-001, BS-320. Nas avaliações no solo as maiores quantidades de P solúvel no solo foram proporcionadas pelos isolados BA-001 e BS-320, e quanto ao número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bacillus* spp. no solo todos os tratamentos inoculados foram maiores significativamente em relação ao controle. Três isolados de *B. subtilis* (BS-320, BS-290 e BS-248) apresentaram melhores resultados nos parâmetros avaliados no experimento em casa de vegetação e por isso foram selecionados para o experimento II em campo, constituído de quatro tratamentos compostos pelos três isolados de *B. subtilis* selecionados e um controle sem inoculação, dispostos em delineamento em blocos casualizados com seis repetições. Em campo, o isolado BS-248 foi superior ao controle para concentração de N na parte aérea, BS-290 aumentou as concentrações de N e P da parte aérea, além de P solúvel no solo e também teve maior número de UFC de *Bacillus* spp. no solo comparado com o controle. O isolado BS-320 aumentou a concentração de P na parte aérea e promoveu aumento significativo na produtividade do milho, o que fortemente sugere sua utilização como um inoculante biológico nessa cultura. Embora o presente estudo tenha comparado oito isolados de *B. subtilis*, o comportamento de cada isolado foi diferente e os isolados BS-248, BS-290 e BS-320 se mostraram efetivos na promoção de crescimento do milho possibilitando de maneira efetiva uma redução do custo de produção sem reduzir a produtividade e causando menos danos ao meio ambiente.

**Palavras-chave:** *Bacillus subtilis*, fixação de nitrogênio, inoculação, produtividade, solubilização de fósforo, *Zea mays*

## POTENTIAL OF ENDOPHITIC BACTERIA IN PROMOTING GROWTH OF MAIZE PLANTS

**ABSTRACT** – Maize is one of the most cultivated crops in the world and the current challenge is maintain productivity rates, lowering production costs and minimizing the environmental impact of the excessive use of chemical fertilizers. In this context the use of plant growth promoting bacteria can be an effective strategy for the practice of a more economic and sustainable agriculture. The present study aimed to evaluate the growth activity of endophytic bacteria of the genus *Bacillus* on maize plants at greenhouse and field conditions. Two experiments were carried out. The experiment I, was conducted at greenhouse, consisting of 11 treatments, ten of them containing *Bacillus* strains, one of *B. amyloliquefaciens*, one of *B. velezensis*, eight of *B. subtilis* and one control without inoculation, arranged in a completely randomized design with three replicates. The BS-320 increased plant height, and together BS-248 promoted an increase in shoot dry matter (SDM) and root dry matter (RDM). In relation nitrogen (N) content in shoot, BS-290, BS-320 and BS-248, increased the rates of this macronutrient in root, while the content of phosphorus (P) in the roots was increased by BA-001 and BS-320. In relation to the number of colonies forming units (CFU), all isolates presented higher numbers than the control. Three isolates of *B. subtilis* (BS-320, BS-290 and BS-248) showed better results for the evaluated parameters at greenhouse conditions and were selected for the experiment II in the field, consisting of four treatments, three of them containing *B. subtilis* and a control without inoculation, arranged in a randomized block design with six replicates. In the field, BS-248 was superior to the control for the concentration of N in shoot; BS-290 increased the shoot concentration of N and P, besides P soluble in the soil and also had a greater number of *Bacillus* CFU in the soil compared to control. BS-320 increased the concentration P in the shoot and the yield of gains, which is so advantageous for a biological inoculant. Although the present study compared eight isolates of *B. subtilis*, the behavior of each isolate was different and the isolates BS-248, BS-290 and BS-320 were effective in promoting the growth of maize enabling the reduction of costs production without decrease yield and being more environmentally friendly at the same time.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, inoculation, nitrogen fixation, yield, phosphorus solubilization, *Zea mays*.

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Estádios vegetativos e reprodutivos da planta de milho .....	4
<b>Tabela 2.</b> Descrição dos tratamentos utilizados no experimento I .....	18
<b>Tabela 3.</b> Análise do solo anterior a implantação do experimento I.....	19
<b>Tabela 4.</b> Descrição dos tratamentos utilizados no experimento II .....	25
<b>Tabela 5.</b> Resultado dos parâmetros avaliados em casa de vegetação para os isolados de <i>B. subtilis</i> (BS-248, BS-290 e BS-320).....	33

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Parcela experimental e área útil .....	24
<b>Figura 2.</b> Altura (A), massa seca de parte aérea MSPA (B) e massa seca de raiz MSR (C) de plantas de milho inoculadas com dez isolados de bactérias endofíticas do gênero <i>Bacillus</i> e um controle sem inoculação aos 60 DAE. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). .....	28
<b>Figura 3.</b> Teor de clorofila (A), concentração de N na parte aérea (B) de plantas de milho inoculadas com dez linhagens de bactérias endofíticas do gênero <i>Bacillus</i> e um controle sem inoculação aos 60 DAE. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). A ausência de letras indica a falta de significância estatística entre os tratamentos de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). .....	29
<b>Figura 4.</b> Concentração de N na raiz de plantas de milho inoculadas com dez linhagens de bactérias endofíticas do gênero <i>Bacillus</i> e um controle sem inoculação aos 60 DAE. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). .....	30
<b>Figura 5.</b> Concentração de P na parte aérea (A) e P solúvel no solo (B) de plantas de milho inoculadas com dez isolados de bactérias endofíticas do gênero <i>Bacillus</i> e um controle sem inoculação aos 60 DAE. As barras representam o erro padrão da media. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). A ausência de letras indica a falta de significância estatística entre os tratamentos de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). .....	31
<b>Figura 6.</b> Número de unidades formadoras de colônias de <i>Bacillus</i> spp. – UFC no solo dos vasos com plantas de milho inoculadas com dez linhagens de bactérias endofíticas do gênero <i>Bacillus</i> e um controle sem inoculação aos 60 DAE. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). .....	32
<b>Figura 7.</b> Acúmulo de massa seca na parte aérea de plantas de milho inoculadas com três linhagens de <i>B. subtilis</i> endofíticos (BS-248, BS-290 e BS-320) e um controle sem inoculação. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de	

Duncan ( $p \leq 0,05$ ). A ausência de letras indica a falta de significância estatística entre os tratamentos de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). .....34

**Figura 8.** Concentração de N na parte aérea (A), concentração de P na parte aérea (B) e P solúvel no solo (C) de plantas de milho inoculadas com três linhagens de *B. subtilis* endofíticas e um controle sem inoculação. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). .....35

**Figura 9.** Produtividade de plantas de milho inoculadas com três linhagens de *B. subtilis* endofíticas (BS-248, BS-290 e BS-320) e um controle sem inoculação. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). .....36

**Figura 10.** Número de unidades formadoras de colônias – UFC no solo das áreas de plantio de milho inoculadas com três isolados de *B. subtilis* endofíticas (BS-248, BS-290 e BS-320) e um controle sem inoculação. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). .....37

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho possui elevada importância econômica no cenário da produção agrícola mundial, sendo consumido e cultivado em diversas regiões do mundo devido às suas qualidades nutricionais. O Brasil se destaca como o terceiro maior produtor e segundo maior exportador mundial deste cereal, sendo grande concorrente para os Estados Unidos e China, segundo a United States Department of Agriculture - USDA (2016). O milho é considerado uma das principais culturas produtoras de grãos, especialmente durante a safra (outono-inverno). Isso demonstra a importância estratégica do Brasil na oferta desse produto, tendo em vista o aumento do consumo mundial. A estimativa para produção da segunda safra 2017/2018 está em torno de 63.261,6 milhões de toneladas de grãos de milho (CONAB, 2017).

Para manter a alta produtividade da cultura o uso de fertilizantes ricos em nitrogênio e fósforo possui grande importância econômica pela relação direta aos custos de produção e em determinadas condições, podem causar impacto ambiental por promoverem a salinização do solo, contaminação de lençóis freáticos e a eutrofização de corpos d'água (Carvalho e Zabet, 2012). Considerando-se tais fatos, torna-se importante a busca de estratégias que possam reduzir a utilização destes fertilizantes/ou melhorar a eficiência de absorção, sem diminuição da produtividade agrícola e sem afetar negativamente o ambiente.

Na busca por alternativas que diminuam o problema exposto, muitos avanços têm sido alcançados nas pesquisas com micro-organismos capazes de fixar no solo o nitrogênio atmosférico e disponibilizar o fósforo para as plantas (Knoth et al., 2013; Zafar et al., 2012). Nesse contexto, a utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) é promissora, pois estas beneficiam as plantas diretamente no crescimento e/ou indiretamente reduzindo a incidência de doenças de plantas (Aydi Ben Abdallah et al., 2017).

Entre estas, existem as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) e algumas são capazes de entrar no interior da raiz estabelecendo como endófitos (Oliveira et al., 2010), podendo ser denominadas bactérias endofíticas

capazes de promover o crescimento de plantas. Apesar dos diferentes nichos ecológicos, as rizobactérias de vida livre e as endofíticas utilizam alguns dos mesmos mecanismos para promover o crescimento da planta (Doty, 2013). Ambas podem influenciar positivamente o crescimento das plantas e mostrar resistência a ampla gama de patógenos vegetais (Wang et al., 2009), através de mecanismos como fixação biológica de nitrogênio (FBN), a produção de fitormônios, síntese de sideróforos e a solubilização de fosfato, além de outros benefícios indiretos para o desenvolvimento das plantas (Bhattacharyya e Jha, 2012; Sgroy et al., 2009).

Dentre as BPCP o gênero *Bacillus* é constituído por inúmeras espécies de bactérias rizosféricas e endofíticas com habilidades de síntese de fitormônios que podem favorecer crescimento das raízes e aumento de pêlos radiculares (Angulo et al., 2014; Araújo e Hungria, 1999). A aplicação em plantas de milho contribui para o crescimento, desenvolvimento e a nutrição da planta (Araujo e Guerreiro, 2010; Lin et al., 2018). *Bacillus* spp. compreendem as bactérias Gram positivas, capazes de formar endósporos resistentes a fatores adversos como elevada temperatura, radiação e desidratação, o que favorece seu uso como biofertilizantes agrícolas (Holt et al., 1994). Assim, a utilização de *Bacillus* spp. na forma de inoculantes biológicos é uma alternativa para aumentar a eficiência da utilização dos nutrientes pela planta, visando reduzir métodos tradicionais de fertilização mineral e o uso indiscriminado de defensivos químicos na agricultura atual.

Portanto, no presente trabalho avaliou-se o efeito de isolados bacterianos endofíticos de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. velezensis* quanto ao seu potencial de promoção de crescimento na cultura do milho em casa de vegetação para seleção e, depois de alguns isolados selecionados, em condições de campo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2. 1. A cultura do milho

Estima-se que o milho (*Zea mays*) começou a ser cultivado entre 5.000 a 7.000 anos atrás, tendo origem nas Américas, possivelmente no México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos. Nestas regiões foram encontradas populações naturais das subespécies de milho, sendo uma das culturas mais antigas. Logo depois do descobrimento da América, o milho foi levado a Europa, onde era cultivado em jardins, até que seu valor alimentício tornou-se conhecido, passando então, a ser plantado em escala comercial. Atualmente encontramos plantações de milho espalhadas por todas as três Américas o que demonstra a sua alta diversidade genética e ampla adaptação (Fancelli et al. , 2015; Freitas, 2001).

O milho é um cereal cultivado em mais de 160 países, em todo o mundo é uma cultura versátil adaptada em variadas condições agroclimáticas. Contribuindo não apenas na cesta de alimentos devido a seu alto valor energético e qualidades nutricionais, mas também como material básico de processamento. (Marag e Suman, 2018).

Pertencente à família Poaceae, o milho é uma espécie anual, monóica, pertencente ao grupo das plantas C-4, ou seja, tem alta taxa de fotossíntese líquida e alta afinidade ao CO<sub>2</sub>, além de apresentar ampla adaptação a diferentes condições ambientais. Cada planta de milho desenvolve de 20-21 folhas totais, floresce cerca de 65 dias após a emergência e atinge sua maturidade fisiológica cerca de 125 dias após a emergência. Todas as plantas geralmente seguem um mesmo padrão geral de desenvolvimento. O sistema de estádios (Tabela 1) divide o desenvolvimento da planta em estádios vegetativos e reprodutivos (Ritchie et al., 2003). Durante a fase vegetativa, cada estágio é definido de acordo com a formação visível do colar na inserção da bainha da folha com o colmo. Assim, a primeira folha de cima para baixo, com o colar visível, é considerada completamente desenvolvida (César e Durães, 2006).

**Tabela 1.** Estádios vegetativos e reprodutivos da planta de milho

<b>VEGETATIVO</b>	<b>REPRODUTIVO</b>
<b>VE</b> , Emergência–Ocorre de 4 a 5 dias em temperatura e umidade adequadas. Ocorre quando a planta expõe a extremidade do coleóptilo e o mesocótilo para de crescer	<b>R1</b> , Embonecamento e polinização– Estádio iniciado quando os estilos-estigmas (cabelos) estão visíveis. A polinização ocorre quando o grão de pólen liberado é capturado por um dos estilos-estígmias.
<b>V1</b> , 1ª Folha desenvolvida	<b>R2</b> , Grão Bolha d’água–Início da acumulação de amido. Umidade de 85% nos grãos.
<b>V2</b> , 2ª Folha desenvolvida	<b>R3</b> , Grão Leitoso – Ocorre 12 a 15 dias após a polinização. O grão terá uma aparência amarela e, no seu interior, um fluido de cor leitosa. Cerca de 80% de umidade
<b>V3</b> , 3ª Folha desenvolvida	<b>R4</b> , Grão Pastoso – Ocorre cerca de 20 a 25 dias após a emissão dos estilos-estigmas. O fluido interno dos grãos passa de um estado leitoso para uma consistência pastosa
<b>V4</b> , 4ª Folha desenvolvida	<b>R5</b> , Grão Formação do dente - Aparecimento de uma concavidade na parte superior do grão,designada de “dente”. Transição do estado pastoso para o farináceo.
<b>V(n)</b> , n° Folhas desenvolvidas	<b>R6</b> , Maturidade fisiológica - Grãos alcançam o máximo de acumulação de peso seco e vigor, ocorre 50 a 60 dias após a polinização
<b>VT</b> , Pendoamento - último ramo do pendão completamente visível (inflorescência masculina). Neste estágio, a planta atinge o máximo desenvolvimento e crescimento.	

A composição média em base seca do grão é de 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibra e 4% de óleo. O grão de milho é formado pelo endosperma, constituído principalmente do amido; pelo embrião, no qual se concentram quase as totalidades dos lipídios, além de quantidades importantes de proteínas e açúcares; pelo pericarpo, composto principalmente de fibras, e pela ponta (Cruz et al., 2008). Por estas características nutricionais é principalmente utilizado para a alimentação animal e humana, no entanto, a importância econômica é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização também na indústria e como bioenergia, se destacando como a maior fonte de etanol do mundo.

Utilizado na produção de alimentos básicos como fubás, farinhas, canjicas e óleos, também empregado em produtos mais elaborados, como xarope de glucose (utilizado na produção de balas, gomas de mascar, doces em pasta etc.), maltodextrinas (destinadas a produção de aromas e essências, sopas desidratadas, produtos achocolatados e outros) e corantes caramelo (para produção de refrigerantes, cervejas, molho etc.). O seu uso ultrapassa a fronteira alimentícia por meio, por exemplo, dos amidos industriais, que podem ser utilizados na produção de papelão ondulado, adesivos e fitas gomadas. O etanol produzido a partir do milho também tem importância global. Nos Estados Unidos, é a principal fonte de etanol do país. (Fancelli et al., 2015).

### **2.1.1. Produção de Milho no Brasil**

O milho é o principal cereal cultivado no Brasil, apresentando duas safras, com duas épocas de plantio: plantio de verão (primeira safra), ocorrendo em período chuvoso e a segunda safra, chamada de safrinha, que é plantada quase sempre após a soja precoce. As maiores regiões produtoras são as regiões Centro–Oeste e o Sul. Com a proximidade do fim da colheita, a produção para a primeira safra 2017/18 se confirma na casa dos 25,6 milhões de toneladas e a produção nacional de segunda safra estimativa de produção de 63,261 milhões de toneladas (CONAB, 2018).

Em janeiro de 2017, uma área de aproximadamente 16 milhões de hectares (28,5% da área total cultivada com grãos no Brasil) foi destinada à cultura no país, com uma produtividade média de 5.249 kg ha<sup>-1</sup> e produção total de 84,5 milhões de toneladas, havendo perspectiva global de aumento na demanda e no preço do grão (CONAB, 2017). Cerca de 2,25 milhões de hectares plantados com milho no Brasil (14% da área cultivada com milho) são destinados à produção de silagem, uma atividade cada vez mais significativa na produção de alimento para as atividades pecuárias (Pereira, 2013).

### **2.1. 2. Importância dos nutrientes nitrogênio e fósforo para a cultura do milho**

A grande demanda dessa cultura para diversos usos já citados resulta nas necessidades de manter-se a produção ou aumentá-la, melhorar os solos e a eficiência da adubação, tudo isso sem aumentar os custos ou agredir o meio ambiente. Para manter os altos rendimentos da cultura do milho, torna-se imprescindível o fornecimento de nitrogênio (N) visto que, a deficiência de N pode acarretar em perdas de produtividade de 14 a 80 % (Fancelli e Dourado Neto, 2008).

O N é um nutriente de alta demanda, exerce importante papel nos processos bioquímicos da planta, uma vez que é constituinte de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucléicos, fitocromos e clorofila (Fornasieri Filho, 2007). As plantas de milho apresentam maior demanda por N a partir do estágio com quatro a cinco folhas expandidas. O suprimento insuficiente nessa experimento pode reduzir a diferenciação do número de óvulos nos primórdios da espiga e o número de espigas por planta e, com isso, afetar negativamente o rendimento de grãos (Mengel e Barber, 1974).

A cultura do milho remove grandes quantidades de N e usualmente requer o uso de adubação nitrogenada em cobertura para complementar a quantidade suprida pelo solo, quando se desejam produtividades elevadas. Resultados de experimentos conduzidos no Brasil, sob diversas condições de solo, clima e sistemas de cultivo, mostram resposta generalizada do milho à adubação

nitrogenada. Em geral, 70 a 90% dos ensaios de adubação com milho realizados em campo, no Brasil, apresentaram respostas positivas à aplicação de nitrogênio (Cruz et al., 2008).

Diante da crescente demanda por fertilizantes nitrogenados, surge a necessidade de buscar alternativas para diminuir as perdas, alternativas que aumentem a eficiência da utilização de N. Uma forma de melhorar a utilização desse nutriente pelo milho é através da fixação biológica de nitrogênio (FBN), visto que esta possui função muito importante nos sistemas de produção agrícolas existindo estimativas de que o N fixado contribua com cerca de 17% para suprir as necessidades nutricionais em gramíneas (Moreira e Siqueira, 2006).

Além do N, o fósforo (P) é um elemento essencial para a cultura do milho, pois está envolvido em diversas funções metabólicas importantes na planta. Sua deficiência prejudica o crescimento vegetativo e devido a dinâmica no solo o fósforo é um dos elementos mais limitantes nos solos tropicais e subtropicais (Raij e Cantarella, 1997).

As doses recomendadas de P são altas, em função da baixa eficiência (20 a 30%) de aproveitamento desse nutriente pela cultura. Resultado da alta capacidade de fixação do P adicionado ao solo através de mecanismos de adsorção e precipitação, reduzindo a disponibilidade às plantas. Outro fator que deve ser levado em conta é a demanda de P pela cultura. Plantas de intenso desenvolvimento, de ciclo curto como o milho, requerem maior nível de P em solução e reposição mais rápida do P adsorvido que as plantas de culturas perenes. Para o milho, considera-se que, para cada tonelada de grãos produzida, são exportados 10 kg de  $P_2O_5$  (Cruz et al., 2008)

No ciclo do P no solo os micro-organismos fazem papel essencial ajudando a tornar este elemento em forma disponível para as plantas (Khan et al., 2007), isso ocorre através de mecanismos como produção de enzimas extracelular e exsudados de ácidos orgânicos (Beddington, 2010; Glick, 2012).

Portanto, acredita-se que a utilização de inoculantes bacterianos é uma opção promissora nas mudanças no modo de produção, atuando de maneira a aumentar a produtividade, além de melhorar a qualidade dos solos, reduzir os custos efetivando

a utilização de adubos nitrogenados e fosfatados, somando a isto a preservação ambiental.

## **2.2. Bactérias promotoras do crescimento em plantas**

As bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCP) podem estar presentes na rizosfera, nos tecidos das plantas ou no solo. Podendo ser classificadas como rizosféricas, endofíticas ou de vida livre e apesar dos diferentes nichos ecológicos os mesmos mecanismos para promover o crescimento das plantas podem ser utilizados (Ahmad et al. , 2008; Doty, 2013).

BPCP são capazes de afetar diretamente ou indiretamente o metabolismo das plantas fornecendo substâncias que normalmente estariam pouco disponíveis, estas são capazes de fornecer nitrogênio, fósforo, ferro e produzir hormônios tais como, auxinas, giberelinas, citocininas e etileno e reduzindo a incidência de doenças de plantas(Bashan e De-Bashan, 2005).

A utilização das BPCP em condições naturais de cultivo é essencial após o conhecimento das suas promissoras características em condições controladas, pois os testes em condições de cultivo servem para viabilizar estas bactérias a serem utilizadas como inoculantes para plantas (Pérez-Montaña et al., 2014). Muitos gêneros de BPCP vem sendo estudados nessas condições, como: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Azotobacter*, *Staphylococcus* e *Azospirillum* (Bhattacharyya e Jha, 2012; Glick, 2012; Mahmood et al., 2016).

### **2.2.1. Mecanismos diretos de promoção de crescimento**

#### **2.2.1.1. Fixação biológica do nitrogênio**

Os mecanismos diretos utilizados pelas BPCP incluem a capacidade de aumentar a nutrição das plantas, através da fixação biológica de nitrogênio (FBN),

disponibilizando nitrogênio para a planta (Vermeiren et al., 1999). O primeiro relato de que bactérias são responsáveis pela FBN em vegetais foi descrita por Beijerinck (1888), No Brasil estes organismos vêm sendo estudados desde 1956 por Boddey e Dobereiner (1988) com a finalidade de incrementar produtividade às culturas de interesse agrícola e foi na década de 80 que ficou comprovado os efeitos benéficos relacionados à disponibilização de nitrogênio em espécies de plantas não leguminosas, mostrando que estas também se associam a estes micro-organismos.

Conhecidos como diazotróficos, principalmente bactérias e arqueias, estes micro-organismos realizam a FBN por meio do complexo enzimático da nitrogenase, uma enzima altamente conservada que compreende duas metaloproteínas, FeMo-proteína e Fe-proteína (Newton, 2000, Dixon e Kahn, 2004). A maior parte da fixação biológica de nitrogênio é realizada pela atividade da nitrogenase de molibdênio, que é encontrada em todos os diazotróficos (Dobbelaere et al., 2003).

Os genes denominados *nif* são os responsáveis pela FBN, são encontrados tanto em sistemas simbióticos quanto em sistemas livres (Vermeiren et al., 1999). Nos diazotróficos, os genes *nif* são tipicamente encontrados em um aglomerado de cerca de 20-24kb com sete operons que codificam 20 proteínas diferentes (Glick, 2012). No entanto, bactérias fixadoras de N não simbióticas fornecem apenas uma pequena quantidade do N fixado que a planta hospedeira associada a bactéria requer.

As plantas podem assimilar N do solo como nitrito, nitrato ou amônia. Estas formas de nitrogênio não estão abundantes na maioria dos solos e a adubação nitrogenada é frequentemente perdida por lixiviação. Bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> como *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, podem estabelecer simbioses formando nódulos nas raízes de plantas leguminosas, como soja, ervilha, amendoim e alfafa, nas quais convertem N<sub>2</sub> em amônia, que pode ser usada pela planta como nitrogênio (Murray, 2011). No entanto, este processo é praticamente limitado a culturas leguminosas. Por outro lado, várias bactérias não simbióticas foram identificadas como fixadores de N<sub>2</sub> de vida livre (*Azospirillum*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bacillus polymyxa*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* ou *Herbaspirillum*). Estas BPCP em potencial, podem fertilizar várias plantas agrônomicas importantes incluindo o milho (Boddey et al., 1986, 1995; Silva et al., 2016). Nas plantas não leguminosas a associação e

realização da FBN por várias bactérias diazotróficas, em simbiose endofítica, foi estudada e descrita por Dobereiner (1968).

O estabelecimento da simbiose envolve interação complexa entre hospedeiro e simbiote (Bourassa et al., 2017) o mesmo pode ocorrer com os endofíticos, pois estes têm uma associação íntima com a planta e encontram condições favoráveis, uma vez que, colonizam o interior das plantas, para a fixação eficaz de  $N_2$  e o fornecimento de nitrogênio fixado para as células vegetais.

### **2.2.1.2. Solubilização de fósforo**

O fósforo é outro macronutriente essencial para a planta sendo indispensável para o crescimento e produção vegetal, tendo papel importante em processos como a fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, divisão celular, além de contribuir para o crescimento das raízes, qualidade dos frutos, grãos e formação das sementes. No entanto, geralmente se encontra em formas insolúveis no solo e, portanto, não estão diretamente disponíveis para a planta (Khan et al., 2009).

A quantidade do P total encontrado na maioria dos solos pode ser grande, entretanto, processos geoquímicos e biológicos podem transformar os fosfatos naturais em formas estáveis, fixado, combinado com outros elementos como cálcio, ferro ou alumínio, formando compostos não assimiláveis pelas plantas. Portanto apesar do grande reservatório de P, as formas disponíveis para as plantas são baixas, porque a maioria do P no solo se encontra em formas insolúveis, enquanto as plantas absorvem apenas duas formas os ânions  $H_2PO_4^-$  e  $HPO_4^{2-}$  (Bhattacharyya e Jha, 2012).

Algumas BPCP do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* ou *Enterobacter* podem solubilizar fosfatos do solo através da produção de ácidos orgânicos, fosfatases e fitases (Drogue et al., 2012). Neste contexto, organismos acoplados com atividade de solubilização de fosfato, frequentemente chamados de micro-organismos solubilizadores de fosfato, podem fornecer as formas disponíveis de P para as

plantas se tornando uma opção ecologicamente segura e economicamente razoável para melhorar a produção agrícola (Angulo et al., 2014).

Os principais mecanismos de solubilização de P empregados pelos micro-organismos do solo incluem a liberação de complexos ou compostos de dissolução mineral e também liberação de enzimas extracelulares e a liberação de P durante a degradação do substrato orgânico (McGill e Cole, 1981)

O principal mecanismo de solubilização de fosfato inorgânico, como observado em muitos experimentos, é a produção de compostos de dissolução mineral, como ácidos orgânicos, sideróforos, prótons, íons hidroxila e CO<sub>2</sub>, reduzindo o pH para a liberação de P (Rodríguez e Fraga, 1999, Sharma et al., 2013) Outros mecanismos de solubilização de fosfato mineral por micro-organismos incluem a produção de ácidos inorgânicos (como os ácidos sulfúrico, nítrico e carbônico) e a produção de substâncias quelantes. No entanto a eficácia dos ácidos inorgânicos e das substâncias quelantes na liberação de fósforo no solo é menor do que a dos ácidos orgânicos (Kim et al. 1997)

A mineralização do P orgânico é um processo biológico que desempenha um papel importante no ciclo de fósforo. Diferentes grupos de enzimas estão envolvidas neste processo. Os primeiros grupos de enzimas são as fosfatases (Nannipieri et al., 2011). Estas enzimas podem ser ácidas ou alcalinas (Jorquera et al., 2011).

Outra enzima envolvida no processo de mineralização do P orgânico é a fitase. Esta enzima é responsável pela liberação de fósforo de materiais orgânicos no solo (sementes de plantas e pólen) que são armazenados sob a forma de fitato. A degradação do fitato pela fitase libera fósforo em uma forma disponível para uso na planta. (Richardson e Simpson, 2011).

Vários estudos relataram o isolamento de bactérias solubilizadoras de fosfato de solos, entre elas, endofíticas capazes de aumentar a concentração de P no solo além de favorecer o aumento da diversidade microbiana no solo. Acredita-se que os endofíticos podem se adaptar ao ambiente do solo e promover a liberação de P, confirmando que estes são importantes para a solubilização de fosfatos. (Chenet et al., 2014).

### 2.2.1.3. Produção de fitormônios

As BPCB podem ser distinguidas conforme sua característica utilizada na promoção do crescimento, uma destas é a de fitoestimulação, ou regulação do crescimento vegetal, definindo que estas podem ser responsáveis pela síntese de fitormônios como auxinas, citocininas e giberelinas que estimulam o crescimento das plantas. Por exemplo, o *ácido indol-3-acético* (AIA) aumenta a biomassa do sistema radicular e, portanto, melhora a absorção de nutrientes (Drogue et al., 2012; Lugtenberg e Kamilova, 2009).

Geralmente, o AIA interfere nos processos fisiológicos das plantas e afeta a divisão, extensão e diferenciação de células vegetais; estimula a germinação de sementes e tubérculos; aumenta a taxa de desenvolvimento do xilema e da raiz; o aumento da área e comprimento da superfície da raiz proporciona à planta maior acesso aos nutrientes do solo, controla processos de crescimento vegetativo, além disso, pode influenciar na maior exsudação radicular que fornece nutrientes adicionais para apoiar o crescimento de bactérias da rizosfera (Glick, 2012)

Várias estirpes bacterianas foram relatadas por sua capacidade em promover o crescimento radicular pela produção de AIA (Long et al. , 2008). A auxina é uma das moléculas cruciais, regulando a maioria dos processos de plantas direta ou indiretamente (Tanimoto, 2005).

### 2.2.1.4. (ACC) deaminase

Geralmente, o etileno é um metabólito essencial para o crescimento normal e desenvolvimento de plantas (Khalid et al., 2006). Este hormônio do crescimento vegetal é produzido endogenamente por aproximadamente todas as plantas e também é produzido por diferentes processos bióticos e abióticos nos solos, sendo importante na indução de variadas mudanças fisiológica nas plantas, como a queda das folhas e amadurecimento dos frutos.

Em altas concentrações, o etileno induz processos celulares que levam à inibição do crescimento da raiz e do caule, juntamente com a senescência prematura, resultando conseqüentemente no pior desempenho da cultura (Van Doorn e Reid, 1992; Woodson et al., 1985).

Além de ser um regulador de crescimento vegetal, o etileno também foi estabelecido como um hormônio do estresse. Sob condições como salinidade, seca, presença de metais pesados e patogenicidade, o nível endógeno de etileno é significativamente aumentado, o que afeta negativamente o crescimento total da planta como já citado. (Bhattacharyya e Jha, 2012; Saleem et al., 2007). Altos níveis de etileno, produzidos sob condições de estresse, podem deter certos processos, como o alongamento da raiz ou a fixação de nitrogênio em algumas culturas e causar senescência prematura (Ahmad et al., 2013; Glick, 2012)

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas que possuem a enzima ACC deaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase), que facilita o crescimento e desenvolvimento das plantas, diminuindo os níveis de etileno, induzindo tolerância ao sal e reduzindo o estresse hídrico nas plantas (Nadeem et al., 2014).

Vários gêneros bacterianos foram caracterizados como portadores dessa enzima, tais como *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* (Zahir et al., 2008). As BPCP com a ação da ACC deaminase podem degradar o etileno, encurtando o ciclo de deterioração e reconstruir um sistema radicular saudável possibilitando que a planta suporte alguns estresses ambientais como hídrico e salino (Glick, 2012; Mahmood et al., 2016; Saleem et al., 2007).

## **2.2.2. Mecanismos indiretos**

### **2.2.2.1. Biocontrole**

As BPCP podem ser classificadas em dois grupos diferentes, como visto até aqui. O primeiro grupo inclui cepas bacterianas que possuem a capacidade de

sintetizar substâncias promotoras de crescimento de plantas (fitormônios, enzimas e sideróforos) inibir a síntese de etileno, FBN, solubilização de fosfato e ferro. Conseqüentemente melhorando a tolerância das plantas ao estresse hídrico, salino ou toxicidade de metais e altas cargas de pesticidas. Um segundo grupo capaz é capaz de diminuir ou prevenir os efeitos deletérios dos micro-organismos fitopatogênicos (Bashan e Holguin, 1998).

A colonização da rizosfera e estabelecimento bem-sucedido nesta são um pré-requisito para o biocontrole eficaz. Por exemplo, as bactérias endofíticas pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (Melnick et al., 2008, Prieto et al., 2011). Compant et al. (2005) e Lugtenberg et al. (2001) esclarecem que estes são adequados agentes de biocontrole, pois têm a vantagem de estar relativamente protegidos do ambiente competitivo do solo, além de, geralmente, crescer no mesmo tecido vegetal que os patógenos.

A atuação no biocontrole contra agentes patogênicos é o principal mecanismo indireto de promoção do crescimento de plantas em rizobactérias. Em geral, a competição por nutrientes, a indução da resistência sistêmica e a produção de metabólitos antifúngicos são os principais modos de atividade de biocontrole em BPCP (Glick, 2012; Lugtenberg e Kamilova, 2009).

Algumas estirpes de BPCP desempenham papel proeminente na supressão de amplo espectro de micro-organismos fitopatogênicos e os mecanismos que contribuem para o biocontrole são competição, antibiose contra os fungos, e a indução de uma resistência sistêmica no hospedeiro, assim como motilidade, respostas quimiotáticas e a síntese de sideróforos também são propriedades que limitam o crescimento de patógenos na rizosfera (Ryan et al., 2008).

Além disso, estão envolvidos em outros mecanismos como compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por BPCP, estão fortemente envolvidos na melhoria do crescimento das plantas e induzem resistência sistêmica a patógenos; várias espécies bacterianas, de diversos gêneros, incluindo *Bacillus*, produzem COVs que influenciam o crescimento das plantas. Acetoína e 2,3-butanodiol sintetizados por *Bacillus* são os mais conhecidos destes compostos e são

responsáveis por melhorias significativas no crescimento das plantas (Batista, 2017).

Em termos de BPCP, o modo de ação pode ser rotulado de biopesticidas, controlando agentes fitopatogênicos, principalmente para a produção de metabólitos que contribuem para a antibiose e propriedades antifúngicas utilizadas como sistemas de defesa. O mecanismo envolveria a produção de enzimas hidrolíticas, das quais dois exemplos são quitinases e glucanases. Os principais componentes da parede celular fúngica são constituídos por quitina e beta-glucana, assim as quitinases e as bactérias produtoras de beta-glucanases inibiriam o crescimento fúngico (Kumar et al., 2010; Kumar et al. , 2012). Além de exibir a produção de quitinases e beta-glucanases, *Pseudomonas* spp. inibem *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora capsici*, dois dos patógenos mais destrutivos do mundo. O gênero *Bacillus* spp. também possui relato de agente de controle biológico eficaz (Gong et al., 2006).

### **2.3. Gênero *Bacillus***

*Bacillus* é um gênero de bactérias Gram-positivas, em formato de bastonete e que possuem a capacidade de formar endósporos, que são estruturas dormentes estáveis e resistentes a condições adversas por período maior de tempo, o que torna esse gênero interessante para ser utilizado como inoculante microbiano (Joung e Côté, 2002; Toyota, 2015). Segundo Vessey (2003) preparações contendo células vivas ou latentes de micro-organismos é o que podemos classificar como inoculantes microbianos ou bioinoculantes, estes quando aplicados às sementes, superfície vegetal ou solo, colonizam a rizosfera ou interior da planta e promovem seu crescimento por aumentar a disponibilidade de elementos nutricionalmente importantes através de processos biológicos diretos ou indiretos, ou ambos. Os membros do gênero *Bacillus* estão entre as bactérias benéficas exploradas como pesticidas microbianos, fungicidas ou fertilizantes. Os produtos à base de *Bacillus* representam a classe mais importante de produtos microbianos para uso fitossanitário comercialmente disponível (Batista, 2017)

BPCP do gênero *Bacillus* podem aumentar a disponibilidade mineral de compostos como nitrogênio, fósforo e ferro nos solos após a colonização. Espécies de rizobactérias do gênero *Bacillus*, incluindo *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumiluse* *B. subtilis* foram reportadas como positivas para FBN com base na atividade da nitrogenase (XIE et al., 1998). O gênero *Bacillus* é um dos que mais proporcionam característica de solubilização de fosfato (Oliveira et al., 2009). A solubilização de fosfato aumenta a absorção de fósforo pelas plantas, incrementa a produção de aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas e hormônios favoráveis ao solo e a ainda auxilia nutrição das plantas (Souchie et al., 2005).

Entre este gênero de bactérias, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. cereus* são as espécies mais eficazes no controle de doenças de plantas através de vários mecanismos (Francis et al., 2010; Melnick et al., 2008)

A espécie *B. subtilis* pode atuar no biocontrole de nematóides, podendo ser utilizada no manejo de culturas econômicas, visando a reduçãodos efeitos deletérios do parasita (Bin e Guan-Lin, 2005). Porém o efeito benéfico do uso de *B. subtilis* não é somente devido ao antagonismo proporcionado aos patógenos. A bactéria produz substâncias promotoras do crescimento como fitormônios, melhorando assim a nutrição das plantas. Dentre os fitormônios que *B. subtilis* produz estão as giberelinas (Zhang et al., 2016) e a auxinas (Boronin et al.,1993).

Estudos que testam em diferentes culturas a inoculação de *Bacillus* e trazem bons resultados mostram uma aparente não-especificidade a um único hospedeiro vegetal (Araújo et al., 2005; Batista, 2012)

No entanto, os *Bacillus* promissores quanto à promoção de crescimento de plantas devem ter as características avaliadas em diferentes ambientes, com hospedeiros diferentes, para garantir a bioatividade e entender as interações que contribuem para garantir melhores resultados em termos de desenvolvimento vegetal.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi dividido em dois experimentos (I e II), o primeiro correspondente à seleção de inoculantes em casa de vegetação e o segundo à seleção de inoculante em campo. Ambos os testes foram realizados em Jaboticabal, no Estado de São Paulo. O clima da região, segundo classificação de Köppen e Geiger é Aw (clima tropical com estação seca de inverno) com temperatura média de 21.7 °C. e com pluviosidade média anual em torno de 1340 mm, tendo menor pluviosidade no inverno que no verão. O solo predominante na região é classificado como latossolo vermelho eutrófico, textura argilosa (EMBRAPA, 1999), e portanto foi o solo utilizado nos experimentos.

O experimento I foi realizado em casa de vegetação com inoculação de dez isolados de *Bacillus* spp. (Tabela 2) e um controle sem tratamento, no período de 60 dias após a emergência (DAE); o experimento II foi conduzido em campo utilizando três isolados de *Bacillus subtilis* selecionados em casa de vegetação, estes três isolados foram comparados com um controle sem inoculação durante o período de safrinha.

Em ambos experimentos o material genético vegetal utilizado foram sementes de milho do híbrido comercial 2B587PW Dow Agro Sciences® com finalidade para grãos, tolerante à seca, caracterizado pelo porte baixo, ciclo precoce e recomendado por resistência Helminthosporiose (*Exserohilum turcicum*), Ferrugem e outros.

**Tabela 2.** Descrição dos tratamentos utilizados no experimento I

<b>Tratamentos</b>	<b>Linhagens</b>	<b>Código</b>
1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	BA-001
2	<i>B. velezenses</i>	BV-188
3	<i>B. subtilis</i>	BS-248
4	<i>B. subtilis</i>	BS-263
5	<i>B. subtilis</i>	BS-274
6	<i>B. subtilis</i>	BS-287
7	<i>B. subtilis</i>	BS-290
8	<i>B. subtilis</i>	BS-291
9	<i>B. subtilis</i>	BS-309
10	<i>B. subtilis</i>	BS-320
11	Controle sem inoculação	Controle

### 3.1. Experimento I – Seleção de inoculantes em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Microbiologia Agrícola da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, *campus* Jaboticabal, SP.

Os isolados de bactérias utilizadas pertencem à coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo, da FCAV-UNESP, *campus* de Jaboticabal. Os mesmos foram previamente isolados de uma planta de milho da fazenda localizada na UNESP – Jaboticabal, em estágio V6. As bactérias endofíticas foram isoladas dos órgãos vegetais, folhas, caule e raízes, da planta de milho (Milani, 2017).

Para produção do inóculo, cada isolado bacteriano foi cultivado em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 60 mL de caldo nutriente (extrato de carne: 1,0 g/L, extrato de levedura: 2,0 g/L, peptona: 5,0 g/L, NaCl: 5,0 g/L, pH: 6,8 ± 0,2) e as culturas incubadas em BOD a 28°C durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram padronizadas através de leitura em espectrofotômetro a 630nm (Kloepper et

al., 1989). Ajustando-se a concentração de celulosa  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL<sup>-1</sup>).

Três sementes de milho foram imersas em cada uma das suspensões bacterianas por 30 minutos. Após este período, as sementes foram semeadas em vasos de cinco litros contendo solo previamente peneirado. A adubação do solo foi realizada conforme análise química do solo (Tabela 3) e o recomendado para a cultura, seguindo indicações de Raij e Cantarella, (1997) para produtividade esperada de 8 a 10 t.ha<sup>-1</sup>, aplicando 100 Kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio na forma de uréia convencional, 60 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (superfosfato triplo) e 50 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O (cloreto de potássio), com suas quantidades devidamente calculadas para o volume do vaso.

Uma semana após a emergência das plantas, foi realizado o desbaste, deixando-se uma planta por vaso. O experimento foi conduzido pelo período de 60 dias, e as inoculações foram feitas a cada 10 dias com o volume de 10 mL da suspensão bacteriana por vaso.

**Tabela 3.** Análise do solo anterior a implantação do experimento I

pH CaCl <sub>2</sub>	MO g dm <sup>3</sup>	P resina mgdm <sup>3</sup>	S mgdm <sup>3</sup>	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V%
				.....mmol <sub>c</sub> dm <sup>3</sup> .....						
6,5	11	20	12	0,7	19	5	17	24,4	41,3	59

### 3.1.1. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 11 tratamentos e três repetições, resultando em 33 vasos. Os tratamentos foram dez linhagens de *Bacillus*, compostos por *B. amyloliquefaciens* (BA), *B. velezensis* (BV) e *B. subtilis*(BS). Como controle foram utilizadas plantas sem inoculação bacteriana.

### **3.1.2. Avaliações na planta**

#### **3.1.2.1. Altura e massa seca**

A altura da planta foi avaliada com auxílio de fita métrica medindo-se da base da planta (rente ao solo) ao ápice da planta (até o final da folha bandeira). Em seguida as plantas foram devidamente coletadas dos vasos separando raiz da parte aérea esecas em estufa sob ventilação forçada a 65°C por aproximadamente 72 horas até massa constante. Foi aferida a massa do material vegetal seco em balança analítica para determinação da massa seca em gramas de parte aérea e raízes.

#### **3.1.2.2. Teor de clorofila nas folhas**

O teor de clorofila foi determinado mediante análise de espectrofotometria proposta por Wellburn (1994). Para tanto, foram coletadas a terceira folha abaixo da folha bandeira e cortados quadrados com área conhecida (1cm<sup>2</sup>). Cada quadrado foi repicado em pedaços menores e este material vegetal foi transferido para tubo Eppendorf âmbar contendo 5mL de dimetilformamida. Os tubos de ensaio foram armazenados por 48h em geladeira e na ausência de luz, após este período foi coletada uma alíquota de 3mL do extrato líquido para leitura em espectrofotômetro a 470, 647 e 664nm.

#### **3.1.2.3. Concentração de nitrogênio na parte aérea e na raiz**

Para determinação da concentração de nitrogênio (N) o material vegetal foi moído em moinho tipo Willey (malha 20) e submetido à análise foliar de N através do método proposto por Bremner (1996) e Mulvaney (1996), modificado segundo Bezerra Neto e Barreto (2011). Em que mensurado 0,1 g da amostra vegetal e o

conteúdo foi transferido para tubo digestor, adicionando-se 7mL de mistura digestora a esse material, que seguiu para digestão em bloco digestor obedecendo determinada sequência de tempo e temperatura (1h a 100°C, 1h a 200°C e 1h a 300°C). Após resfriamento, o material digerido foi dissolvido utilizando aproximadamente 10mL de água destilada e a destilação foi realizada em destilador semi-micro Kjeldahl, com auxílio de 25mL de NaOH (50%). O material destilado foi recolhido em 10 mL de solução indicadora de ácido bórico, obtendo-se 20mL de destilado. A titulação da amônia destilada foi feita com a utilização de uma solução padrão de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05N. Para a mistura de indicador utilizada, o ponto final da titulação corresponde a mudança de cor: de verde para vermelho claro. Considera-se que 1,0mL do ácido sulfúrico 0,05 N gasto na titulação corresponde a 0,7mg de N na amostra.

#### **3.1.2.4. Concentração de fósforo na parte aérea e na raiz**

As concentrações de fósforo (P) foram determinadas por digestão nitro-perclórica, seguida pelo método colorimétrico do molibdo-vanadato segundo metodologia proposta por Haag et al.(1975) com modificações de Bezerra Neto e Barreto(2011). Foi mensurada 0,5g da amostra vegetal e transferiu-se para tubo digestor, adicionando-se 5 mL de ácido nítrico concentrado e 1mL de ácido perclórico concentrado, deixando-se em repouso de um dia para o outro (pré-digestão nitro-perclórica). Após o repouso, foi realizada a digestão completa em bloco digestor obedecendo a determinada sequência de tempo e temperatura (1h a 80°C, 1h a 120°C, 1h a 150 °C e 1h a 180°C). O material digerido foi lavado com água destilada obtendo-se 50 mL de extrato. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 470nm utilizando-se 5 mL do extrato mais 1mL do reagente específico, formado pela mistura de volumes iguais de molibdato de amônio a 5% e vanadato de amônio a 0,25%.

### 3.1.3. Avaliações no solo

#### 3.1.3.1. Preparação das amostras

As amostras de solo, coletadas de cada vaso, foram separadas em duas partes. A primeira seguiu para determinação de fósforo solúvel foi peneirada e seca em temperatura ambiente, e a segunda foi conservada em geladeira para posterior contagem de colônias de *Bacillus* spp.

#### 3.1.3.2. Fósforo solúvel

Para a determinação do fosfato solúvel, foi utilizado o método de Watanabe e Olsen (1965) em que 0,6 g de solo seco foram transferidos para Erlenmeyer de 250 mL, contendo 12 mL de solução extratora de bicarbonato de sódio e levadas a agitação em agitador horizontal por 30 minutos e filtrado em papel de filtro Whatman nº40. Na determinação, foi pipetado 2 mL do filtrado, 0,2 mL de solução de ácido sulfúrico 5M e 0,8 mL do "Reagente B" em tubo de ensaio 13X150mm, agitou-se e seguiu-se com incubação a 45°C, por 20 minutos. Após incubação, a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 820 nm.

Em cada leitura foi utilizado um branco, com 2 mL de bicarbonato de sódio 0,5 M, pH 8,5, no lugar do extrato de solo. Os cálculos foram efetuados com base em curva padrão com solução  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , contendo  $100 \mu\text{g P/mL}^{-1}$ .

O reagente B foi preparado imediatamente antes de ser utilizado dissolvendo 1,056g de ácido ascórbico em 200 mL do reagente A. E para preparo do reagente A foram dissolvidos 12g de molibdato de amônio e 0,2908 g de tartarato de antimônio e potássio em 250 e 100 mL de água destilada, respectivamente. Juntou-se as duas soluções em 1000 mL de solução de ácido sulfúrico 2,5 M e completou-se volume com água destilada para 2000 mL.

### **3.1.3.3. Contagem de *Bacillus* spp.**

Foi feita a contagem de colônias de *Bacillus* spp. no solo utilizando placas com nutriente ágar, utilizando-se a metodologia de diluição seriada (Wollum, 1982) associada com a metodologia de choque térmico proposta por Rothfuss et al.(1997) e Barroti e Nahas, (2000), seletiva para *Bacillus*. Para isto os tubos da diluição  $10^{-4}$  foram submetidos à temperatura de 80°C por 10 minutos (banho-maria) e posteriormente resfriados em água com temperatura ambiente. Alíquotas (100 µl) foram plaqueadas em placas com nutriente ágar e encubadas para posterior contagem em 24 e 72 horas.

### **3.1.4. Seleção dos isolados para o experimento em campo**

Foram selecionados os isolados de *Bacillus* sp. que apresentaram maiores números de significância nos parâmetros avaliados no experimento I seleção de inoculantes em casa de vegetação, para serem testadas no experimento II em campo.

## **3.2. Experimento II – Seleção de inoculantes em campo**

### **3.2.1. Plantio**

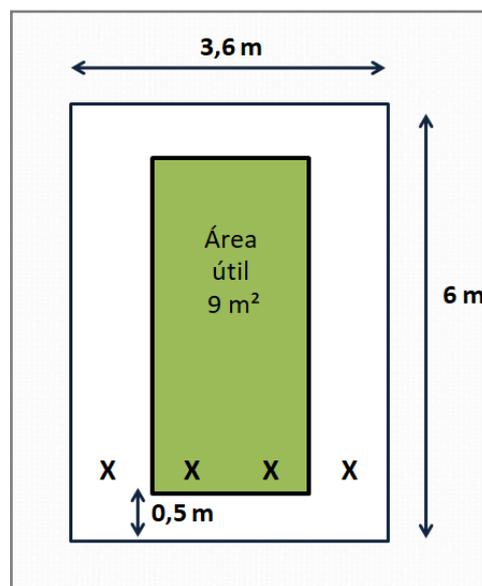
O experimento II foi conduzido em campo, na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE) da Unesp na cidade de Jaboticabal, SP (21° 15' 04" S, 48° 17' 16" W e 576,64 m de altitude),no período de safrinha, a semeadura ocorreu no dia oito de março de 2017.

O solo utilizado no plantio foi classificado como latossolo vermelho eutrófico (EMBRAPA, 1999). Antes da instalação do experimento, foi realizada uma amostragem de solo para a determinação das propriedades químicas, tendo como resultados: pH em CaCl<sub>2</sub> de 6; 23 g dm<sup>3</sup>de MO; 29 mg dm<sup>3</sup> de P resina; 16 mmolc

$\text{dm}^3$  de K;  $10 \text{ mmolc dm}^3$  de Ca;  $11 \text{ mmolc dm}^3$  de Mg;  $21 \text{ mmolc dm}^3$  de H+Al;  $24,4 \text{ mmolc dm}^3$  de SB;  $25,4 \text{ mmolc dm}^3$  de CTC; e 58% de V.

A correção e adubação do solo foram baseadas nos resultados de análise química do solo de acordo com Raji e Cantarella (1997) para a produtividade esperada 4 a  $6 \text{ t ha}^{-1}$  para a safrinha, utilizando  $200 \text{ kg ha}^{-1}$  da formulação NPK 8-28-16+0,5% Zn respectivamente.

O sistema de plantio foi direto utilizando-se espaçamento de 0,90 m entre linhas e seis plantas por metro linear. Cada parcela experimental continha 6 m de comprimento por 3,6 m de largura. A coleta das amostras de solo e das plantas que foram utilizadas para análises foram feitas durante o pendoamento, em uma área útil de  $9 \text{ m}^2$  dentro de cada parcela (Figura 1).



**Figura1.** Parcela experimental e área útil

A multiplicação dos isolados inoculados nos tratamentos que receberam *B. subtilis* BS-248, *B. subtilis* BS-290 e *B. subtilis* BS-320 seguiu a mesma metodologia descrita no item 3.1. Sendo a concentração de  $1,5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$  a mesma utilizada no experimento I. Foram realizadas quatro aplicações a cada 10 dias via solo com auxílio de pulverizador costal, as inoculações iniciaram uma semana após a emergência.

Cada parcela recebeu a mistura de 240 mL de inoculado bacteriano e 1500 mL de água, facilitando a pulverização, o que equivale a 10 mL de suspensão por metro linear. O controle sem inóculo recebeu apenas pulverização de água. As inoculações foram realizadas quatro vezes, a partir de uma semana após a emergência.

A colheita do milho foi realizada no dia 31 de julho de 2017, utilizando-se a mesma área útil de coleta em cada parcela.

### 3.2.2. Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados com quatro tratamentos e seis repetições (Tabela 4).

**Tabela 4.** Descrição dos tratamentos utilizados no experimento II

<b>Tratamentos</b>	<b>Linhagens</b>	<b>Código</b>
<b>1</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	BA-248
<b>2</b>	<i>B. subtilis</i>	BV-290
<b>3</b>	<i>B. subtilis</i>	BS-320
<b>4</b>	Controle sem inoculação	Controle

### 3.2.3. Avaliações na planta

#### 3.2.3.1. Massa seca e concentrações de nitrogênio e fósforo da parte aérea

Foram realizadas avaliações de massa seca, concentração de nitrogênio e fósforo da parte aérea, seguindo as metodologias descritas nos itens 3.1.2.1., 3.1.2.3 e 3.1.2.4. As amostras foram compostas por três plantas coletadas, durante o pendoamento, aleatoriamente em cada área útil da parcela experimental (cortadas rentes ao solo). As folhas opostas e abaixo da espiga, das plantas coletadas, foram as amostras utilizadas para determinação das concentrações de nitrogênio e fósforo.

### **3.2.3.2. Produtividade do milho**

A produtividade foi avaliada por meio de colheita manual, da área útil da parcela experimental de 9 m<sup>2</sup>. Os dados de produtividade dos grãos foram corrigidos a 13% de umidade e transformados para quilos por hectare (kg ha<sup>-1</sup>).

### **3.2.4. Avaliações no solo**

No solo foi avaliado o fósforo solúvel e a contagem de colônias de *Bacillus* spp. seguindo as metodologias descritas nos itens 3.1.3.2. e 3.1.3.3. Para isto foram coletadas amostras compostas de solo, no período de pendoamento, formadas da junção de cinco amostras simples retiradas dentro da área útil de cada parcela, coletadas próximas as raízes. O tipo de preparo e armazenamento foi o mesmo descrito para as amostras de solo no experimento I no item 3.1.3.1.

### **3.3. Análise dos dados**

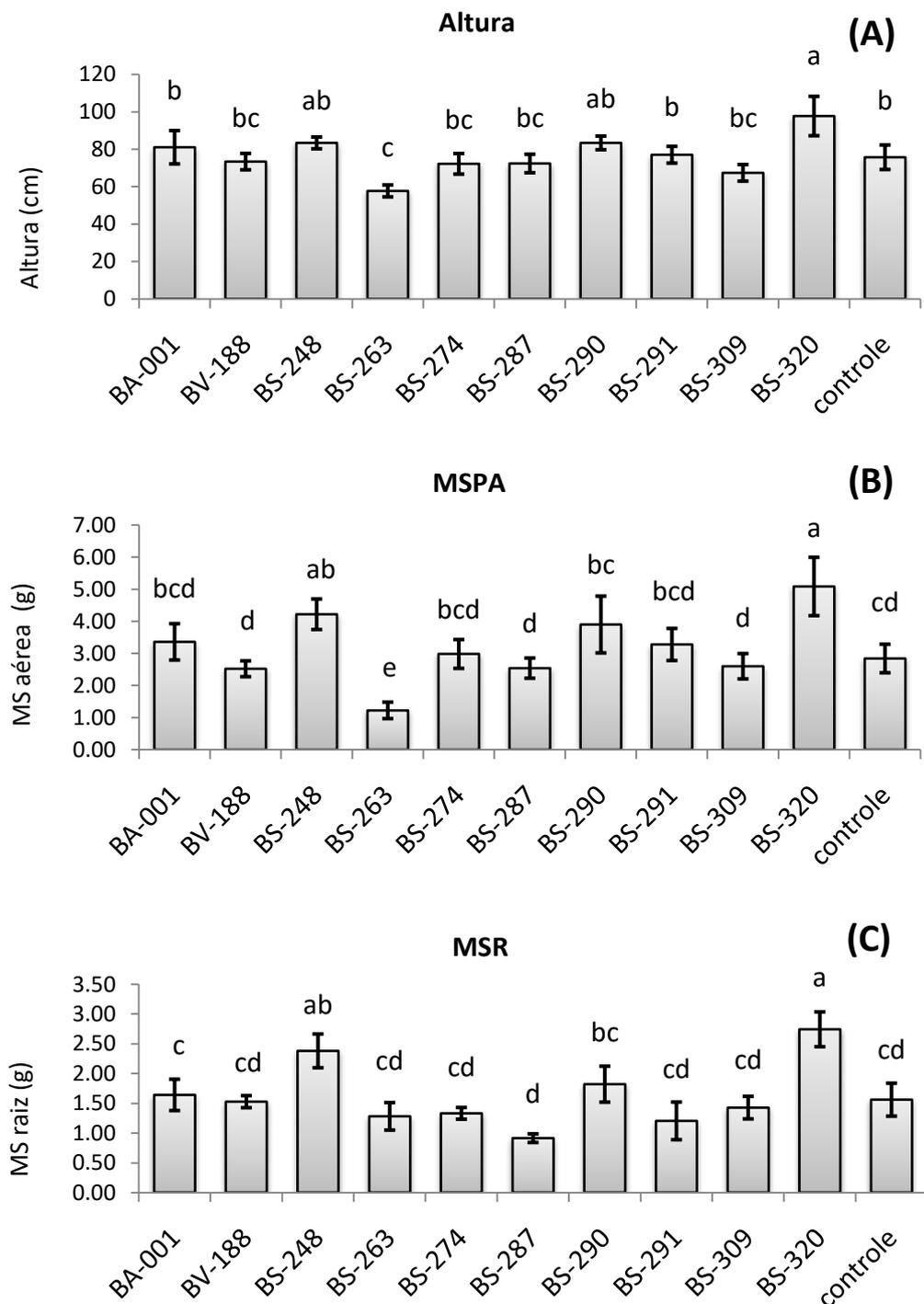
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (Teste F) comparando-se as médias dos tratamentos pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, utilizando o programa Agroestat versão 1.0 (Barbosa e Maldonato, 2010).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Experimento I – Seleção de inoculantes em casa de vegetação**

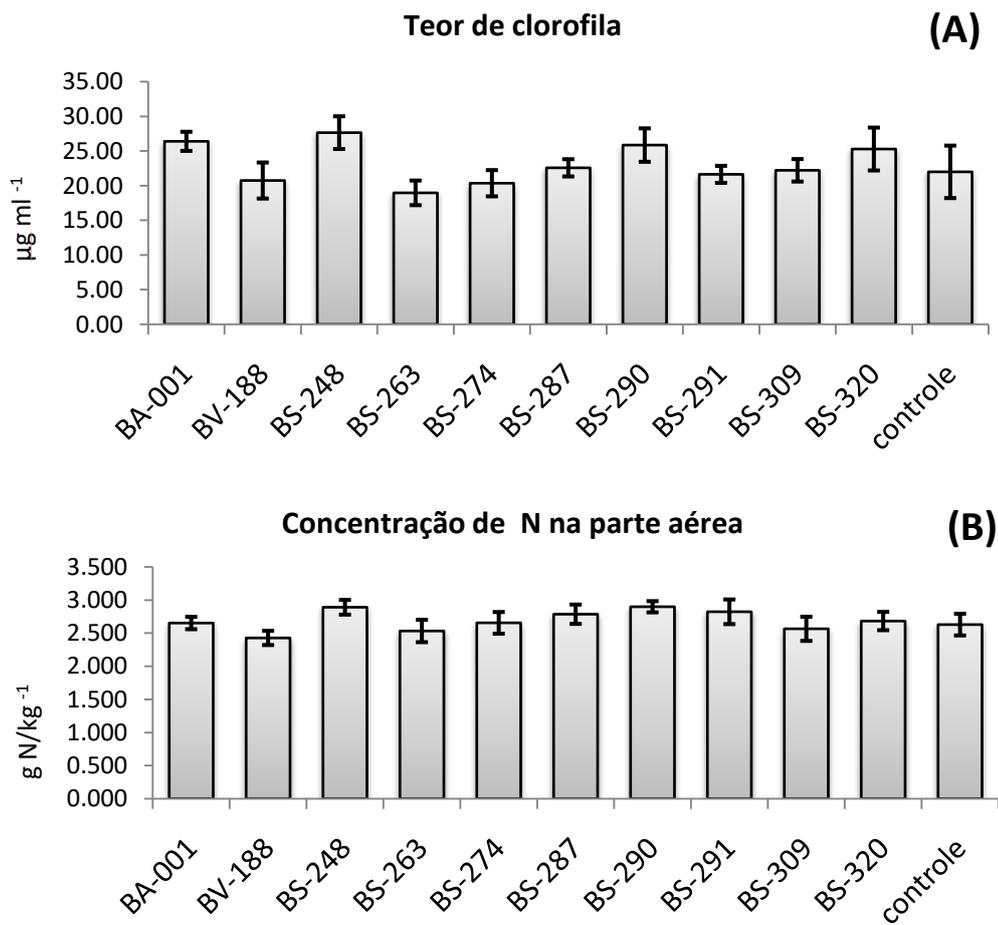
Os experimentos neste estudo mostraram que alguns isolados bacterianos afetaram significativamente a altura e o acúmulo de massa seca nas plantas de milho (Figura 1A). Um aumento significativo em altura foi obtido com o isolado BS-320 (97,6 cm) em relação ao controle (76 cm). O isolado BS-263 também diferiu do controle, porém negativamente, tendo resultado de altura menor.

Para a massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) foram observadas diferenças significativas para os isolados BS-320 e BS-248 com relação ao controle (Figura 1B e C). Na MSPA o isolado BS-263 também apresentou resultado no acúmulo de biomassa inferior ao controle.



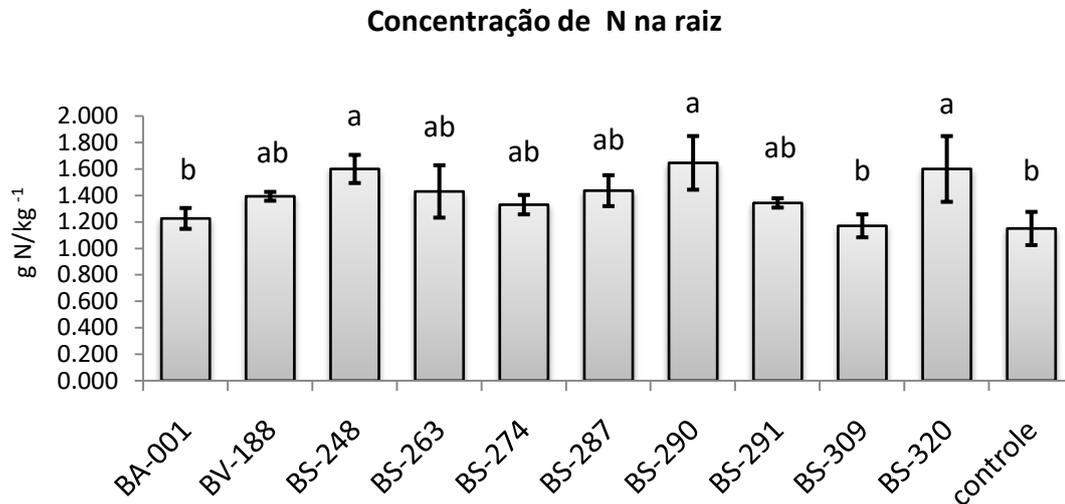
**Figura 2.** Altura (A), massa seca de parte aérea MSPA (B) e massa seca de raiz MSR (C) de plantas de milho inoculadas com dez isolados de bactérias endofíticas do gênero *Bacilluse* um controle sem inoculação aos 60 DAE. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Embora a maioria dos isolados bacterianos tenha apresentado maiores médias quanto o teor de clorofila (variando de 35,17 a 15,34  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e a concentração de N na parte aérea (variando de 3,12 a 2,10  $\text{g/kg}^{-1}$ ) das plantas de milho (Figura 3), para estes parâmetros, não foi encontrada diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 3.** Teor de clorofila (A), concentração de N na parte aérea (B) de plantas de milho inoculadas com dez linhagens de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* e um controle sem inoculação aos 60 DAE. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). A ausência de letras indica a falta de significância estatística entre os tratamentos de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

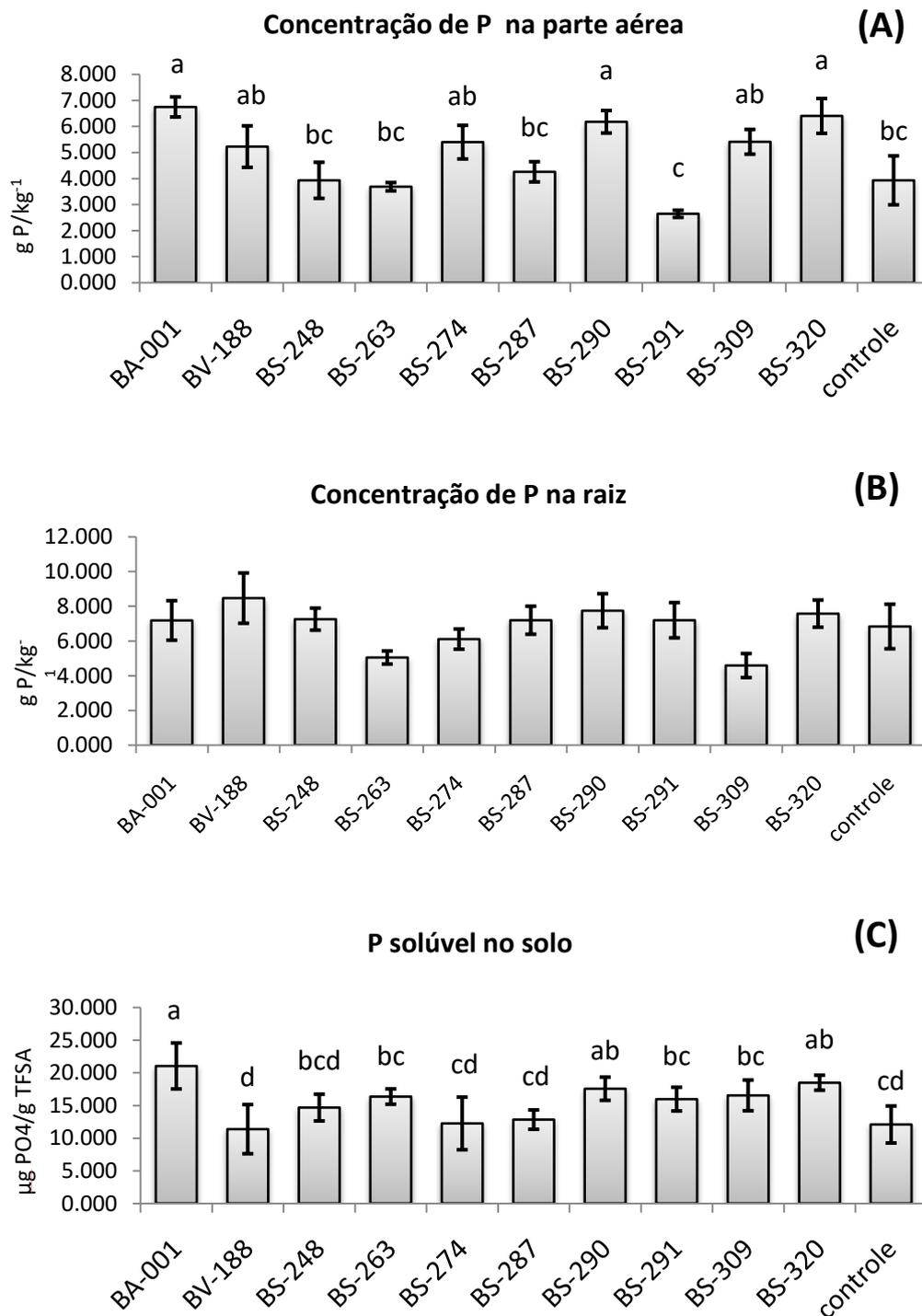
Na concentração de N nas raízes (Figura 2) houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo que os isolados BS-290, BS-248 e BS-320 proporcionaram maior concentração de N nas raízes das plantas de milho.



**Figura 4.** Concentração de N na raiz de plantas de milho inoculadas com dez linhagens de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* e um controle sem inoculação aos 60 DAE. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

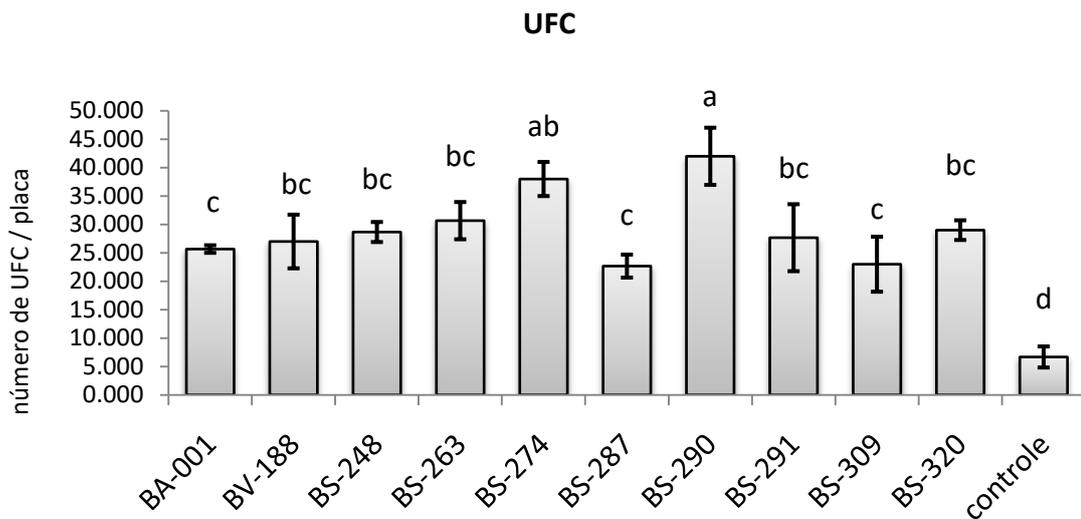
Aumento significativo na concentração de P na parte aérea foi obtido com os isolados BA-001 ( $6,75 \text{ g/kg}^{-1}$ ), BS-320 ( $6,41 \text{ g/kg}^{-1}$ ) e BS-290 ( $6,18 \text{ g/kg}^{-1}$ ) em relação ao tratamento controle ( $3,93 \text{ g/kg}^{-1}$ ) (Figura 3A). No entanto, na concentração de P nas raízes não foi encontrada diferença significativa sendo que os valores variaram de  $4,49$  até  $9,19 \text{ g/kg}^{-1}$ .

Foi observada significância quanto a aplicação bacteriana para a concentração de P disponível no solo (Figura 3 B). O P solúvel no solo foi significativo para os tratamentos com aplicações dos isolados BA-001, BS-320 e BS-290 novamente, apresentando os valores de  $21,04$ ,  $18,48$  e  $17,55 \text{ } \mu\text{g PO}_4/\text{g TFSA}$  respectivamente, em comparação ao controle que foi de  $12,08 \text{ } \mu\text{g PO}_4/\text{g TFSA}$ .



**Figura 5.** Concentração de P na parte aérea (A) e P solúvel no solo (B) de plantas de milho inoculadas com dez isolados de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* e um controle sem inoculação aos 60 DAE. As barras representam o erro padrão da media. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). A ausência de letras indica a falta de significância estatística entre os tratamentos de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Todos os solos tratados com as aplicações de *Bacillus* spp. diferiram significativamente do tratamento controle (Figura 4), entre os tratamentos bacterianos também houve diferença significativa, sendo o isolado BS-290 significativo em comparação aos demais tratamentos.



**Figura 6.** Número de unidades formadoras de colônias de *Bacillus* spp. – UFC no solo dos vasos com plantas de milho inoculadas com dez linhagens de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* e um controle sem inoculação aos 60 DAE. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2. Seleção dos isolados

Foram selecionados *Bacillus* spp. que apresentaram o maior número de significância quanto a promoção de crescimento nas plantas de milho em casa de vegetação, no experimento II, quando comparados ao controle e aos demais tratamentos. Portanto, três isolados se mostraram promissores para serem avaliados em condições de campo. Estes isolados foram: BS-290, BS-248 e BS-320. Tendo os isolados BS-290 e BS-248 alcançado significância em quatro parâmetros e o isolado

BS-320 apresentou significância em sete parâmetros quando comparadas aos demais tratamentos (Tabela 5).

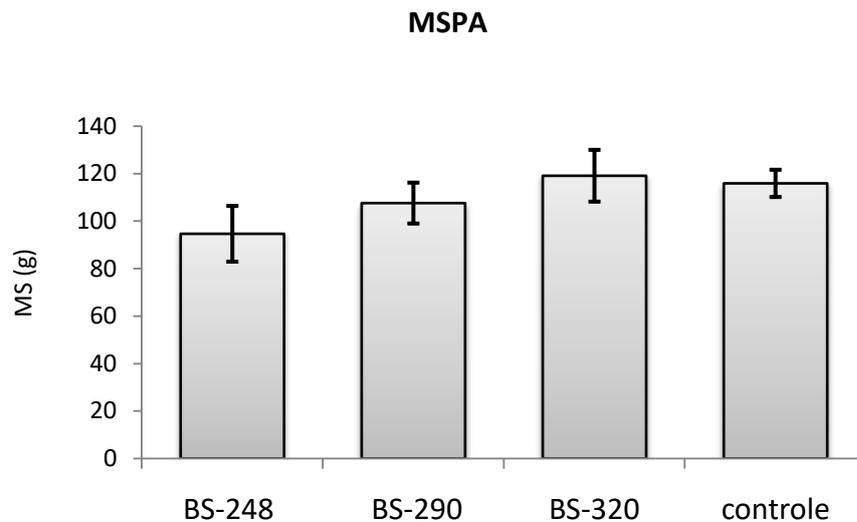
**Tabela 5.** Resultado dos parâmetros avaliados em casa de vegetação para os isolados de *B. subtilis* (BS-248, BS-290 e BS-320)

<b>Parâmetros avaliados em casa de vegetação</b>	<b>Isolado BS-248</b>	<b>Isolado BS-290</b>	<b>Isolado BS-320</b>
Altura	NS	NS	*
MSPA	*	NS	*
MSR	*	NS	*
Teor de clorofila	NS	NS	NS
Concentração de N parte aérea	NS	NS	NS
Concentração de N nas raízes	*	*	*
Concentração de P parte aérea	NS	*	*
Concentração de P nas raízes	NS	NS	NS
Concentração de P solúvel no solo	NS	*	*
Número de UFC <i>Bacillus</i> spp. no solo	*	*	*

(NS) – Não significativo a Duncan ( $p \leq 0,05$ ) ( \* ) - Significativo a Duncan ( $p \leq 0,05$ )

#### 4.3. Experimento II – Seleção de inoculantes em campo

No experimento II em campo para MSPA não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos inoculados com os *Bacillus* sp. e nem destes em relação ao controle, tendo os valores variado de 94,66 a 119,01 g (Figura 7)

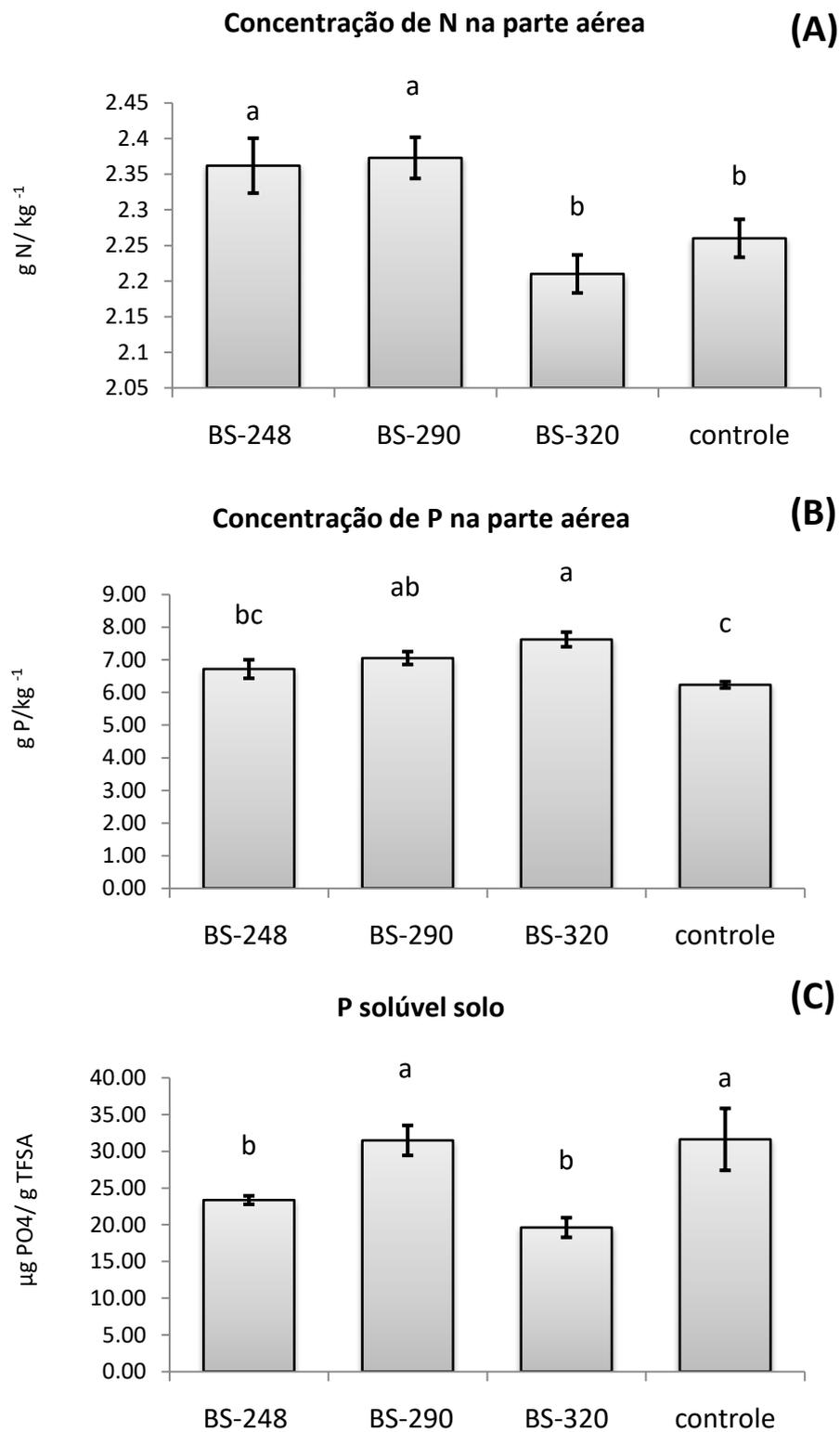


**Figura 7.** Acúmulo de massa seca na parte aérea de plantas de milho inoculadas com três linhagens de *B. subtilis* endofíticas (BS-248, BS-290 e BS-320) e um controle sem inoculação. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). A ausência de letras indica a falta de significância estatística entre os tratamentos de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Os maiores valores para a concentração de N, na parte aérea nas plantas de milho, foram observados nos tratamentos inoculados com os isolados BS-290 e BS-248 com  $2,37 \text{ g/kg}^{-1}$  e  $2,36 \text{ g/kg}^{-1}$ , respectivamente. Estes diferiram significativamente do controle, que apresentou concentração de N de  $2,06 \text{ g/kg}^{-1}$ . O tratamento inoculado com o isolado BS-320 não foi estatisticamente diferente do controle (Figura 8 A).

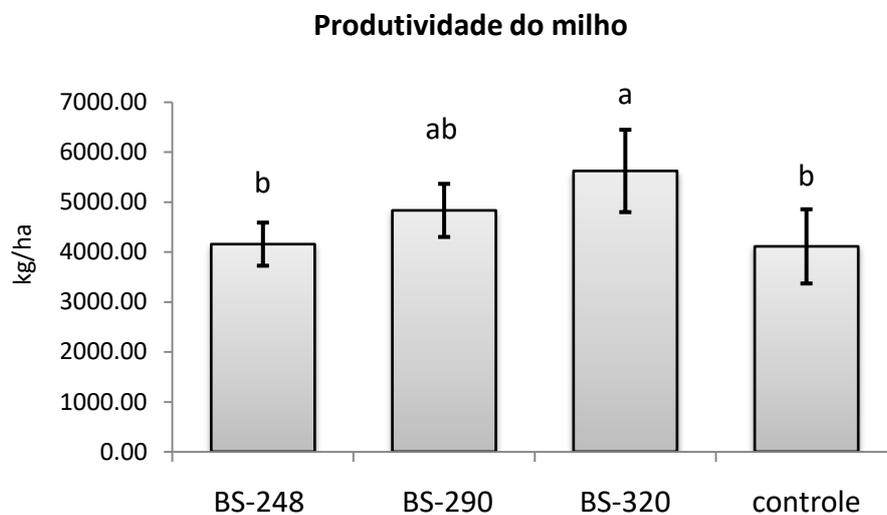
Para a concentração de P na parte aérea (Figura 5B) os tratamentos inoculados com os isolados BS-320 ( $7,63 \text{ g/kg}^{-1}$ ) e BS-290 ( $7,05 \text{ g/kg}^{-1}$ ) apresentaram diferença significativa em relação ao controle ( $6,2 \text{ g/kg}^{-1}$ ).

A maior concentração de P solúvel no solo foi encontrada no tratamento controle e BS-290 (Figura 8 C). Os tratamentos inoculados com os isolados BS-320 e BS-248 apresentaram menor concentração de P solúvel no solo.



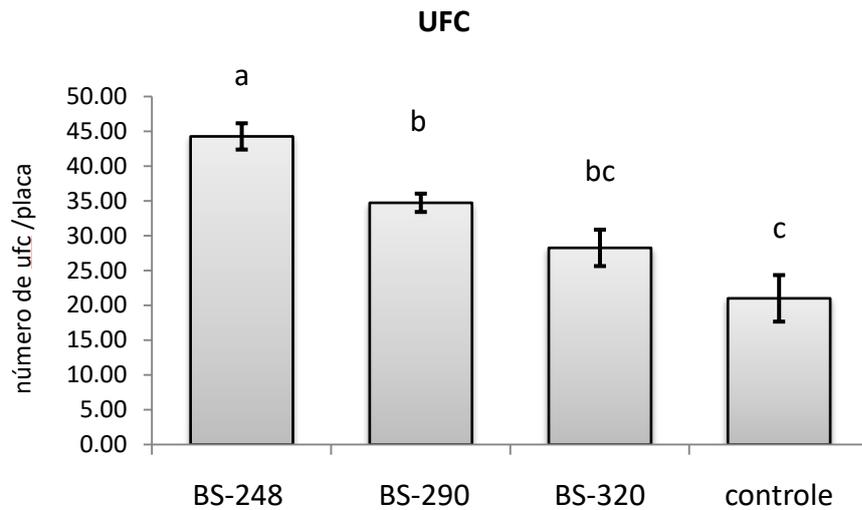
**Figura 8.** Concentração de N na parte aérea (A), concentração de P na parte aérea (B) e P solúvel no solo (C) de plantas de milho inoculadas com três linhagens de *B. subtilis* endófitos e um controle sem inoculação. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

A maior produtividade (Figura 9) foi observada para o tratamento inoculado com o isolado BS-320 (5.116 kg.ha<sup>-1</sup>), no qual este isolado promoveu o aumento de 26,88% na produção de milho comparado como controle (3.741 kg.ha<sup>-1</sup>). Os tratamentos inoculados com BS-290 e BS-248 apresentaram maiores médias 4.396 e 3.781 kg.ha<sup>-1</sup> respectivamente, no entanto não diferiram significativamente do controle.



**Figura 9.** Produtividade de plantas de milho inoculadas com três linhagens de *B. subtilis* endofíticos (BS-248, BS-290 e BS-320) e um controle sem inoculação. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Foi observada significância estatística para os tratamentos inoculados com os isolados BS-248 e BS-290 em relação ao controle, quanto ao número de UFC. O isolado BS-320 não apresentou aumento significativo em relação ao controle.



**Figura 10.** Número de unidades formadoras de colônias – UFC no solo das áreas de plantio de milho inoculadas com três isolados de *B. subtilis* endofíticos (BS-248, BS-290 e BS-320) e um controle sem inoculação. As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de acordo com o teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Alguns isolados bacterianos afetaram a altura e o acúmulo de massa seca nas plantas de milho. Normalmente o aumento na altura das plantas, MSPA e MSR são promovidos pela presença de fitormônios. Embora os fitormônios promovam o crescimento das plantas, alguns micro-organismos os produzem para benefício próprio. Os fitormônios aumentam a superfície de contato da raiz da planta, permitindo um contato considerável entre as plantas e os micro-organismos, aumentando a eficiência dos micro-organismos para obtenção de nutrientes e carboidratos liberados das plantas. O aumento da MSR é uma consequência direta da capacidade de micro-organismos produzirem fitormônios na raiz promovendo um aumento da eficiência radicular para obter água e nutrientes do solo (Wang et al., 2009; White et al., 2014).

No entanto, o isolado BS-263 prejudicou o crescimento das plantas. Este resultado foi inesperado, uma vez que o BS-263 também é um isolado de *B. subtilis* e é portador de muitas características relacionadas à promoção de crescimento de plantas, incluindo a produção de AIA (Milani, 2017)

Testes *in vitro* são necessários para se conhecer as habilidades dos micro-organismos (Rocha et al., 2017). Nos testes *in vitro*, o isolado BS-320 produziu 12,41 µg de AIA mL<sup>-1</sup>, enquanto que o isolado BS-263 produziu 11,32 µg de AIA mL<sup>-1</sup> (dados não apresentados). Entretanto, algumas vezes os mesmos resultados obtidos *in vitro* não ocorrem em condições de campo, como ocorreu para o isolado BS-263, que mesmo sendo produtor AIA não promoveu o crescimento das plantas.

Alguns resultados sobre o uso de micro-organismos promotores do crescimento de plantas são inconsistentes (Gouda et al., 2018). Certamente, isso ocorre devido à variação natural nos parâmetros analisados. Muitos estudos são necessários para entender como micro-organismos portadores de diversas características para o crescimento das plantas podem acabar prejudicando o seu crescimento. É possível que estes isolados, em condições específicas, atuem como competidores com a planta por absorção dos nutrientes, acreditando-se assim que a interação planta e BS-263 ocorreu de forma competitiva.

A microbiota presente nas raízes parece auxiliar o hospedeiro através da aquisição de nutrientes do solo para o crescimento das plantas. Mediante a realização da rizodeposição as plantas conseguem modular a comunidade microbiana da rizosfera, conforme a necessidade nutricional. Essa seleção feita pelas plantas depende do seu fenótipo e o resultado será a seleção de micro-organismos rizosféricos e endofíticos (Bulgarelli et al., 2013).

Esses resultados sugerem fortemente que há certas diferenças genotípicas entre os isolados utilizados nesse estudo, incluindo suas habilidades no estabelecimento do solo e interações com as plantas. Isto pode ter sido responsável por diferentes níveis de crescimento de plantas promovidos por cada isolado. Somado a isso, as habilidades dos isolados como produção de AIA, fixação de nitrogênio e solubilização de fósforo (Milani, 2017), embora sejam importantes, não garantem a promoção do crescimento das plantas.

As interações entre plantas e microorganismos são influenciadas por grandes variedades de fatores como genótipo, estado de crescimento, estado fisiológico, tipo de tecido vegetal, práticas agrícolas, além de condições ambientais como temperatura, disponibilidade de água e nutrientes (Compant et al., 2010). Mais estudos são necessários para entender os diferentes comportamentos de isolados bacterianos da mesma espécie na promoção do crescimento das plantas.

Os resultados deste trabalho mostraram a coerência de alguns isolados na promoção de altos valores de MSR, MSPA e concentrações de nitrogênio. Os isolados capazes de promover a maior MSR, também foram capazes de apresentar aumento na concentração de N nas raízes nas plantas, com exceção do isolado BS-290 para MSR, tendo tal resultado se estendido para o experimento em campo. Existe uma correlação positiva entre esses parâmetros e a presença de fitormônios produzidos por micro-organismos, que são substâncias orgânicas que podem promover inibir ou modificar o crescimento e desenvolvimento de plantas (Damam et al., 2016). Raízes com maior área de superfície absorvem mais água e nutrientes dos solos e os translocam para a parte aérea das plantas, resultando em um maior crescimento e aumento de produção de biomassa e produção de grãos (Glick, 2012; Vejan et al., 2016). Os fitormônios promovem a proliferação de células radiculares

por superprodução de raízes laterais e pêlos radiculares com aumento concomitante de nutrientes e absorção de água (Sureshbabu et al., 2016). Nesse contexto, o isolado BS-320 foi o mais eficiente.

Com relação ao uso de nutrientes as BPCP são capazes de promover a FBN, mediante a ação do complexo enzimático nitrogenase (Boddey e Dobereiner, 1988; Tikhonovich e Provorov, 2011). Moreira et al. (2013), mostraram que as BPCP são capazes de incrementar entre 20 a 30% nas concentrações de N em gramíneas, dentre estas o milho. Neste estudo não foi possível verificar a melhor resposta dos isolados inoculados quanto ao acúmulo de N na parte aérea e o teor de clorofila nas folhas no crescimento inicial (60 dias) em casa de vegetação. Em contrapartida, o acúmulo de N na parte aérea foi observado no experimento II em campo, o que demonstra a importância de se conhecer as épocas dos estádios de crescimento/desenvolvimento que a cultura apresenta maior exigência nutricional e acúmulo de nutrientes. Assim, para as culturas em geral em seus estádios produtivos quando a planta é jovem, o acúmulo de nutrientes é pequeno e aumenta com o desenvolvimento. Especificamente para o milho nota-se um acúmulo pequeno de N (9%) até os 44 dias após a semeadura, o que explica em casa de vegetação não ter sido observado diferença de N na parte aérea. Em contrapartida, nestas mesmas plantas jovens nas raízes há alta capacidade de absorção de N e nas raízes de plantas mais velhas apresentam baixa capacidade de acumulação (Prado, 2008). Isto está de acordo com o presente estudo em que houve acúmulo de N nas raízes das plantas no experimento I em casa de vegetação que foram aplicados os isolados BS-290, BS-248 e BS-320.

O fósforo é o segundo nutriente mais importante após o nitrogênio necessário para o crescimento das plantas. Elemento essencial em todos os sistemas vivos e, geralmente, os micro-organismos solubilizantes de fosfato desempenham papel muito importante na nutrição do fósforo, trocando a disponibilidade para as plantas através da liberação de fósforos inorgânicos e orgânicos do solo pela solubilização e mineralização (Khan et al., 2014; Richardson, 2001). No entanto, muitos micro-organismos têm a capacidade de solubilizar o fósforo e poucos deles são capazes de aumentar o conteúdo de P na planta (Anand et al., 2016). Neste contexto, os isolados BS-320, BA-001 e BS-290 foram os mais competentes no experimento I em

casa de vegetação, e no experimento II em campo os isolados mais competentes foram o BS-320 e o BS-290.

Além da disponibilização do P também é importante observar a eficiência do uso desse nutriente pela planta, em que a planta consiga realizar maior absorção deste nutriente. Esta eficiência pode ser avaliada no acúmulo deste nutriente na planta, como observado no experimento II em campo, com o isolado BS-320, que apesar de apresentar menor concentração de P solúvel no solo, na parte aérea da planta a concentração deste nutriente obteve o melhor resultado entre os demais tratamentos, indicando que possivelmente o fósforo solúvel foi absorvido pela planta. Sendo assim podemos afirmar que este isolado foi mais eficiente na utilização da adubação fosfatada e em ajudar a planta em absorver este nutriente.

Foi possível observar o aumento na produtividade neste trabalho, tendo o rendimento desta aumentado em aproximadamente uma tonelada por hectare quando o milho recebeu BS-320 como inoculante. Tal fato sugere fortemente que o aumento de rendimento é resultado da soma de muitas características neste isolado para promover o crescimento das plantas, evidenciando o promissor benefício das BPCP para a agricultura atual e sua utilização uma forma de contribuir com o meio ambiente, minimizando o uso de fertilizantes e favorecendo a qualidade do solo. O resultado deste estudo é de grande importância, pois vislumbra a possibilidade de utilização do isolado BS-320 de *B. subtilis* como inoculante biológico para o milho.

Curiosamente, em ambos experimentos I e II todos os tratamentos que receberam os isolados apresentaram maior número total de bactérias em relação ao controle. Isso mostra que os isolados tinham a capacidade de se estabelecer no solo. Essa característica é muito importante para que o isolado interaja com a planta e expresse sua capacidade de promover o crescimento das plantas (Bulgarelli et al., 2013). Embora não tenha sido avaliada a frequência de aplicações neste estudo, acredita-se que o maior número de inoculações possa influenciar o estabelecimento dessas bactérias, uma vez que, o solo utilizado foi natural (não esterilizado), condição que implica que as bactérias aplicadas tiveram que competir com a microbiota natural do solo. O maior número de aplicações foi efetivo quando realizado como uma estratégia intencional para promover uma alta carga de micro-

organismos nas plântulas (Souza et al., 2016). A utilização bem-sucedida das BPCP depende da sobrevivência no solo, da compatibilidade com a cultura na qual ele é inoculado, da capacidade de interação com a microbiota nativa no solo e de fatores ambientais (Martínez-Viveros et al., 2010).

A colonização bacteriana de plantas é a etapa inicial e fundamental nessa interação benéfica. Após a colonização, BPCP podem tomar e utilizar carboidratos, aminoácidos e outros compostos liberados pela planta e, em troca, produzir e fornecer uma série de substâncias bioativas para beneficiar o crescimento vegetal direta ou indiretamente (Xie et al., 2014). Por outro lado, o único isolado que promoveu o aumento no rendimento foi o isolado BS-320, sugerindo que o estabelecimento bacteriano na rizosfera provavelmente não necessite de uma elevada população microbiana, mas provavelmente da eficiência desse isolado junto ao genótipo da planta.

Sendo assim, em resumo, acredita-se que os incrementos quanto ao acúmulo total N e P, massa seca e o aumento da produtividade nas plantas de milho foram provavelmente promovidos devido à aplicação de bactérias capazes de produzir AIA e realizar a FBN. A disponibilidade de P solúvel no substrato presumivelmente foi devido à capacidade dos isolados serem solubilizadores de P e o diferente resultado dentro de uma mesma espécie de *B. subtilis* implica diferenças no nível de interação micro-organismo e planta, em que não são apenas as características de promoção de crescimento que as bactérias possuem que irão garantir os melhores resultados, mas sugere-se que este também depende das habilidades específicas de cada isolado em ser selecionado pelas plantas e juntos constroem uma associação positiva. Por isso, é importante entender todos os fatores que implicam nessa interação planta e micro-organismo, evidenciando que a interação entre plantas e BPCP é um processo complexo e recíproco

## 6. CONCLUSÕES

A inoculação com diferentes bactérias endofíticas do gênero *Bacillus*, demonstrou ser eficiente para a promoção do crescimento de plantas de milho tanto em casa de vegetação quanto em campo. O isolado BS-320 foi provedor do aumento na produtividade do milho em campo, indicando a eficiência deste isolado e possibilitando a sua utilização como uminoculante biológico para o milho.

## 7. REFERÊNCIAS

Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research** v. 163: 173–181.

Ahmad M, Zahir ZA, Khalid M, Nazli F, Arshad M(2013) Efficacy of *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. **Plant Physiology and Biochemistry** 63: 170–176.

Anand K, Kumari B, Mallick MA (2016) Phosphate solubilizing microbes: An effective and alternative approach as biofertilizers. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 8: 37–40.

Angulo VC, Sanfuentes EA, Rodríguez F, Sossa KE (2014) Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. **Revista Argentina de Microbiología** 46: 338–347.

Araujo FF, Guerreiro RT(2010) Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores 837 de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciencia e Agrotecnologia** 34:837–844.

Araújo, F.F., Henning, A.A., Hungria, M., (2005). Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 21: 1639–1645.

Araújo FF, Hungria M (1999) Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 34: 1633–1643. h

Aydi Ben Abdallah R, Stedel C, Garagounis C, Nefzi A, Jabnoun-Khiareddine H, Papadopoulou KK, Daami-Remadi M (2017) Involvement of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of Fusarium wilt by endophytic *Bacillus* spp. in tomato. **Crop Protection** 99: 45–58.

Barbosa JC, Maldonato JRW (2010) **AgroEstat**: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Versão 1.0 Jaboticabal: Departamento de Ciências Exatas.

Barroti G, Nahas E (2000) Total microbial and phosphate-solubilizing population in soil submitted to different cultivation systems. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35: 2043–2050.

Bashan Y, De-Bashan EL (2005) Plant Growth-Promoting. **Encyclopedia of soils in the environment** 1: 103–115.

Bashan Y, Holguin G (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. **Soil Biology and Biochemistry** 30: 1225–1228.

Batista BD (2017) **Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus* sp . RZ2MS9 : dos genes ao campo**. 107 f. Tese (Doutorado) USP - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz.”

Batista BD (2012) **Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**. 129 f. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz.”

Beddington J (2010) Food security: contributions from science to a new and greener revolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, series B. Biological Sciences** 365: 61–71.

Beijerinck MW (1888) Die Bacterien der Papilionaceenknollchen. **Botanische Zeitung** 46: 726-35, 741-50, 757-71, 781-90, 797-804.

Bezerra Neto E, Barreto LP (2011) **Análises Químicas e Bioquímicas em Plantas. Recife**. Editora Universitária da UFRPE. 261p.

Bhattacharyya PN, JhaDK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 28: 1327–1350.

Bin L, Guan-lin X (2005) Suppression of *Meloidogyne javanica* by antagonistic and plant growth-promoting rhizobacteria. **J Zhejiang Univ SCI** 6: 496–501.

Boddey RM, Baldani VLD, Baldani JI, Döbereiner J (1986) Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil** 95: 109–121.

Boddey RM, Oliveira OC, Urquiaga S, Reis VM, Olivares FL, Baldani VLD, Döbereiner J (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil** 174: 195–209.

Boddey RM, Döbereiner J (1988) Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil** 108: 53–65.

Boronin A, Kochetkov V, Dubeikovski A, Mordukhova (1993) Biological control of soilborne plant pathogens by PGPR *Pseudomonas* isolated in Russia. in international congress of plant pathology, Montreal - Canada. **Anais Montreal**. Int. Soc. Patho, p 276.

Bourassa DV, Kannenberg EL, Sherrier DJ, Buhr RJ, Carlson RW (2017) The Lipopolysaccharide Lipid A Long-Chain Fatty Acid Is Important for *Rhizobium leguminosarum* Growth and Stress Adaptation in Free-Living and Nodule Environments. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 30: 161–175.

Bremner JM (1996) Nitrogen-total, in: **Methods of Soil Analysis Part 3—Chemical Methods**. p 1085–1121.

Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P (2013) Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review of Plant Biology** 64: 807–838.

Carvalho NL De, Zobot V (2012) Nitrogênio: Nutriente Ou Poluente? **Revista Eletronica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental** 6: 960–974.

César PM, Durães FOM (2006) Fisiologia da Produção de Milho (No. 1º edição), **Circular Técnica**, 76. Sete Lagoas, MG.

Chen Y, Fan J-B, Du L, Xu H, Zhang Q-H, He Y-Q (2014) The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. **Applied Soil Ecology** 84: 235–244.

Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry** 42: 669–678.

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied Environmental Microbiology** 71: 4951–9.

CONAB (2018) **Acompanhamento Da Safra Brasileira Grãos**, Monitoramento agrícola- Safra 2017/18. v 5. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br>>

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento (2017) Monitoramento agrícola- Safra 2017. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br>>

Cruz JC, Karam D, Monteiro MAR, Magalhães PC (2008) **A cultura do milho**, ed. Sete Lagoas, MG. EMBRAPA. 517p.

Damam M, Kaloori K, Gaddam B, Kausar R (2016) Plant growth promoting substances (phytohormones) produced by rhizobacterial strains isolated from the rhizosphere of medicinal plants. **International Journal Pharmaceutical Sciences Review and Research** 37: 130–136.

Dixon R, Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology** 2: 621–631.

Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon, Y (2003) Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences** 22: 107–149.

Dobereiner J (1968) Non-symbiotic nitrogen fixation in tropical soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 3:1-6.

Doty SL (2013) Endophytic Yeasts: Biology and Applications In: Aroca R. **Symbiotic Endophytes**. v 37. p. 335-343

Drogue B, Doré H, Borland S, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C (2012) Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? **Research Microbiology** 163: 500–510.

EMBRAPA - Empresa brasileira de Pesquisa Agropecuária (1999). Sistema Brasileiro de Classificação de solos. Rio de Janeiro. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 412p.

Fancelli AL, Dourado Neto D (2008) **Produção de milho**, 2. ed. Embrapa Gado de Leite., Piracicaba.

Fancelli AL, Alves LRA, Almeida REM (2015) A cadeia produtiva do milho. **Revista Visão Agrícola** 13: 176.

Fornasieri Filho D (2007) **Manual da cultura do milho**, ed. FUNEP.

Francis I, Holsters M, Vereecke D (2010) The Gram-positive side of plant-microbe interactions. **Environmental Microbiology** 12: 1–12.

Freitas FDEO (2001) **Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (*Zea mays mays*, L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)**. 125 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Glick BR (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**. 1–15.

Gong M, Wang J-D, Zhang J, Yang H Lu X-F, Pei Y, Cheng J-Q (2006) Study of the Antifungal Ability of *Bacillus subtilis* Strain PY-1 in Vitro and Identification of its Antifungal Substance (Iturin A). **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. 38: 233–240.

Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research** 206, 131–140.

Haag HP, Sarruge JR, de Oliveira GD, Dechen AR (1975) Nutrição mineral do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.): I-deficiência dos macronutrientes-nota prévia. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz** 32: 185–190.

Holt JH, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology ninth edition. **European Journal of Paediatric Neurology** 13: 560.

Jorquera MA, Crowley DE, Marschner P, Greiner R, Fernandez MT, Romero D, et al. (2011). Identification of  $\beta$ -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* sp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. **FEMS Microbiol. Ecol.** 75: 163–172.

Joung KB, Côté JC (2002) Evaluation of ribosomal RNA gene restriction patterns for the classification of *Bacillus* species and related genera. **Journal of Applied Microbiology** 92: 97–108.

Khalid A, Akhtar MJ, Mahmood MH, Arshad M (2006) Effect of substrate-dependent microbial ethylene production on plant growth. **Microbiology** 75: 231–236.

Khan MS, Zaid A, Ahmad E (2014) Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms, in: **Phosphate Solubilizing Microorganisms**. Springer International Publishing, Cham, p. 31–62.

Khan MS, Zaidi A, Wani PA (2009) Role of Phosphate Solubilizing Microorganisms in Sustainable Agriculture - A Review, in: **Sustainable Agriculture**. Springer Netherlands, Dordrecht, p. 551–570.

Khan MS, Zaidi A., Wani, PA (2007) Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture — A review. **Agronomy for Sustainable Development** 27: 29–43.

Kim KY, McDonald GA, Jordan D (1997). Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. **Biol. Fertil. Soils** 24: 347–352.

Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology** 7: 39–44.

Knoth JL, Kim S-H, Ettl GJ, Doty SL (2013) Effects of cross host species inoculation of nitrogen-fixing endophytes on growth and leaf physiology of maize. **GCB Bioenergy** 5: 408–418.

Kumar H, Bajpai VK, Dubey RC, Maheshwari DK, Kang SC (2010) Wilt disease management and enhancement of growth and yield of *Cajanus cajan* (L) var. Manak by bacterial combinations amended with chemical fertilizer. **Crop Protection** 29: 591–598.

Kumar P, Dubey RC, Maheshwari DK (2012) *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research** 167: 493–499.

Lin Y, Watts DB, Kloepper JW, Torbert HÁ (2018) Influence of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Corn Growth Under Different Fertility Sources. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** 49: 1239–1255.

Long HH, Schmidt DD, Baldwin IT (2008) Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. **PLoS One** 3: 2702.

Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review Microbiology** 63: 541–556.

Lugtenberg BJJ, Dekkers L, Bloemberg GV (2001) Molecular Determinants of Rhizosphere Colonization by *Pseudomonas*. **Annual Review Phytopathology** 39: 461–490.

Mahmood A, Turgay OC, Farooq M, Hayat R (2016) Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: A review. **FEMS Microbiology Ecology** 92: 1–14.

Marag PS, Suman A (2018) Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). **Microbiological Research** 214: 101–113.

Martínez-Viveros O, Jorquera M, Crowley D, Gajardo G, Mora M (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of soil science and plant nutrition** 10: 293–319.

McGill WB, Cole CV (1981) A Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. **Geoderma**.26: 267-268.

Melnick RL, Zidack NK, Bailey BA, Maximova SN, Gultinan M, Backman PA (2008) Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. **Biological Control** 46: 46-56.

Mengel DB, Barber AS (1974) Rate of Nutrient Uptake per Unit of Corn Root Under Field Conditions<sup>1</sup>. **Agronomy Journal** 66: 399.

Milani RM (2017) **Diversidade de bactérias epífitas e endofíticas da cultura do milho**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agroecúaria)). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de jaboticabal.

Moreira FMS; Cares JE; Zanetti R; Stümer SL (2013) Bactérias associativas fixadoras de nitrogênio atmosférico, in: **O Ecossistema Solo: Componentes, Relações Ecológicas e Efeitos Na Produção Vegetal**. Lavras.

Moreira FM e Siqueira JO (2006) **Microbiologia e Bioquímica do Solo**, Lavras. Editora UFLA. Vol. ed. 2 2 ed.729p.

Mulvaney RL (1996) Nitrogen—inorganic forms, in: Methods of Soil Analysis Part 3 **Chemical Methods**. p. 1123–1184.

Murray JD (2011) Invasion by Invitation: Rhizobial Infection in Legumes. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 24: 631–639.

Nadeem SM, Ahmad M, Zahir ZA, Javaid A, Ashraf M (2014) The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology Advances** 32: 429–448.

Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L, Renella G (2011). "Role of phosphatase enzymes in soil," in Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling. Soil Biologists Bunemann E., Oberson A., Frossard E., editors. **Berlin: Springer** 215–243.

Newton WE (2000) Nitrogen Fixation in Perspective, in: Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, p. 3–8.

Oliveira, Gevaldo. Andrade L (2010) **Bactérias endofíticas**. p24.

Oliveira A, Almeida A, Carvalho CMB, Tomé JPC, Faustino MAF, Neves MGPMS, Tomé AC, Cavaleiro JAS, Cunha A (2009) Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of *Bacillus cereus* endospores. **Journal of Applied Microbiology** 106: 1986–1995.

Pereira JRA (2013) O mercado de silagem de milho no Brasil. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/artigos/producao/o-mercado-de-silagem-de-milho-no-brasil-205217n.aspx>> Acesso em: 10 de maio de 2018.

Pérez-Montaña F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero F., Cubo T (2014) Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research** 169: 325–336.

Prado RM (2008) **Nutricao de Plantas**, São paulo. Editora FUNEP. 407p.

Prieto P, Schilirò E, Maldonado-González MM, Valderrama R, Barroso-Albarracín JB, Mercado-Blanco J (2011) Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. **Microbial Ecology** 62: 435–45.

Raij BV, Cantarella H (1997) Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo, in: **Boletim Técnico 100**. Campinas, p. 56–59.

Richardson AE, Simpson RJ (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability. **Plant Physiol.**156:989–996.

Richardson AE (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Functional Plant Biology** 28: 897.

Ritchie SW, Hanway JJ, Benson GO (2003) Como a planta de milho se desenvolve. **Encarte de informações agronômicas** 103: 1–20. Disponível em: <<http://www.fs.ind.br/arq/201412050910451264649536.pdf>>

Rocha BC, Limoeiro AGS, Bueno CES, Souza FS, Brait AH (2017) In vitro study of the flow rate of five root canal sealers: Endofill, AH Plus, MTA Fillapex, Sealer 26 and Pulp Canal Sealer EWT. **Dental Press Endodontics** 7 n 2.

Rodríguez H, Fraga R (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnol. Adv.**17319–339.

Rothfuss F, Bender M, Conrad R (1997) Survival and Activity of Bacteria in a Deep, Aged Lake Sediment (Lake Constance). **Microbial Ecology** 33 69–77.

Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters** 278.

Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** 34: 635–648.

Sgroy V, Cassán F, Masciarelli O, Del Papa MF, Lagares A, Luna V (2009) Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 85: 371–381.

Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springerplus** 2 587–600.

Silva K, Perin L, Gomes MDL, Baraúna AC, Duarte GM, Mosqueira CA, Breckenfeld I, Hara GO, Zilli JÉ, (2016) Diversity and capacity to promote maize growth of bacteria isolated from the Amazon region **Acta Amazonica** 46: 111–118.

Souchie EL, Ascon R, Barea JM, Saggin OJ, Silva EMR (2005) Phosphate solubilization in solid and liquid media by soil bacteria and fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 40: 1149–1152.

Souza GLOD, Nietzsche S, Xavier, AA, Costa MR, Perezira MCT, Santos MA (2016) Triple combinations with PGPB stimulate plant growth in micropropagated banana plantlets. **Applied Soil Ecology** 103: 31–35.

Sureshbabu K, Amaresan N, Kumar K (2016) Amazing Multiple Function Properties of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere Soil. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 5: 661–683.

Tanimoto E (2005) Regulation of Root Growth by Plant Hormones—Roles for Auxin and Gibberellin. **Critical Reviews in Plant Sciences** 24: 249–265.

Tikhonovich IA, Provorov NA (2011) Microbiology is the basis of sustainable agriculture: an opinion. **Annals of Applied Biology** 159: 155–168.

Toyota K (2015) *Bacillus*-related Spore Formers: Attractive Agents for Plant Growth Promotion. **Microbes and Environments** 30: 205–207.

USDA (2016): **Economic Research Service US. Brazil's Corn Industry and the Effect on the Seasonal Pattern of U.S. Corn Exports**. AES-93 Disponível em: [https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/35806/59643\\_aes93.pdf?v=42536](https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/35806/59643_aes93.pdf?v=42536). Acesso em 08 março de 2018.

Van Doorn WG, Reid MS (1992). Role of ethylene in flower senescence of *Gypsophila paniculata* L. Postharvest **Biology and Technology** 1: 265–272.

Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrullah Boyce A(2016). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. **Molecules** 21: 573.

Vermeiren H, Willems A, Schoofs G, de Mot R, Keijers V, Hai W, Vanderleyden J (1999) The Rice Inoculant Strain *Alcaligenes faecalis* A15 is a Nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*. **Systematic and Applied Microbiology** 22: 215–224.

Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**.255: 571-586.

Wang H, Wen K, Zhao X, Wang X, Li A, Hong H (2009) The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. **Crop Protection**. 28: 634–639.

Watanabe F, & Olsen SR (1965) Test of an ascorbic acid method for determining P in water and NaHCO<sub>3</sub> extracts from soil. **Soil Science Society of America Proceedings**29: 677–678.

Wellburn AR (1994) The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal Plant Physiology** 144: 307–313.

White JF, Torres MS, Sullivan RF, Jabbour RE, Chen Q, Tadych M, Irizarry I, Bergen MS, Havkin-Frenkel D, Belanger FC (2014) Occurrence of *Bacillus amyloliquefaciens* as a systemic endophyte of vanilla orchids. **Microscopy Research and Technique** 77: 874–885.

Wollum AG (1982) Cultural methods for soil microorganisms, in: Methods of Soil Analysis. Part 2. **Chemical and Microbiological Properties**. p. 781–802.

Woodson WR, Hanchey SH, Chisholm DN (1985) Role of Ethylene in the Senescence of Isolated Hibiscus Petals. **Plant Physiology** 79: 679–683.

Xie S, Wu HJ, Zang H, Wu L, Zhu Q, Gao X (2014) Plant Growth Promotion by Spermidine-Producing *Bacillus subtilis* OKB105. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 27: 655–663.

Zafar M, Abbasi MK, Khan MA, Khaliq A, Sultan T, Aslam M (2012) Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Growth, Nodulation and Nutrient Accumulation of Lentil Under Controlled Conditions. **Pedosphere** 22: 848–859.

Zahir ZA, Munir A, Asghar HN, Shaharoon B, Arshad M (2008) Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 18: 958–963.

Zhang N, Xie YD, Guo HJ, Zhao LS, Xiong HC, Gu JY, Li JH, Kong FQ, Sui L, Zhao ZW, Zhao SR, Liu LX (2016) Gibberellins regulate the stem elongation rate without affecting the mature plant height of a quick development mutant of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Physiology and Biochemistry** 107: 228–236.