

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

*Bacillus* sp. NO CONTROLE DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO EM MILHO

Indianara Müller  
Engenheira Agrônoma/UCEFF  
Mestre em Agronomia/UTFPR

Tese apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Doutora em Fitotecnia  
Área de Concentração de Sanidade Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Setembro de 2019

## CIP - Catalogação na Publicação

Müller, Indianara  
Bacillus sp. NO CONTROLE DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E  
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MILHO / Indianara Müller.  
-- 2019.  
154 f.  
Orientador: Rafael Gomes Dionello.

Coorientador: Roberto Lanna Filho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2019.

1. Rizobactérias. 2. Promoção de crescimento  
vegetal. 3. Biocontrole. 4. Qualidade de sementes. 5.  
Qualidade de grãos. I. Dionello, Rafael Gomes, orient.  
II. Lanna Filho, Roberto, coorient. III. Título.

INDIANARA MÜLLER  
Engenheira Agrônoma - UCEFF  
Mestre em Agronomia - UTFPR

## **TESE**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **DOCTORA EM FITOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em:13/09/2019  
Pela Banca Examinadora

RAFAEL GOMES DIONELLO  
Orientador  
UFRGS

ROBERTO LANNA FILHO  
Coorientador  
UFRGS

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

FRANCIANE LEMES DOS SANTOS

NEIVA KNAAK  
IRGA

LÚCIA BRANDÃO FRANKE  
UFRGS

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, criador de infinito amor, agradeço o dom da vida e o livre arbítrio.
- Aos meus amados pais, José (*In memoriam*) e Iria, meus irmãos, Juari e Joelmir agradeço a segurança e o exemplo de bondade, simplicidade e integridade.
- À família Gallon, Sr. Mario, Salete e Marcio, a generosidade, carinho e suporte.
- Ao meu amado Mateus Gallon, o amor, companheirismo e apoio.
- Ao meu orientador, Prof. Rafael Gomes Dionello, agradeço a orientação, a confiança, o respeito e a paciência.
- Ao meu coorientador, Prof. Roberto Lanna Filho, a disponibilização do laboratório, materiais e equipamentos, além do suporte e orientação.
- Aos servidores da Faculdade de Agronomia da UFRGS, em especial a Helana e Rafael, e aos funcionários da Estação Experimental Agronômica, o apoio essencial à execução dos experimentos.
- Aos professores do PPG Fitotecnia, especialmente ao André Luis Vian e Christian Bredemeier, agradeço a gentileza e o compartilhamento da área experimental.
- A todos os colegas dos Laboratórios de Pós-Colheita de Grãos e Bacteriologia Vegetal, agradeço o auxílio e os momentos compartilhados. Especialmente a Milena Zambiasi, Marcieli Bovolini, Fabiane Bieler, Flavia Tomita Luciana Rehbein, Rafael Barok, Maurício Scarioti, Vinícius Silveira, Alexandre Pisoni e Tiago Einloft, além dos alunos de iniciação científica Daniel Schröpfer, Bruno Welter, Vinícius Wilkomm, Lucas Medeiros e Marco Antônio Melo.
- Aos familiares e amigos, as boas energias, motivação e amparo em momentos difíceis, além de proporcionarem momentos de descontração e alegria.
- À querida Ana Paula Wallauer, o suporte e acompanhamento cuidadoso.
- À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, a oportunidade e estrutura concedida.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a concessão de bolsa de estudos.
- Às mulheres inspiradoras que compuseram a banca avaliadora desta tese, Dra. Franciane Lemes dos Santos, Dra. Neiva Knaak, e Profa. Dra. Lúcia Brandão Franke, a disponibilidade em participar da defesa, o tempo dispendido e generosidade em contribuir com este trabalho.
- Enfim, a todos, mesmo não citados, que direta ou indiretamente participaram dessa conquista, meus sinceros agradecimentos!

# ***Bacillus* sp. NO CONTROLE DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MILHO<sup>1</sup>**

Autora: Indianara Müller

Orientador: Prof. Dr. Rafael Gomes Dionello

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Lanna Filho

## **RESUMO**

Através do controle de fitopatógenos e promovendo o crescimento das plantas, microrganismos melhoram o rendimento das culturas e são alternativas à fertilizantes e agrotóxicos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito de *Bacillus* sp. no crescimento de plantas, qualidade de grãos, bem como no controle de fungos toxigênicos sob aplicação via bacterização de sementes, inoculação do solo e pulverização das plantas na cultura do milho. Foram realizados três estudos utilizando *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix desses isolados. Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Bacteriologia Vegetal e Pós-Colheita de Grãos do Departamento de Fitossanidade, em casa de vegetação do Departamento de Plantas de Lavoura, e a campo, na Estação Experimental Agrônômica da UFRGS. O primeiro estudo consistiu em experimentos de laboratório avaliando o efeito da bacterização de sementes de milho dos híbridos AG 9025, AG 8690 e DKB 230, além das variedades crioulas Jaguarão, Caiano, AZ 30 e AZ 25 sobre a sua qualidade fisiológica e sanitária, além de experimento a campo avaliando o efeito das rizobactérias sobre a qualidade de grãos do híbrido BG 7049. Em sementes, todos os isolados e o mix apresentaram potencial de controle de fungos toxigênicos como *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* spp., sendo o RP103 e RP242 os isolados com maior potencial para as variedades testadas. Os isolados de *Bacillus* sp. contribuíram para a produção de grãos de milho de maior qualidade reduzindo a porcentagem de grãos mofados e ardidos. O segundo estudo consistiu em um experimento em casa de vegetação com quatro variedades de milho (AZ 25, AG 8690, BG 7049 e DKB 230) e um experimento a campo, com o híbrido BG 7049, avaliando o efeito das rizobactérias sob diferentes formas de aplicação sobre o crescimento de plantas e rendimento de grãos. As rizobactérias testadas promoveram incremento de produtividade de milho, com destaque para o Mix bacteriano que aumentou em 18,8% o rendimento da cultura. O terceiro estudo consistiu na avaliação da capacidade dos isolados em suprimir a contaminação por fungos toxigênicos nos grãos de milho obtidos no experimento a campo. Os isolados reduziram a incidência de fungos toxigênicos nos grãos, e poderiam ser explorados como bioformulados. Os estudos a nível de campo são imprescindíveis para avaliar a influência das rizobactérias em promover o crescimento e rendimento de grãos de milho.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (154f.) Setembro, 2019.

## **Bacillus sp. IN TOXIGENIC FUNGI CONTROL AND PLANT GROWTH PROMOTION IN MAIZE <sup>2</sup>**

Author: Indianara Müller

Advisor: Prof. Dr. Rafael Gomes Dionello

Co-advisor: Prof. Dr. Roberto Lanna Filho

### **ABSTRACT**

Through the control of phytopathogens and plant growth promotion, beneficial microorganisms enhance crop yields and provide alternatives to fertilizers and pesticides. This study aimed to evaluate the effect of *Bacillus* sp. on plant growth, corn grain quality, and the control of toxigenic fungi through seed bacterization, soil inoculation, and plant spraying. To achieve this, three studies were conducted using *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242, and a mix of these isolates as biocontrol agents. The experiments were conducted at the Plant Bacteriology and Grain Postharvest laboratories of the Plant Health Department, in a greenhouse of the Crop Plant Department, and in the field, and at the Agronomic Experimental Station, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS. The first study consisted of laboratory experiments evaluating the effect of seed bacterization on the physiological and sanitary quality of maize seeds from the hybrids AG 9025, AG 8690, and DKB 230, as well as the varieties Jaguarão, Caiano, AZ 30, and AZ 25. A field experiment also evaluated the effect of rhizobacteria on the grain quality of the BG 7049 hybrid. All isolates and the mix showed potential to control toxigenic fungi such as *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. and *Penicillium* spp., with RP103 and RP242 being the isolates with the highest potential for the varieties evaluated. *Bacillus* sp. isolates contributed to the production of higher quality corn grains by reducing the percentage of moldy and ear rot grains. The second study involved a greenhouse experiment with four maize varieties (AZ 25, AG 8690, BG 7049, and DKB 230) and a field experiment with BG 7049 hybrid, evaluating the effect of rhizobacteria under different application methods on plant growth and grain yield. Overall, the tested rhizobacteria promoted increased maize productivity, with the bacterial mix notably enhancing crop yield by 18.8%. The third study evaluated the isolate's ability to suppress toxigenic fungal contamination in corn grains obtained from the field experiment. The isolates reduced the incidence of toxigenic fungi in the grains and could be explored as bioformulated products. Field-level studies are essential to assess the influence of rhizobacteria in promoting maize growth and grain yield.

---

<sup>2</sup> Doctoral Thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (154p.) September, 2019.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 A cultura .....	4
2.2 Qualidade de grãos.....	6
2.3 Micotoxinas.....	7
2.4 Manejo de doenças em milho.....	9
2.4.1 Controle Biológico.....	11
2.5 <i>Bacillus</i> .....	13
2.6 Promoção de crescimento vegetal.....	16
2.6.1 Mecanismos de promoção de crescimento.....	18
2.7 Referências Bibliográficas.....	22
3 CAPÍTULO 1 - Efeito de <i>Bacillus</i> sp. sobre a qualidade de sementes e grãos de milho.....	35
3.1 Introdução.....	37
3.2 Material e Métodos.....	39
3.2.1 Produção do Inóculo Bacteriano.....	43
3.2.2 Qualidade de Sementes do Experimento em Laboratório.....	44
3.2.3 Qualidade de Grãos do Experimento a Campo.....	45
3.2.4 Análise estatística.....	46
3.3 Resultados e Discussão.....	47
3.3.1 Qualidade de Sementes.....	47
3.3.2 Qualidade de Grãos.....	58
3.4 Conclusões.....	69
3.5 Referências Bibliográficas.....	70

	Página
4	CAPÍTULO 2 - <i>Bacillus</i> sp. na promoção de crescimento em milho..... 80
	4.1 Introdução..... 82
	4.2 Material e Métodos..... 84
	4.2.1 Preparação dos inóculos..... 84
	4.2.2 Aplicação dos agentes de biocontrole..... 84
	4.2.3 Casa de vegetação..... 84
	4.2.4 Campo..... 85
	4.2.5 Análise estatística..... 87
	4.3 Resultados e Discussão..... 88
	4.3.1 Casa de vegetação..... 88
	4.3.2 Campo..... 94
	4.4 Conclusões..... 102
	4.5 Referências Bibliográficas..... 103
5	CAPÍTULO 3 - <i>Bacillus</i> sp. no biocontrole de fungos toxigênicos em milho..... 114
	5.1 Introdução..... 116
	5.2 Material e Métodos..... 118
	5.2.1 Preparação dos inóculos..... 119
	5.2.2 Aplicação dos tratamentos..... 119
	5.2.3 Avaliações..... 120
	5.2.4 Análise estatística..... 120
	5.3 Resultados e Discussão..... 121
	5.3.1 <i>Fusarium</i> sp. .... 121
	5.3.2 <i>Penicillium</i> spp. .... 123
	5.3.3 <i>Aspergillus</i> sp. .... 126
	5.4 Conclusões..... 129
	5.5 Referências Bibliográficas..... 130
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 139

## RELAÇÃO DE TABELAS

Página

### CAPÍTULO 1

1. Relação dos quinze tratamentos de dois experimentos de laboratório, ambos compostos por três híbridos de milho sem ou com tratamento de sementes comercial – TSC (Standak® Top) em combinação com cinco isolados de *Bacillus* sp. UFRGS - Porto Alegre, 2019. .... 40
2. Relação dos vinte tratamentos de um experimento de laboratório compostos por quatro variedades de milho crioulo sem tratamento de sementes comercial em combinação com cinco isolados de *Bacillus* sp. UFRGS - Porto Alegre, 2019. .... 41
3. Relação dos vinte tratamentos do experimento a campo compostos por Sementes de milho do híbrido BG 7049, com e sem tratamento de sementes convencional (TSC) em combinação com duas formas de aplicação de cinco isolados de *Bacillus* sp. UFRGS - Porto Alegre, 2019. .... 42
4. Porcentagem de Germinação de sementes de milho submetidos à bacterização com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano. UFRGS - Porto Alegre, 2019. .... 47
5. Comprimento de plântulas (cm) de híbridos e variedades de milho com ou sem Tratamento de Sementes Comercial (TSC) cujas sementes foram submetidas à bacterização com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um mix bacteriano. UFRGS – Porto Alegre, 2019. .... 49
6. Massa Seca de Plântulas de milho (mg plântula<sup>-1</sup>) cujas sementes foram submetidas à bacterização com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano. UFRGS - Porto Alegre, 2019. .... 51
7. Porcentagem de incidência de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., e *Penicillium* spp., detectados em sementes de híbridos de milho sem Tratamento de Sementes Comercial (TSC) submetidas à bacterização com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano. UFRGS - Porto Alegre, 2019. .... 53
8. Porcentagem de incidência de *Fusarium* sp., e *Penicillium* spp., detectados em sementes de híbridos de milho com Tratamento de Sementes Comercial (TSC) submetidas à bacterização com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis*

	RP103, <i>Bacillus velezensis</i> RP242 e um Mix bacteriano. UFRGS - Porto Alegre, 2019.....	54
9.	Porcentagem de incidência de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> spp. e <i>Rhizopus</i> spp., detectados em sementes de variedades crioulas milho sem TSC submetidas à bacterização com <i>Bacillus safensis</i> RF69, <i>Bacillus velezensis</i> RP103, <i>Bacillus velezensis</i> RP242 e um Mix bacteriano. UFRGS - Porto Alegre, 2019.....	56
10.	Peso de Mil Grãos (PMG) e Massa Específica (ME) de grãos de milho após a colheita e secagem de experimento testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com <i>Bacillus safensis</i> RF69, <i>Bacillus velezensis</i> RP103, <i>Bacillus velezensis</i> RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019. ....	61
11.	Porcentagem de Grãos Mofados após a colheita e secagem de experimento de milho testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com <i>Bacillus safensis</i> RF69, <i>Bacillus velezensis</i> RP103, <i>Bacillus velezensis</i> RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.....	63
12.	Porcentagem de Grãos Ardidos após a colheita e secagem de experimento de milho testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com <i>Bacillus safensis</i> RF69, <i>Bacillus velezensis</i> RP103, <i>Bacillus velezensis</i> RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.....	64
13.	Porcentagem de Grãos Chochos após a colheita e secagem de experimento de milho testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com <i>Bacillus safensis</i> RF69, <i>Bacillus velezensis</i> RP103, <i>Bacillus velezensis</i> RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.....	65
14.	Porcentagem de Total de Grãos Avariados (Mofados+Ardidos+Chochos) após a colheita e secagem de experimento de milho testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com <i>Bacillus safensis</i> RF69, <i>Bacillus velezensis</i> RP103, <i>Bacillus velezensis</i> RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.....	66
15.	Porcentagem de Matérias Estranhas e Impurezas em massa de grãos de milho após a colheita e secagem de experimento de milho testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com <i>Bacillus safensis</i> RF69, <i>Bacillus velezensis</i> RP103, <i>Bacillus velezensis</i> RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.....	67
16.	Tipificação de grãos de milho obtidos de experimento de milho testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com <i>Bacillus safensis</i> RF69, <i>Bacillus velezensis</i> RP103, <i>Bacillus velezensis</i> RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.....	68

## CAPÍTULO 2

1. Resumo da Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), referente à avaliação de altura de plantas e diâmetro de colmo de milho aos 15 e 30 dias após a semeadura (DAS) em relação a forma de aplicação dos tratamentos (F. Aplicação), Variedade (Var), e Isolado bacteriano (Iso) em casa de vegetação. UFRGS - Porto Alegre, 2019..... 88
2. Efeito de quatro variedades de milho (AZ 25, AG 8690, BG7049, e DKB 230) e duas formas de aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) de isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242 e um mix) sobre a altura de plantas (cm) aos 15 dias após a semeadura (DAS) em casa de vegetação. UFRGS - Porto Alegre, 2019. .... 89
3. Efeito de quatro variedades de milho (AZ 25, AG 8690, BG7049, e DKB 230) e duas Formas de Aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) de isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242 e um mix) sobre a altura de plantas (cm) aos 30 dias após a semeadura (DAS) em casa de vegetação. UFRGS - Porto Alegre, 2019. .... 89
4. Efeito de três isolados de *Bacillus* (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103 *B. velezensis* RP242) e um mix desses isolados, aplicados via bacterização de sementes e inoculação do solo, sobre altura de plantas (cm) aos 15 e 30 dias após a semeadura (DAS) em casa de vegetação. UFRGS - Porto Alegre, 2019. .... 90
5. Efeito de quatro variedades de milho (AZ 25, AG 8690, BG7049, e DKB 230) e duas Formas de Aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) de isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103 *B. velezensis* RP242 e um mix) sobre o diâmetro de colmo (mm) aos 15 e 30 dias após a semeadura (DAS) em casa de vegetação. UFRGS - Porto Alegre, 2019. .... 91
6. Efeito de quatro variedades de milho (AZ 25, AG 8690, BG7049, e DKB 230) e duas Formas de Aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) de isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103 *B. velezensis* RP242 e um mix) sobre a massa seca de raiz (g) aos 45 dias após a semeadura (DAS) em casa de vegetação. UFRGS - Porto Alegre, 2019. .... 93
7. Efeito das formas de aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) de isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242 e um mix) e da presença de tratamento de sementes convencional (TSC) sobre a altura de plantas (cm) aos 15, 30, 45 e 60 dias após a semeadura (DAS) do híbrido de milho BG7049 em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019. .... 95
8. Efeito das formas de aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) de isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242 e um Mix) sobre o número de Grãos por Fileira, número de Fileiras por espiga, e número de grãos por espiga do híbrido de milho BG7049 em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019. .... 99

9. Rendimento de grãos de milho (kg ha<sup>-1</sup>) do híbrido BG7049 em função do tratamento com isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242 e Mix) sob duas formas de aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) e duas condições de tratamento de sementes convencional (Com e Sem TSC) em experimento a campo. UFRGS – Porto Alegre, 2019. .... 101

### CAPÍTULO 3

1. Efeito de Agentes de biocontrole (Tratamento controle, *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e Mix bacteriano) e Formas de Aplicação desses agentes (Bacterização de sementes, Inoculação do Solo e Pulverização de Plantas) sobre os dados médios de porcentagem de incidência de *Fusarium* sp. em grãos de milho do híbrido BG 7049. UFRGS - Porto Alegre, 2019.. .... 122
2. Efeito de TSC (Com e Sem) e Formas de Aplicação (Bacterização de sementes, Inoculação do Solo e Pulverização de Plantas) de agentes de biocontrole (Tratamento controle, *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e Mix bacteriano) sobre os dados médios de porcentagem de incidência de *Penicillium* spp. em grãos de milho do híbrido BG 7049. UFRGS - Porto Alegre, 2019..... 124
3. Efeito de TSC (Com e Sem) e Formas de Aplicação (Bacterização de sementes, Inoculação do Solo e Pulverização de Plantas) de agentes de biocontrole (Tratamento controle, *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e Mix bacteriano) sobre os dados médios de porcentagem de incidência de *Aspergillus* sp. em grãos de milho do híbrido BG 7049. UFRGS - Porto Alegre, 2019..... 127

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

### CAPÍTULO 1

1. Teor de água (%) em grãos de milho após a colheita de experimento testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019..... 59
2. Efeito dos isolados *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e do Mix bacteriano sobre a porcentagem de Total de Avariados em grãos de milho após colheita de experimento testando aplicação via bacterização de sementes e inoculação do solo com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019..... 66

### CAPÍTULO 2

1. Efeito de *Bacillus* sp. sobre altura de plantas de milho (cm) do híbrido BG7049 aos 15, 30, 45 e 60 dias após a semeadura (DAS) em experimento a campo submetido ao tratamento com os isolados *B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242 e um Mix dos três isolados sob duas formas de aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) e duas condições de tratamento de sementes convencional (Com e Sem TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019..... 97

### CAPÍTULO 3

1. Efeito de Agentes de biocontrole (*Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e Mix bacteriano) sobre dados médios de porcentagem de incidência de *Penicillium* spp. em grãos de milho obtidos em experimento a campo testando a utilização de Tratamento Industrial de

	Sementes (TSC) em interação com Agentes de biocontrole e Formas de Aplicação desses agentes (Bacterização de sementes, Inoculação do Solo e Pulverização de Plantas). UFRGS - Porto Alegre, 2019.....	125
2.	Efeito de Agentes de biocontrole ( <i>Bacillus safensis</i> RF69, <i>Bacillus velezensis</i> RP103, <i>Bacillus velezensis</i> RP242 e Mix bacteriano) sobre dados médios de porcentagem de incidência de <i>Aspergillus</i> sp. em grãos de milho obtidos em experimento a campo testando a utilização de Tratamento Industrial de Sementes (TSC) em interação com Agentes de biocontrole e Formas de Aplicação desses agentes (Bacterização de sementes, Inoculação do Solo e Pulverização de Plantas). UFRGS - Porto Alegre, 2019.....	128

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda e a valorização da cultura do milho (*Zea mays* L.) têm aumentado, o que impulsiona a mesma para avanços em diversos aspectos agronômicos, principalmente por se tratar de uma cultura com elevado potencial produtivo e bastante responsiva à aplicação de tecnologias. A importância dessa cultura se dá por ser fonte de alimento para humanos e matéria prima para ração animal. O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores e exportadores desse grão no mundo. No entanto, ainda é expressivo o número de perdas quantitativas e qualitativas em função de diversos fatores pré e pós-colheita.

Dentre os fatores que contribuem para a perda de qualidade e quantidade dos grãos destacam-se: características da espécie e da variedade, condições ambientais durante o seu desenvolvimento, época de plantio e colheita, procedimento de colheita, método de secagem e práticas de armazenagem. Após a colheita, os fatores mais importantes que influenciam os grãos são a temperatura e a umidade, elementos chaves para a ocorrência de pragas, contaminação fúngica e sua consequente produção de micotoxinas.

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos como *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus flavus*, que são potencialmente produtores de micotoxinas como a Fumonisina B1 e Aflatoxina B1, respectivamente. A alternativa mais eficaz para reduzir a contaminação em grãos é através do controle desses microrganismos com fungicidas. Em contrapartida têm-se buscado reduzir a utilização de produtos químicos para este fim, considerando sua toxicidade e potencial contaminação do meio ambiente.

Alternativas como o controle biológico de fungos têm sido estudadas há bastante tempo. Nesse sentido, bactérias provenientes do solo rizosférico possuem vantagens competitivas em relação aos fungos fitopatogênicos apresentando grande potencial para controle biológico. Isso porque são extremamente adaptados ao ambiente, conseguem sobreviver com poucas fontes de nutrientes, em diversas condições de estresse ambiental e possuem crescimento rápido. Existem bactérias do sistema radicular de milho com grande potencial para o biocontrole de *A. flavus* e *F. verticillioides*, com características ideais para o desenvolvimento de um bioformulado objetivando o controle micotoxigênico.

Outro fator importante que pode colaborar para o aumento da quantidade e da qualidade de grãos é a promoção de crescimento em plantas mediada por microrganismos como rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP). A aplicação dessas bactérias constitui uma ferramenta importante na viabilização de uma agricultura mais sustentável, uma vez que representam alternativa promissora aos fertilizantes químicos, exigidos em vasta quantidade nas lavouras. As RPCP são um grupo de bactérias capazes de colonizar ativamente o sistema radicular e favorecer seu crescimento e produtividade através de diversos mecanismos com efeitos na fisiologia das plantas.

O papel dos microrganismos na agricultura proporcionou avanços também na economia. Um exemplo de sucesso nessa área é o benefício direto da menor dependência de fertilizantes químicos em detrimento da utilização da inoculação e co-inoculação. Nos últimos anos, o desenvolvimento de inoculantes para controle de patógenos e promoção de crescimento de plantas surgiu como uma alternativa, mas de forma geral a sua aplicação como bioformulado tem muito ainda a evoluir, especialmente nos países em desenvolvimento.

Dentre as características ideais de isolados bacterianos para o desenvolvimento de um bioformulado estão requerimento nutricional baixo, tempo de geração curto, rápida multiplicação e proliferação, alta capacidade competitiva e de sobrevivência, intensa atividade antifúngica em diferentes substratos, estabilidade fisiológica, além de manutenção da eficácia antifúngica quando o objetivo é o biocontrole. Os isolados *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103 e *Bacillus velezensis* RP242 já demonstraram ser extremamente

promissores para o biocontrole de fungos toxigênicos, redução do acúmulo de aflatoxina B1 e fumonisina B1 em grãos e ainda potencial para promover o crescimento em plântulas de milho.

No entanto, essas estirpes nunca foram testadas em ambiente rizosférico não esterilizado e sob condições de campo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da bacterização com três isolados de *Bacillus* sp. sobre a qualidade de sementes de variedades de milho, o efeito da bacterização de sementes e inoculação de *Bacillus* sp. no solo sobre a promoção de crescimento em casa de vegetação e a campo, além do efeito desses tratamentos com *Bacillus* sp. sobre a qualidade de grãos e no controle de fungos toxigênicos em milho nas condições de campo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie que pertence à família *Poaceae*, com origem no teosinto, subespécie mexicana [*Zea mays* L. subsp. *mexicana* (Schrader) Iltis]. Essa espécie tem como centro de origem os países México e Guatemala. Devido ao seu processo de domesticação e aprimoramento de seu cultivo é, atualmente, o terceiro cereal mais cultivado do planeta, adaptado a uma ampla gama de condições climáticas. Cultivado desde o Equador até o limite das terras temperadas, inclusive em altitudes que variam do nível do mar até 3 mil metros (Magalhães e Durães, 2006; Lerayer *et al.*, 2006).

Os maiores produtores mundiais de milho são os Estados Unidos, a China e o Brasil (USDA, 2019), que juntos produzem aproximadamente 725 milhões de toneladas. Devido ao aumento da produção e consumo de carnes brancas na Ásia e pelo aumento do uso de milho para etanol nos Estados Unidos da América (EUA) tem aumentado a demanda mundial por milho (Abramilho, 2010).

No Brasil, segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2016) o foco inicial seria o cultivo do grão para atender ao consumo humano direto, no entanto, a menor parte da produção é para este fim. O principal destino da colheita são as indústrias de rações para animais. Em diferentes sistemas produtivos, o milho é cultivado principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. O grão é transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose e flocos para cereais matinais. As principais utilizações do milho no mundo são nas atividades de criação de aves e suínos (Miranda *et al.*, 2012; Abimilho, 2019).

Para que o grão colhido apresente bom padrão de qualidade é importante o produtor integrar a colheita ao sistema de produção e planejar todas as fases.

Nesse sentido, todas as etapas, desde a implantação da cultura, até o transporte, secagem e armazenamento dos grãos têm de estar diretamente relacionadas (Cruz *et al.*, 2010). O manejo integrado de pragas, principalmente aquelas que atacam as espigas e os grãos é importante para diminuir a entrada de fungos que produzem micotoxinas, substâncias causadoras de problemas sérios à saúde animal e humana (Lerayer *et al.*, 2006).

As mudanças que vêm ocorrendo nos sistemas de produção de milho no Brasil comprovam a profissionalização dos produtores. Dentre os avanços tecnológicos pode-se incluir a utilização de cultivares de alto potencial genético, cultivares transgênicas com resistência a lagartas, espaçamento reduzido com maior densidade, melhoria na qualidade e tratamento de sementes, modernização de máquinas e equipamentos, correção do solo baseada no sistema de cultivo como um todo, plantio direto e o controle químico de doenças (Cruz *et al.*, 2010).

A cultura tem ampla disseminação no país, isto se deve principalmente à sua multiplicidade de usos na propriedade rural e à tradição de cultivo do cereal pelos agricultores (Magalhães *et al.*, 2002). Recentemente, tem-se verificado um decréscimo na área plantada no período da primeira safra, em decorrência da concorrência com a soja. O decréscimo tem sido compensado pelo aumento dos plantios na segunda safra, que há pouco tempo era considerada uma safra pequena e de baixa produtividade (safrinha), mas que ao longo das últimas duas décadas foi ganhando representatividade (Miranda *et al.*, 2012).

Dentre os cereais mais cultivados no Brasil, o milho é o mais expressivo. Devido principalmente às suas características fisiológicas, a cultura do milho tem alto potencial produtivo, atingindo produtividades superiores a  $16 \text{ t ha}^{-1}$ . No entanto, a produtividade média nacional é baixa, cerca de  $5,7 \text{ t ha}^{-1}$  (CONAB, 2019). Em função do aumento da oferta de milho nas últimas safras no Brasil, vem ocorrendo diminuições consideráveis no volume de milho importado, sendo que a projeção de importação para a safra 2018/2019 foi de meio milhão de toneladas. O estoque final está estimado em 17 milhões de toneladas, suficiente para cerca de três meses de consumo (CONAB, 2019).

Em projeções realizadas para 26 produtos do agronegócio, incluindo o milho, o MAPA afirma que as exportações desse grão devem passar de 41 milhões de

toneladas até 2028/29. Para manter o consumo interno projetado de 74,8 milhões de toneladas e garantir um volume razoável de estoques finais e o nível de exportações projetado, a produção projetada deverá situar-se entre 114,5 e 140,0 milhões de toneladas em 2028/29 (Brasil, 2019). A área plantada de milho no estado do Rio Grande do Sul teve aumento de 3,5% na safra 2018/2019 em relação à safra 2017/2018, ao passo que para produtividade houve elevação de 15,4% entre uma safra e outra (CONAB, 2019).

## **2.2 Qualidade de grãos**

A qualidade de grãos é influenciada pela interação entre uma série de fatores bióticos e abióticos. O conhecimento dos pontos críticos de controle durante o cultivo, secagem e armazenamento são essenciais para o desenvolvimento de estratégias preventivas efetivas na pós-colheita. Um manejo efetivo requer constante monitoramento e limpeza do ambiente de armazenamento para garantir que a contaminação por micotoxinas seja minimizada e os grãos possam ser armazenados e processados com segurança (Magan & Aldred, 2007).

A dinâmica populacional de patógenos têm sofrido modificações importantes devido à expansão da fronteira agrícola, a ampliação das épocas de plantio, a adoção do sistema de plantio direto, o aumento do uso de sistemas de irrigação, a ausência de rotação de cultura e o uso de materiais suscetíveis. Isso tem resultado no surgimento de novos problemas para a cultura relacionados à ocorrência de doenças a cada safra (Silva, Cota & Costa, 2015). A situação se agrava nos países em desenvolvimento, pois as perdas pós-colheita são maiores em função das condições inadequadas de transporte e armazenamento (Sharma *et al.*, 2009), o que colabora ainda mais para a ocorrência de pragas e contaminações fúngicas.

Para um manejo sustentável de micotoxinas ao longo da cadeia produtiva, as estratégias preventivas envolvem um sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Recomenda-se: seguir boas práticas agrícolas, do transporte até o consumo; efetivo manejo de pragas; adoção e sustentabilidade da educação para a segurança alimentar pertinentes; aplicação cuidadosa e sistemática da legislação em matéria de segurança alimentar; adoção e utilização

de métodos sensíveis e confiáveis para a detecção de micotoxinas (Rahmani *et al.*, 2009; Chulze, 2010; Medeiros *et al.*, 2012; Adegoke & Letuma, 2013).

Nesse contexto, são imprescindíveis medidas como a utilização de cultivares resistentes, plantio em época adequada, evitando que períodos críticos para a cultura coincidam com condições ambientais mais favoráveis ao desenvolvimento de doenças, a utilização de sementes de boa qualidade e tratadas, a rotação com culturas não suscetíveis, rotação de cultivares, adubação equilibrada, população de plantas adequada, controle de pragas e de invasoras, além de colheita na época correta (Silva, Cota & Costa, 2015).

No Brasil, a classificação da qualidade dos grãos de milho é normatizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e, através dessa, os defeitos do milho são verificados e classificados em tipos. Os defeitos podem ser *grãos ardidos*: apresentam escurecimento total, por ação do calor, umidade ou fermentação avançada atingindo a totalidade da massa do grão, com aspecto semelhante a grãos totalmente queimados; *grãos chochos ou imaturos*: desprovidos de massa interna, enrijecidos e que se apresentam enrugados por desenvolvimento fisiológico incompleto; *grãos fermentados*: que apresentam escurecimento parcial do germe ou do endosperma provocado por processo fermentativo ou calor, semelhantes a grãos que se apresentam parcialmente queimados; *grãos germinados*: que apresentam início visível de germinação; *grãos gessados*: que tenham sofrido variação na sua cor natural, esbranquiçados ou opacos, mostrando no seu interior todo o endosperma amiláceo com cor e aspecto de gesso (farináceo); e ainda, *grãos mofados*: grãos ou pedaços de grãos que apresentam contaminações fúngicas visíveis a olho nu, independentemente do tamanho da área atingida, e grãos ou pedaços de grãos que apresentam coloração esverdeada ou azulada no germe, produzida pela presença de fungos (Brasil, 2016).

### **2.3 Micotoxinas**

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos. Em produtos agrícolas, ocorrem antes ou após a colheita quando em condições favoráveis de umidade do produto, umidade relativa do ar e temperatura ambiente.

Quando ingeridos, inalados ou absorvidos através da pele, as micotoxinas podem causar mal-estar, doenças ou até a morte de humanos e animais (Spadaro & Gullino, 2004; Wagacha & Muthomi, 2008; Köppen *et al.*, 2010).

A maioria das micotoxinas preocupantes é produzida por três gêneros de fungos, denominados *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* além de gêneros de fungos dematiáceos (*Alternaria*, *Helminthosporium*, *Drechslera*, *Phoma* e *Zygosporium*). Dentro do gênero *Aspergillus*, a principal classe de micotoxinas são as aflatoxinas. *Aspergillus flavus* é um contaminante comum na agricultura, pode infectar as culturas antes da colheita, causando riscos ao crescimento e desenvolvimento da planta, bem como à saúde do consumidor, uma vez que as culturas infectadas por aflatoxina são periodicamente devolvidas aos solos agrícolas (Ismaiel & Papenbrock, 2015).

O fungo *Aspergillus flavus* é um fitopatógeno que tem habilidade de colonizar grande número de culturas, incluindo o milho, algodão, amendoim entre outras (Diener *et al.*, 1987). Este fungo pode ser encontrado no solo ou em outros substratos e contamina o milho armazenado. É muito comum no Brasil em razão do clima tropical e a maior parte das perdas ocasionadas por ele não são em virtude da expressão de sintomas do fungo *Aspergillus*, e sim, ao efeito secundário, que é a subsequente contaminação do produto, com o metabólito fúngico aflatoxina (Chanda *et al.*, 2009; Monge *et al.*, 2012; Fakruddin *et al.*, 2015).

*Penicillium* spp. são mais tipicamente associados ao armazenamento de culturas e à produção de micotoxinas, como citrinina (CTN), patulina (PAT), e ocratoxina (OTA). A ocratoxina geralmente é formada no armazenamento ou durante a secagem de certas mercadorias para processamento. Dentro do gênero *Fusarium*, existem várias espécies importantes produtoras de micotoxinas. Alguns patógenos vegetais importantes estão nesse gênero. A podridão da espiga pode ser causada por *Fusarium* spp., *F. graminearum* é o principal agente causador, no entanto, outras espécies como *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. moniliforme* e *F. subglutinans* podem causar podridão da espiga. Esses últimos agentes podem produzir deoxinivalenol (DON), nivalenon (NIV), toxina T-2, moniliformina (MON), fumonisina B1 (FB1), fusarina C, e zearalenona (ZEA) durante o estado patogênico em diferentes culturas agrícolas

(Ismail & Papenbrock, 2015). As aflatoxinas, com elevado potencial carcinogênico, e as fumonisinas, têm sido relacionadas à ocorrência de câncer de esôfago em humanos. Além de possuírem elevada capacidade toxigênica em humanos e animais, ocorrem com elevada frequência e concentração nos grãos e em produtos derivados (Camargos *et al.*, 2002; Lerayer *et al.*, 2006; Reddy & Salleh, 2011; Silva, Cota & Costa, 2015).

A espécie fúngica *F. verticillioides* é amplamente distribuída no mundo e é particularmente associada ao milho e encontrada com maior frequência em regiões tropicais e subtropicais. Trata-se do agente causal primário da podridão de *Fusarium* (Munkvold, 2003). A infecção nas plantas pode ocorrer pelo solo, pelo ar, penetrando diretamente nas espigas ou por sementes contaminadas, proporcionando o crescimento sistemático do fungo, que endofiticamente coloniza todas as partes da planta (Nayaka *et al.*, 2008).

De qualquer maneira, essas toxinas são danosas para o homem e para os animais, pois agem diretamente no fígado. As doenças causadas, chamadas de micotoxicoses, podem causar danos como redução no crescimento, interferência no funcionamento de órgãos vitais do organismo, produção de tumores malignos e até a morte. As principais condições que levam os fungos a produzirem micotoxinas são a deficiência no armazenamento dos grãos (umidade e temperatura), a maior permanência das lavouras no campo e o ataque de insetos. Cerca de 45% do milho produzido no Brasil é contaminado por micotoxinas (Lerayer *et al.*, 2006; Silva, Cota & Costa, 2015).

#### **2.4 Manejo de doenças em milho**

A utilização de cultivares resistentes, rotação de cultura, tratamento de sementes, redução da densidade de plantas, adubação equilibrada, principalmente com potássio e nitrogênio, são algumas formas de manejo descritas para doenças na cultura do milho (Trento, 2002; Sangoi, 2003; Barbosa, 2010; Alves *et al.*, 2012; Munhoz *et al.*, 2015). O controle de doenças do milho por meio da aplicação de fungicidas pode contribuir também para a redução na incidência de grãos avariados (Brito *et al.*, 2012).

Segundo Fancelli & Dourado Neto (2004), a resistência genética é uma das formas mais eficientes no manejo de doenças, sem custo adicional nem impactos negativos ao ambiente, no entanto, não se recomenda utilizá-la como única forma de manejo, considerando que não contempla todos os patógenos prejudiciais à cultura. Outras formas de manejo importantes incluem a escolha da época de colheita, já que a antecipação ou o atraso na colheita podem determinar os níveis de umidade dos grãos e o tempo de permanência deles no campo. E para os patógenos de pós-colheita recomenda-se a limpeza e secagem adequada dos grãos, com armazenamento em condições apropriadas de temperatura, umidade e aeração em local limpo (Munkvold & Desjardins, 1997; Lima, 2017).

As possíveis estratégias de intervenção que podem contribuir para diminuir a contaminação fúngica incluem boas práticas agrícolas como colheita adequada, secagem, limpeza, armazenamento adequado, controle de insetos. Outras possibilidades incluem controle biológico, controle químico, descontaminação, melhoramento para resistência, bem como conscientização e fiscalização. Há necessidade de amostragem correta, utilização de métodos de análise que possam ser utilizados para a detecção eficiente de micotoxinas nos países em desenvolvimento (Wagacha & Muthomi, 2008).

O uso de fungicidas na cultura do milho é recomendado principalmente via tratamento de sementes industrial, com o objetivo de controlar e/ou erradicar fungos associados à semente e protegê-las nas fases de germinação e emergência de patógenos habitantes do solo (Rosa *et al.*, 2017). A aplicação via foliar é recomendada nas situações de elevada severidade de doenças (Silva, Cota & Costa, 2015). O nível de incidência de doenças é obtido com o monitoramento da lavoura à procura das primeiras infecções. Condições como essa são resultantes da combinação de fatores como o uso de genótipos suscetíveis, condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento das doenças, e plantio direto sem rotação de culturas (Silva, Cota & Costa, 2015).

Quando a cultura atinge a fase do pendoamento, seu potencial produtivo já está definido, pois os quatro componentes de produtividade (número de plantas por hectare, número de espigas por planta, número de fileiras por espiga, e número de grãos por fileira) que poderiam resultar em aumento do número de grãos já

ocorreram. A partir desse momento, ocorre apenas a realização do potencial produtivo através do enchimento dos grãos. A aplicação de fungicidas nessa fase não aumenta o potencial produtivo da cultura, mas evita perdas na produtividade em função da proteção conferida durante o período de enchimento dos grãos (Silva, Cota & Costa, 2015).

#### **2.4.1 Controle Biológico**

Ao contrário do controle químico, os agentes de biocontrole geralmente oferecem alternativas de manejo da doença, utilizando mais do que um mecanismo de ação. Esta característica confere várias vantagens sobre o controle de pragas, principalmente devido a uma probabilidade inferior de selecionar fitopatógenos resistentes (Medeiros *et al.*, 2012). Alguns exemplos de integração do controle biológico com métodos pós-colheita já foram propostos. Assim, as condições de armazenagem, tratamentos físicos e químicos têm sido usados em combinação com agentes de biocontrole e seu efeito sinérgico têm aumentado o nível de controle das doenças (Janisiewicz & Conway, 2010; Medeiros *et al.*, 2012).

Algumas características de isolados como requerimento nutricional baixo, tempo de geração curto, rápida multiplicação e proliferação, alta capacidade competitiva e de sobrevivência, intensa atividade antifúngica em diferentes substratos, estabilidade fisiológica e manutenção da eficácia antifúngica são ideais para obtenção de bioformulados objetivando controle micotoxigênico (Einloft, 2016).

As estratégias de biocontrole envolvem a utilização de organismos antagonistas e pode ser de natureza direta ou indireta. O antagonismo direto sobre os fitopatógenos diz respeito aos mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes, secreção de enzimas líticas, alteração de pH e a síntese de compostos voláteis. Já o mecanismo indireto é exercido pelo fenômeno de resistência sistêmica induzida (Ongena *et al.*, 2007; Barra *et al.*, 2009; Carvalho, 2012; Cardoso & Andreote, 2016).

Esses organismos antagonistas, uma vez isolados, quando utilizados em testes de laboratório são expostos às condições ideais de crescimento que culmina, teoricamente, na máxima expressão do seu potencial antagonista. Já quando

submetidos às condições de campo acabam sendo expostos às variáveis ambientais, que não podem ser controladas, mesmo em condições experimentais.

Dentre as variáveis que podem influenciar nos resultados do uso de *Bacillus* no controle de fungos toxigênicos no campo estão a exposição a fatores abióticos, como temperatura e atividade de água, resultante do déficit ou excesso de molhamento através da precipitação pluviométrica ou irrigação como em função da localização geográfica, clima e estação do ano. Além disso, estão propensos à influência de fatores bióticos, como a interação com plantas e outros microrganismos. Essa interação, segundo Begon *et al.* (2007) é dependente também dos fatores ambientais, que são decisivos na determinação da coexistência ou dominância de uma espécie sobre a outra.

As oscilações no ambiente estão diretamente relacionadas com o metabolismo dos microrganismos, contribuindo para patógenos e outros antagonistas, podendo ocasionalmente comprometer a ação antagonista dos agentes de biocontrole. Assim, conforme Cotty e Mellon (2006), o ideal é que a atividade inibitória do microrganismo antagonista, nesse caso as espécies de *Bacillus* em questão, permaneçam estáveis, mesmo em diferentes condições ambientais.

A atividade de água e a temperatura do ambiente são os fatores que mais influenciam a sobrevivência dos microrganismos. A temperatura pode afetar a produção de compostos microbianos e a capacidade de ação deles. Uma vez sendo a atividade de água de um substrato de crescimento ótima para um microrganismo, a capacidade deste de tolerar outras mudanças ambientais é muito mais expressiva. Assim sendo, estas variáveis estão intimamente interligadas. Então, a água disponível em um substrato representa um pré-requisito para o estabelecimento do microrganismo requerido. As mudanças na atividade de água de substratos de crescimento claramente afetam a capacidade de desenvolvimento individual de rizobactérias antagonistas e sua capacidade de se relacionar e competir com outros microrganismos (Bluma e Etcheverry, 2006; Pitt e Hocking, 2009).

A variável competição também deve ser considerada como influenciadora primordial na possibilidade de respostas diferentes do biocontrole a campo em

relação às condições controladas de laboratório. Para a competição entre microrganismos do solo, considerando as possibilidades de interações biológicas existentes, é sugerido que as duas principais características relacionadas à ocorrência de grupos microbianos neste ambiente, sejam a adaptação e a capacidade competitiva do microrganismo em si (Hallam & McCutcheon, 2015).

Embora ainda tenha muito a ser elucidado, vários pesquisadores em todo o mundo estão continuamente em busca do desenvolvimento de produtos com formulação que facilite a utilização e sejam efetivos no controle de fitopatógenos a um espectro mais amplo de culturas. De acordo com Barea (2013), para o sucesso de uma inoculação de microrganismos em plantas, é necessário aumentar as bases científicas e tecnológicas da produção e aplicação do inóculo; gerar normativa específica para cada tipo de inoculante e sua aplicação, seja nas sementes, solo ou planta; estabelecer protocolos de controle de qualidade; minimizar a variabilidade dos resultados no campo; e aumentar a divulgação, explicando vantagens, limitações e benefícios para a sociedade.

## **2.5 *Bacillus***

Bactérias do gênero *Bacillus* geralmente são incluídas na família *Bacillaceae*, cujo habitat principal é o solo. Microrganismos desse gênero são extremamente variáveis quanto ao tamanho e formas que apresentam. Dentre as principais características do gênero estão a forma de bastonetes das células, aos pares ou em cadeias com extremidades arredondadas ou ângulos retos. Essas bactérias formam endósporos, o que confere maior resistência aos fatores adversos do ambiente. Isso possibilita o armazenamento desses microrganismos, como inoculantes, por um determinado período (Barros, 2004; Melo, 1998; Freitas e Pizzinatto, 1997).

Como afirma Lanna Filho (2010), em relação às vantagens presumidas pelo uso de *B. subtilis*, por exemplo, alguns bioformulados possuem característica de amplo espectro contra fitopatógenos, e como efeito adicional o de promotor de crescimento de plantas. É possível ainda que essas bactérias tenham capacidade de suprimir doenças causadas por microrganismos fitopatogênicos através da

produção de sideróforos, além da síntese de antibióticos e enzimas (Leelasuphakul *et al.*, 2008; Lugtenberg & Kamilova, 2009; Cardoso & Andreote, 2016).

Estirpes de *B. safensis* vem sendo estudadas por seu potencial como promotoras de crescimento em milho e outras culturas. Akinrinlola *et al.* (2018), selecionaram duas estirpes, R173 e R176, que demonstraram capacidade de alto espectro, promovendo o crescimento de milho, trigo e soja, apresentando atividades biosurfactantes, capacidade de produzir ácido indol acético e solubilizar fosfato. Breedt *et al.* (2017), testando isolados de rizobactérias, concluíram que alguns isolados, incluindo a estirpe *B. safensis* S7, aplicada como tratamento de sementes, aumentou a produtividade do milho no campo, tornando viável o desenvolvimento e a comercialização desses isolados.

Várias estirpes de *B. velezensis* foram pesquisadas por seu potencial com o biocontrole de fitopatógenos (Ruiz-García *et al.*, 2005; Palazzini *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2017). Grady *et al.* (2019) relataram que uma estirpe de *B. velezensis* 9D-6 exibe, em geral, alta inibição contra patógenos microbianos filogeneticamente diversos através de produção de antimicrobianos. Muitas estirpes atualmente classificadas como *B. amyloliquefaciens* podem ser na verdade *B. velezensis*. Fan *et al.* (2017) propuseram que o conjunto de *B. amyloliquefaciens* seja considerado uma unidade taxonômica acima do nível de espécie, designada como “grupo operacional *B. amyloliquefaciens*”. A esse grupo também pertencem as estirpes *B. velezensis* RP103 e RP242, avaliadas no presente estudo.

Bactérias antagonistas podem produzir compostos naturais com capacidade antifúngica. Das rizobactérias com maior potencial, destacam-se aquelas pertencentes ao gênero *Bacillus*, em função de sua grande capacidade de produção de compostos antimicrobianos, requerimentos nutricionais simples e alta capacidade competitiva e de sobrevivência. O que caracteriza o gênero *Bacillus* como excelente agente de biocontrole é sua capacidade de produzir diversos metabólitos com atividade antimicrobiana (Bais *et al.*, 2004; Monteiro *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006; Pérez-García *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). A espécie *B. subtilis*, por exemplo, age principalmente por antibiose e, ocasionalmente, por parasitismo e competição. Os microrganismos que agem desta forma têm, em sua maioria, espectro de ação bastante amplo, em que a inibição dos fungos pela produção de

substâncias tóxicas é mais efetiva do que outros mecanismos de ação (Kupper *et al.*, 2003; Lanna Filho, 2010).

Entre os compostos produzidos por *Bacillus*, estão os lipopeptídeos surfactinas, fengicinas e iturinas. As surfactinas apresentam capacidade antimicrobiana, sinalizam e induzem a defesa vegetal, auxiliam o crescimento bacteriano e a formação de biofilmes, característica importante do gênero *Bacillus*. As fengicinas apresentam capacidade antifúngica e agem como sinalizadoras na indução do metabolismo de defesa vegetal. As iturinas possuem atividade antifúngica e fomentam o crescimento bacteriano por suas propriedades surfactantes (Ongena *et al.*, 2007; Ongena & Jacques, 2008).

A atividade antifúngica dessas substâncias tóxicas produzidas por *Bacillus* é em grande parte por sua estrutura química que tem capacidade de ligar-se à membrana celular fúngica abrindo os canais iônicos causando um desequilíbrio eletroquímico entre os meios intra e extracelular podendo extravasar o conteúdo citoplasmático provocando a morte celular (Maget-Dana *et al.*, 1992; Maget-Dana *et al.*, 1994; Lang, 2002; Bonmatin *et al.*, 2003).

É importante salientar que, segundo estudos mais recentes, a produção de lipopeptídeos por células bacterianas associadas à raiz é qualitativa e quantitativamente ditada pelo contexto nutricional específico da rizosfera, considerando exsudatos ricos em ácidos orgânicos, limitação de oxigênio, e formação de biofilme em torno de pelos radiculares (Nihorimbere *et al.*, 2012). Mesmo que algumas estirpes de *B. subtilis* ou *B. amyloliquefaciens* possuam potencial genético de produzir uma vasta gama de antibióticos (Stein, 2005; Chen *et al.*, 2009), conforme Nihorimbere *et al.* (2012) apenas uma parte limitada desse fundo genético pode ser expresso prontamente na rizosfera.

Estudo realizado por Torres *et al.* (2016) revela que duas espécies diferentes de *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens* PGPBacCA1 e *B. subtilis* subsp. *subtilis* PGPMori7, têm a capacidade de inibir *Macrophomina phaseolina* através de pelo menos dois mecanismos diferentes: síntese de lipopeptídeos, como surfactina, iturinas e fengicinas, além da competição entre microrganismos.

Os compostos orgânicos voláteis microbianos são uma variedade de moléculas provenientes de diferentes caminhos metabólicos durante o crescimento

de fungos e bactérias, e sua produção pode representar uma via importante pela qual o carbono é liberado para a atmosfera (Chaves-Lopez *et al.*, 2015). Pesquisas demonstram que *B. subtilis* pode produzir substâncias voláteis com atividade antifúngica (Owens *et al.*, 1997), no entanto, muitas dessas substâncias permanecem desconhecidas (Kai *et al.*, 2007).

Avaliando o efeito de *B. amyloliquefaciens* Y1 sobre *F. graminearum*, Jamal *et al.* (2017) concluíram que a estirpe pode produzir um composto antifúngico, o ciclo (DE-Pro-L-Val), extraído do extrato bruto de butanol. Gotor-Vila *et al.* (2017) verificaram efeitos antifúngicos dos compostos orgânicos voláteis 1,3 pentadieno, acetoina e tiofeno, produzidos por *B. amyloliquefaciens* CPA-8, contra patógenos de pós-colheita *Monilinia laxa*, *M. fructicola* e *Botrytis cinerea*. Os resultados obtidos por Yuan *et al.* (2012) demonstram que dos compostos voláteis produzidos pela estirpe *B. amyloliquefaciens* NJN-6 s, 12 benzenos, sete alquils, três álcoois, sete cetonas, dois aldeídos, três naftils, um éster e um composto éter, apresentaram atividade antifúngica contra *F. oxysporum*. O efeito antifúngico de compostos como 2-etil-hexanol, 2,4-bis (2-metilpropil) fenol, 4-hidroxibenzaldeído e 2-nonanona, foi também demonstrada em diversos patossistemas (Wang *et al.*, 2004; Almenar *et al.*, 2007).

## 2.6 Promoção de crescimento vegetal

As interações benéficas entre plantas e microrganismos, segundo Drogue *et al.* (2012) podem ser categorizadas em dois tipos. O primeiro tipo envolve as interações mutualísticas, que ocorre de forma íntima e geralmente obrigatória entre microrganismos e uma gama restrita de plantas hospedeiras. Nesse caso, geralmente é formada uma estrutura especialmente dedicada à interação, como por exemplo os nódulos produzidos durante a simbiose entre rhizobium e plantas da família Fabaceae e os arbúsculos na simbiose endomicorrízica (Vacheron *et al.*, 2013).

Outro tipo de interação benéfica entre plantas e microrganismos são as cooperações, ou simbioses associativas, que são menos específicas e obrigatórias (Drogue *et al.*, 2012). Elas envolvem, por exemplo, rizobactérias que colonizam a superfície do sistema radicular ou, de forma endofítica, colonizam os tecidos

internos das raízes, estimulando o crescimento e a sanidade da planta. A esse grupo pertencem as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP's) (Vacheron *et al.*, 2013).

As Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), em associação com as raízes, podem potencializar o crescimento vegetal, direta ou indiretamente. A complexidade de sua atuação nesse ambiente diverso, concede às rizobactérias a capacidade de apresentarem um conjunto de interferências positivas ao crescimento das plantas (Galdiano Junior, 2009; Vieira Júnior *et al.*, 2013).

Em geral, dentre as espécies de bactérias endofíticas comumente presentes em milho, como dos gêneros *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Flavobacterium*, inclui-se também espécies do gênero *Bacillus*. Os microrganismos endofíticos, segundo Johnston-Monje & Raizada (2011), vivem pelo menos uma parte do ciclo de vida dentro dos tecidos das plantas, podendo interferir diretamente na produtividade e no crescimento dessas. Uma vez dentro da planta, podem alterar seu metabolismo e se adaptarem ao ambiente interno (Gomes *et al.*, 2016).

Uma compilação de características específicas de bactérias promotoras de crescimento em plantas, obtida no trabalho de Islam *et al.* (2009), sugere que estes organismos particulares podem promover o crescimento das plantas por mais de um mecanismo e essas características podem ser mais bem aproveitadas se for selecionado um grupo mais diversificado de microrganismos de vida livre para uso em promoção de crescimento de plantas.

Dentre os mecanismos, as RPCP's podem modular o crescimento das plantas e desenvolvimento das raízes através da produção de fitormônios, metabólitos secundários e enzimas, ou influenciando a nutrição das plantas pela fixação do nitrogênio e solubilização de fósforo, através da produção de sideróforos, ou ainda, modificando a fisiologia das raízes mudando a transcrição genética e biossíntese de metabólitos nas células da planta (Vacheron *et al.*, 2013).

O ambiente rizosférico é muito complexo e assim, devido à variedade de características envolvidas, soma um conjunto de interações muito variável. Assim, as respostas à aplicação de microrganismos podem variar de acordo com o local e

época, a macro e microflora presente, condições climáticas, a tecnologia aplicada, espécies de plantas presentes, a fase de crescimento da cultura, os manejos adotados anteriormente, bem como a interação de todos esses fatores (Gomes *et al.*, 2016, Haghghi *et al.*, 2011).

### **2.6.1 Mecanismos de promoção de crescimento**

#### **Produção de fitohormônios**

Os fitohormônios são moléculas de sinalização que coordenam as atividades celulares e controlam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. As interações bacterianas endofíticas com plantas resultam na produção e modulação de hormônios vegetais (Glick, 2012, Singh *et al.*, 2017). As cinco classes clássicas de fitohormônio são auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno. Os fitohormônios relatados mais recentemente incluem estrigolactonas, brassinoesteróides, jasmonato, ácido salicílico, poliaminas e óxido nítrico (Glick, 2012; Spaepen, 2015; Khan *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2017).

Os compostos do grupo das auxinas, como o ácido indol-acético (AIA), por exemplo, estimulam o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas (Taiz e Zeiger, 2013). Esse efeito depende, no entanto, da concentração do hormônio (Marchioro, 2005). Segundo Woodward e Bartel (2005), o AIA pode ser produzido por bactérias a partir dos exsudatos radiculares.

As giberelinas, que promovem a hidrólise do amido também podem beneficiar o processo de germinação das sementes. Outros hormônios vegetais chave na germinação de sementes são as citocininas e o etileno que também estão envolvidos nos processos fisiológicos como floração, alongamento do caule e envelhecimento das folhas (Yaxley *et al.*, 2001; Davies, 2010; Taiz e Zeiger, 2013; Basu *et al.*, 2017).

O ácido abscísico (ABA), assim como o etileno são fitohormônios envolvidos na resposta das plantas a estresses bióticos e abióticos (Gomes *et al.*, 2016). O ABA protege as plantas contra desidratação facilitando a circulação de água e controlando a perda de águas pelos estômatos. O etileno promove senescência e amadurecimento de frutos e está envolvido na resposta ao ataque de patógenos,

atuando em sinergia com o ácido jasmônico (Davies, 2010; Pieterse *et al.*, 2012, Gomes *et al.*, 2016).

As estrigolactonas, descritos como compostos químicos com múltiplos papéis na natureza (Davies, 2010). Esses compostos são derivados de carotenoides e atuam na arquitetura da planta como um todo, podendo regular tanto parte aérea quanto radicular. Além disso, podem sinalizar por via endógena e exógena em resposta a vários estímulos ambientais, como luminosidade, nutrientes e temperatura (Pandey *et al.*, 2016).

### **Absorção de nutrientes**

O melhor aproveitamento da fertilidade do solo é uma das estratégias comumente usadas para aumentar a produção agrícola, e as RPCP participam da fertilização do solo através do processo de fixação e solubilização de nutrientes (Noumavo *et al.*, 2016). A fixação biológica de nitrogênio é limitada a procariontes que possuem um complexo enzimático que catalisa a redução de nitrogênio atmosférico em amônia ( $N_2 + 4H_2 \rightarrow 2NH_3 + H_2$ ) (Weyens *et al.*, 2010).

A adubação com fertilizantes químicos representa uma parcela muito grande dos custos dos diversos sistemas de produção agrícola podendo também representar impactos negativos ao meio ambiente. Além disso, a agricultura é, atualmente, extremamente dependente de fertilizantes, especialmente nitrogenados e fosfatados. Portanto, microrganismos são alternativas promissoras para aumentar a disponibilidade de nutrientes no solo e possivelmente substituir a utilização de fertilizantes químicos (Gomes *et al.*, 2016).

### **Solubilização de fosfato**

Microrganismos podem afetar a disponibilidade de fósforo (P), como fosfato, nas raízes das plantas. Embora os solos contenham geralmente uma grande quantidade de P total, apenas uma pequena porção está prontamente disponível para absorção pelas plantas, que são capazes de absorver por conta própria o fosfato mono e dibásico. Já formas orgânicas ou inorgânicas insolúveis de fosfato precisam ser mineralizadas ou solubilizadas por microrganismos (Oliveira *et al.*, 2009; Baig *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2013; Vacheron *et al.*, 2013).

Assim, conforme afirmam Costa *et al.* (2016), a capacidade de solubilizar P inorgânico e mineralizar P orgânico, deixando-o disponível para as plantas, é uma característica dos microrganismos que pode servir como uma boa estratégia para melhor aproveitar esse nutriente presente no solo. Estudos demonstram que diferentes genótipos interferem na comunidade microbiana da rizosfera em função da diferença na sinalização emitida pelas raízes através exsudatos, e isso se dá especialmente quando as plantas ou genótipos se encontram em situação de estresse mineral (Barea *et al.*, 2005; Marschner *et al.*, 2006).

Em trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2009) conclui-se que a estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes no uso de fósforo é mais influenciada pelo teor de P no solo do que pelo genótipo, e em plantas de milho cultivadas em solo com baixo suprimento de P ocorre maior diversidade funcional de bactérias do que em solo sem deficiência desse elemento. Os tratamentos bacterianos aplicados no estudo de Breedts *et al.* (2017) também mostram uma tendência clara para aumentar o rendimento da cultura em região mais pobre em nutrientes, enquanto os aumentos de rendimento foram menos pronunciados ou mesmo reduzidos em regiões mais férteis.

### **Produção de sideróforos**

A capacidade de produção de sideróforos, que são moléculas de baixo peso molecular com afinidade por  $Fe^3$  e receptores de membrana capazes de se ligar aos complexos sideróforos de Fe, pode facilitar a absorção de ferro pelas plantas (Hider & Kong, 2010). E ainda, microrganismos rizosféricos produzindo exopolissacarídeos (EPS) na superfície das raízes também contribuem, dentre outras vantagens, a manter o filme de água necessário para a atividade fotossintética e o crescimento das plantas (Noumavo *et al.*, 2016).

### **Antibiose**

Outro mecanismo pelo qual as rizobactérias podem promover o crescimento de plantas é através do controle de fitopatógenos, que podem envolver, como já foi mencionado anteriormente, mecanismos como produção de produtos

antimicrobianos, enzimas líticas, compostos voláteis e competição por espaço e nutrientes.

A produção de enzimas líticas por bactérias, como a quitinase, interfere na lise da parede das células dos fungos, como descrito por Li *et al.* (2009) para o fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Outros estudos envolvendo enzimas líticas aportam para a produção de  $\beta$ -glucanase por *B. subtilis* ZJF (Fleuri & Sato, 2008), quitinase a partir de *Bacillus circulans* 41 (Wiwat *et al.*, 1999). Em estudo com arroz, Filippi *et al.* (2011), testando isolados de rizobactérias, observaram que 18 isolados tiveram potencial de suprimir a brusone, e os isolados Rizo-46 e Rizo-55, a reduziram em 90 e 95%, respectivamente, ao desencadearem a resistência sistêmica induzida, ocasionada pelo aumento da atividade enzimática de proteínas relacionadas à patogênese, tais como peroxidase,  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase.

Na interação de competição, os organismos competem principalmente por nutrientes, sendo comum isto ocorrer entre os microrganismos e/ou entre plantas (Cardoso & Andreote, 2016). Bactérias antagonistas são competidoras extremamente eficientes contra fungos devido a sua habilidade e rapidez de crescimento durante o processo competitivo (Bluma & Etcheverry, 2006). Rizobactérias possuem capacidade de suprimir fitopatógenos envolvendo mecanismo de competição por espaço e nutrientes com fungos e outros microrganismos prejudiciais às plantas (Peixoto, 1997; Robin *et al.*, 2008).

### **Indução de resistência sistêmica**

A indução de resistência é o processo pelo qual o tratamento de plantas com bactérias promotoras de crescimento, tais como *Bacillus*, provoca defesa do hospedeiro reduzindo a severidade ou incidência de doenças causadas por agentes patogênicos (Kloepper *et al.*, 2004). O gênero *Bacillus* tem sido avaliado quanto à sua atividade como indutor de resistência em plantas a patógenos através da ativação do metabolismo secundário nas plantas. Resultados de indução de resistência foram obtidos em tomateiro com *B. cereus* contra o fungo *Corynespora cassiicola* (Romeiro *et al.*, 2010), com *B. subtilis* sobre doenças foliares do tomateiro (Araujo & Menezes, 2009), com *B. cereus* contra *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro (Kuhn & Pascholati, 2010). Várias outras estirpes das espécies *B.*

*amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides* e *B. sphaericus* já foram relatadas como indutoras, provocando reduções significativas na incidência ou severidade de várias doenças em uma diversidade de hospedeiros (Ongena *et al.*, 2007; Choudhary & Johri, 2009; Lanna Filho, 2010).

Quanto às rotas em si, as principais rotas de sinalização estimuladas no sistema de defesa da planta, induzida por rizobactérias, segundo a grande maioria de informações na literatura, compreendem o ácido jasmônico e o etileno. A colonização da raiz por rizobactérias inicia uma cascata de sinalização, que envolve ácido jasmônico e etileno e como consequência são ativadas medidas de proteção imediatamente iniciadas pela indução de resistência sistêmica (ISR) e outras que são iniciadas somente após a infecção pelo patógeno (Glick, 2012; Taiz & Zeiger, 2013; Medeiros *et al.*, 2014). Nos últimos anos, pesquisadores elucidaram ainda que, além da ISR, algumas rizobactérias são capazes de ativar a via da resistência sistêmica adquirida (SAR) simultaneamente, a qual é dependente do ácido salicílico (Niu *et al.*, 2011; Yoshioka *et al.*, 2012; Medeiros *et al.*, 2014; Pieterse *et al.*, 2014).

As rizobactérias podem induzir em outras partes da planta, a produção de lignina, compostos fenólicos, hormônios, proteínas relacionadas à patogenicidade (PRPs) e enzimas (Medeiros *et al.*, 2014), como a peroxidase fenilalanina amônia liase, lipoxigenase (Silva *et al.*, 2004), por exemplo, que são produtos do metabolismo secundário advindos da rota do ácido chiquímico (Taiz & Zeiger, 2013), e têm como precursora a fenilalanina amônia liase, que permeia um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário.

## 2.7 Referências

ABIMILHO - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MILHO. **Estatísticas sobre o milho**. Apucarana: ABIMILHO, 2019. Disponível em: <http://https://www.abimilho.com.br/estatisticas>. Acesso em: 02 jun. 2019.

ABRAMILHO - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MILHO. **A dimensão do milho no mundo**. Apucarana: ABIMILHO, 2010. Disponível em: <http://www.abramilho.org.br/noticias.php?cod=975>. Acesso em: 02 jun. 2016.

ADEGOKE, G. O.; LETUMA, P. Strategies for the prevention and reduction of mycotoxins in developing countries. *In*: MAKUN, H. **Mycotoxin and food safety in developing countries**. Croatia: InTech, 2013. p. 123-136.

AKINRINLOLA, R. J. *et al.* Evaluation of *Bacillus* strains for plant growth promotion and predictability of efficacy by *in vitro* physiological traits. **International Journal of Microbiology**, London, v. 56, n. 1, p. 1-11, 2018.

ALMENAR, E. *et al.* Active package for wild strawberry fruit (*Fragaria vesca* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, München, v. 55, n. 6, p. 2240-2245, 2007.

ALVES, E. N. T. D. *et al.* **Alternativas de controle para redução de grãos ardidos na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012. 6 p.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 138, de 8 de fevereiro de 2017. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 29, 9 fev. 2017.

ARAÚJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.

BAIG, K. *et al.* Comparative effectiveness of *Bacillus* spp. possessing either dual or single growth-promoting traits for improving phosphorus uptake, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Annals of Microbiology**, Milan, v. 62, n. 3, p. 1109-1119, 2012.

BAIS, H. P.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, n. 1, p. 307-319, 2004.

BARBOSA, C. A. **Manual da cultura do milho**. Viçosa, MG: AgroJuris, 2010. 199 p.

BAREA, J. M. *et al.* Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 56, n. 417, p. 1761-1778, 2005.

BARRA, V. R. *et al.* Antagonismo direto e biocontrole da podridão-mole-do-tomateiro pelo uso de procariontas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 3, p. 327-330, 2009.

BARROS, V. R. M. **Estudo de fatores de patogenicidade de *Bacillus* spp. Isolado em leite UHT**. 2004. 116 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BASU, S.; RABARA, R.; NEGI, S. Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: plant growth promoting bacteria. **Plant Gene**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 43-49, 2017.

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia**: de indivíduos a ecossistemas. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 753 p.

BLUMA, R. V.; ETCHEVERRY, M. G. Influence of *Bacillus* spp. isolated from maize agroecosystem on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus* section *Flavi*. **Pest Management Science**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 242-251, 2006.

BONMATIN, J. M.; LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. **Combinatorial Chemical and High Throughput Screen**, Lawrence, v. 6, n. 6, p. 541-556, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Milho**. Brasília, DF: MAPA, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>. Acesso em: 02 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do agronegócio: Brasil 2018/2019 a 2028/2029**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2019. 126 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-2018-2019-2028-2029/view>. Acesso em: 02 jul. 2019.

BREEDT, G.; LABUSCHAGNE, N.; COUTINHO, T. A. Seed treatment with selected plant growth-promoting rhizobacteria increases maize yield in the field. **Annals of Applied Biology**, London, v. 171, n. 2, p. 229-236, 2017.

BRITO, A. H. *et al.* Controle químico de doenças foliares e grãos ardidos em milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 11, p. 49-59, 2012.

CAMARGOS, S. M. *et al.* Accumulation of fumonisins B1 and B2 in freshly harvested Brazilian commercial maize at three locations during two nonconsecutive seasons. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 155, n. 4, p. 219-228, 2002.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. 221 p.

CARVALHO, N. L. Resistência genética induzida em plantas cultivadas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 7, n. 7, p. 1379-1390, 2012.

CHANDA, A. *et al.* A key role for vesicles in fungal secondary metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Champaign, v. 106, n. 46, p. 19533-19538, 2009.

CHAVES-LOPEZ, C. *et al.* Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 119, n. 2, p. 487-499, 2015.

CHEN, X. *et al.* Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 140, n. 1/2, p. 27-37, 2009.

CHOUDHARY, D. K.; JOHRI, B. N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological Research**, Jena, v. 164, n. 5, p. 493-513, 2009.

CHULZE, S. N. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 27, n. 5, p. 651–657, 2010.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Safra 2018/19: décimo levantamento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos**, Brasília, DF, v. 6, n. 11, 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos?limitstart=0>. Acesso em: 08 jul. 2019.

COTTY, P. J.; MELLON, J. E. Ecology of aflatoxin producing fungi and biocontrol of aflatoxin contamination. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 22, p. 110–117, 2006.

CRUZ, J. C. *et al.* **Cultivo do milho**. 6. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 10 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção, 2). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27037/1/Plantio.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2018.

DAVIES, P. J. (ed.). **Plant hormones**. Dordrecht: Springer, 2010. 765 p.

DIENER, U. L. *et al.* Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, n. 1, p. 249-270, 1987.

DROGUE, B. *et al.* Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? **Research in Microbiology**, Paris, v. 163, n. 8, p. 500-510, 2012.

EINLOFT, T. C. **Biocontrole de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* por *Bacillus* spp. isolados de plantas de milho.** 2016. 137 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

FAKRUDDIN, M. *et al.* Characterization of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* from food and feed samples. **Springer Plus**, [Switzerland], v. 4, n. 1, p. 159-165, 2015.

FAN, B *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, [art.] 22, [p. 1-15], 2017.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho.** 2. ed. Guaíba: Agropecuária, 2004. 360 p.

FILIPPI, M. C. C. *et al.* Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, Orlando, v. 58, n. 2, p. 160-166, 2011.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Study of different parameters in the production of lytic enzymes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 299-310, 2008.

FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 23, p. 36-41, 1997.

GALDIANO JUNIOR, R. F. Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas. 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/gmp/m/3614.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2018.

GAO, Z. *et al.* Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, Orlando, v. 105, n. 1, p. 27-39, 2017.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, London, v. 2012, [art.] 963401, [p. 1-15], 2012.

GOMES, E. A. *et al.* **Microrganismos promotores do crescimento de plantas.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2016. 51 p. (Documentos, 208).

GOTOR-VILA, A. *et al.* Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. **Food Microbiology**, London, v. 64, n. 1, p. 219-225, 2017.

GRADY, E. N. *et al.* Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. **BMC Microbiology**, London, v. 19, n. 5, p. 1-14, 2019.

HAGHIGHI, B. J.; ALIZADEH, O.; FIROOZABADI, A. H. The role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in sustainable agriculture. **Advances in Environmental Biology**, London, v. 5, n. 10, p. 3079-3083, 2011.

HALLAM, S. J.; MCCUTCHEON, J. P. Microbes don't play solitaire: how cooperation trumps isolation in the microbial world. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 7, n. 1, p. 26-28, 2015.

HAWKINS, L. K.; WINDHAM, G. L.; WILLIAMS, W. P. Occurrence of aflatoxin in three maize (*Zea mays* L.) hybrids over 5 years in Northern Mississippi. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 165, n. 3, p. 165-171, 2008.

HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. **Natural Product Reports**, London, v. 27, n. 5, p. 637-657, 2010.

ISLAM, M. R. *et al.* Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 19, n. 10, p. 1213-1222, 2009.

ISMAIEL, A. A.; PAPENBROCK, J. Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. **Agriculture**, Basel v. 5, n. 3, p. 492-537, 2015.

JAMAL, Q. *et al.* Purification and antifungal characterization of cyclo(D-Pro-L-Val) from *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 against *Fusarium graminearum* to control head blight in wheat. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 141-147, 2017.

JANISIEWICZ, W. J.; CONWAY, W. S. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest. **Stewart Postharvest Review**, London, v. 6, n. 1, p. 2-16, 2010.

JOHNSTON-MONJE, D.; RAIZADA, M. N. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, [art]. 20396, 2011.

KAI, M. *et al.* Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 187, n. 5, p. 351-360, 2007.

KHAN, H. *et al.* Antioxidant and antiplasmodial activities of bergenin and 11-O-galloylbergenin isolated from *Mallotus philippensis*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, London, v. 2016, n. 1, p. 1-6, 2016.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C.M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 11, p. 1259-1266, 2004.

KÖPPEN, R. *et al.* Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 86, n. 6, p. 1595-1612, 2010.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 107-114, 2010.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

LANG, S. Biological amphiphiles microbial biosurfactants. **Current Opinion in Colloid e Interface Science**, New York, v. 7, n. 1/2, p. 12-20, 2002.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Post-harvest Biology and Technology**, Leuven, v. 48, n. 1, p. 113-121, 2008.

LERAYER, A. *et al.* **Guia do milho**: tecnologia do campo à mesa. [S. l.]: Conselho de informações sobre biotecnologia, 2006. 16 p. Disponível em [http://www.cib.org.br/pdf/guia\\_do\\_milho\\_CIB.pdf](http://www.cib.org.br/pdf/guia_do_milho_CIB.pdf). Acesso em: 24 jun. 2016.

LI, J. *et al.* Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. **Journal of Zhejiang University Science**, Zhejiang, v. 10, n. 4, p. 264-272, 2009.

LIMA, A. **Quantificação de fungos e de grãos avariados em milho no estado de Santa Catarina**. 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2017.

LUGTENBERG, B. J. J.; CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, Louvain, v. 81, n. 1/4, p. 373-383, 2002.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da produção de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 76). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/490408/1/Circ76.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2016.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 20, n. 119, p. 131-139, 2007.

MAGET-DANA, R. *et al.* Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of Iturin A. **Biochimie**, Paris, v. 74, n. 12, p. 1047-1051, 1992.

MAGET-DANA, R.; PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological physiochemical properties. **Toxicology**, Limerick, v. 87, n. 3, p. 151-174, 1994.

MARCHIORO, L. E. T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z.; RENGEL, Z. Rhizosphere properties of Poaceae genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 283, n. 1/2, p. 11-24, 2006.

MEDEIROS, F. H. V. *et al.* Biological control of mycotoxin-producing molds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 5, p. 483-497, 2012.

MEDEIROS, F. H. V. *et al.* Ganho de função em plantas mediadas por bactérias e fungos. *In*: SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. *et al.* (ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Maringá: UEM/MPA, 2014. p. 233-253.

MELO, I. S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. *In*: MELO, I.S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 86-116.

MIRANDA, R. A.; DUARTE, J. O.; GARCIA, J. C. Cultivo do milho: economia da produção. *In*: CRUZ, J. C. **Sistemas de produção**. 8. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012. Disponível em: [http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_8\\_ed/economia.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/economia.htm). Acesso em: 06 jun. 2016.

- MONGE, M. P.; MAGNOLI, C. E.; CHIACCHIERA, S. M. Survey of *Aspergillus* and *Fusarium* species and their mycotoxins in raw materials and poultry feeds from Córdoba, Argentina. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 28, n. 2, p. 111-122, 2012.
- MONTEIRO, L.; MARIANOLL, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 1, p. 23-29, 2005.
- MUNHOZ, A. T. *et al.* Relação entre resistência de linhagens tropicais de milho à podridão de espiga e ao acúmulo de fumonisinas provocados por *Fusarium verticillioides*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 2, p.144-148, 2015.
- MUNKVOLD, G. P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 705-713, 2003.
- NAYAKA, S. C. *et al.* Control of *Fusarium verticillioides*, cause of ear rot of maize, by *Pseudomonas fluorescens*. **Pest Management Science**, Oxford, v. 65, n. 7, p. 769-775, 2009.
- NIHORIMBERE, V. *et al.* M. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. **Microbial Ecology**, Rockville, v. 79, n. 1, p. 176-191. 2012
- NIU, D. D. *et al.* The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *A. thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 24, n. 5, p. 533-542, 2011.
- NOUMAVO, P. A. *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria: beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 15, n. 27, p. 1452-1463, 2016.
- OLIVEIRA, C. A. *et al.* Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 41, p. 249-258, 2009.
- ONGENA, M. *et al.* Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 1084-1090, 2007.
- ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

- OWENS, J. D. *et al.* Formation of volatile compounds during *Bacillus subtilis* fermentation of soya beans. **Journal of Science Food and Agriculture**, London, v. 74, p. 132-140, 1997.
- PALAZZINI, J. M. *et al.* *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. **Microbiological Research**, Jena, v. 192, n. 1, p. 30-36, 2016.
- PEIXOTO, A. R. Controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro, por *Pseudomonas* spp. fluorescentes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 153-160, 1997.
- PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. **Current Opinions in Biotechnology**, Dublin, v. 22, n. 2, p. 187-193, 2011.
- PIETERSE, C. M. J. *et al.* Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 28, p. 489-521, 2012.
- PIETERSE, C. M. J. *et al.* Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 52, n. 16, p. 16-29, 2014.
- RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, London, v. 8, n. 3, p. 202-251, 2009.
- REDDY, K. R. N.; SALLEH, B. Co-occurrence of moulds and mycotoxins in corn grains used for animal feeds in Malaysia. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 10, n. 5, p. 668-673, 2011.
- ROBIN, A. *et al.* Iron dynamics in the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition. **Advances in Agronomy**, London, v. 99, n. 1, p. 183-225, 2008.
- ROMEIRO, R. S. *et al.* Evidence that the biocontrol agent *Bacillus cereus* synthesizes protein that can elicit increased resistance of tomato leaves to *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 35, n. 1, p. 11-15, 2010.
- ROSA, A. P. S. A.; EMYGDYO, B. M.; BISPO, N. B. (ed.). **62ª Reunião técnica anual da pesquisa do milho. 45ª Reunião técnica anual da pesquisa do sorgo: indicações técnicas para o cultivo de milho e sorgo no Rio Grande do Sul safras 2017/2018 e 2018/2019**. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 209 p.
- RUIZ-GARCÍA, C. *et al.* *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. **International**

**Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 55, n. 1, p. 191-195, 2005.

SANGOI, L. *et al.* Níveis de manejo na cultura do milho em dois ambientes contrastantes: análise técnico-econômica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 1021-1029, 2003.

SANTOS, E. R. *et al.* Biocontrol of bacterial fruit blotch of melon by bioactive compounds produced by *Bacillus* spp. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 376-378, 2006.

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. **Biological Control**, Orlando, v. 50, n. 3, p. 205-221, 2009.

SHARMA, S. B. *et al.* Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer Plus**, [Switzerland], v. 2, n. 587, p. 1-14, 2013.

SILVA, D. D.; COTA, L. V. COSTA, R. V. Doenças. *In*: PEREIRA FILHO, I. A. **Cultivo do milho**. 9. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção, 1). p. 222-273 Disponível em: <file:///C:/Users/user/Downloads/Sistema-de-Producao-Cultivo-do-Milho.pdf>. Acesso em: 04/08/2024.

SILVA, H. S. A. *et al.* Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: on-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, Orlando, v. 29, n. 2, p. 288-295, 2004.

SINGH, M. *et al.* Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 7, [art.] 315, [p. 1-14], 2017.

SPADARO, D.; GULLINO, M. L. State of the art and future prospects of biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p. 185-194, 2004.

SPAEPEN, S. Plant hormones produced by microbes. *In*: LUGTENBERG, B. (ed.). **Principles of plant-microbe interactions**. Cham: Springer International, 2015. p. 247-256.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific functions. **Molecular Microbiology**, Ithaca, v. 56, n. 4, p. 845-847, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Hormônios vegetais e sinais. *In*: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 541-596.

TORRES, M. J. *et al.* Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal

changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds.

**Microbiological Research**, Jena, v. 182, n. 1, p. 31-39, 2016.

TRENTO, S. M. *et al.* Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 4, p. 609-613, 2002.

USDA - U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World agricultural production**. Washington, DC: USDA, 2019. 36 p. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2019.

VACHERON, J. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, [art.] 356, [p. 1-19], 2013.

VIEIRA JÚNIOR, J. R. *et al.* **Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2013. 15 p. (Documentos, 155).

WAGACHA, J. M.; MUTHOMI, J. W. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 1-12, 2008.

WANG, J. *et al.* Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 98-102, 2004.

WEYENS, N. *et al.* Potential of *Pseudomonas putida* W619-TCE to reduce TCE phytotoxicity and evapotranspiration in poplar cuttings. **Environmental Pollution**, London, v. 158, n. 1, p. 2915-2919, 2010.

WIWAT, C.; SIWAYAPRAHM, P.; BHUMIRATANA, A. Purification and Characterization of Chitinase from *Bacillus circulans*. **Current Microbiology**, New York, v. 39, n. 3, p. 134-140, 1999.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, n. 5, p.707-735, 2005.

YAXLEY, J. R. *et al.* Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. **Plant Physiology**, Rockville, v. 25, n. 2, p. 627-633, 2001.

YOSHIOKA, Y. *et al.* Systemic resistance induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1, a microbial pesticide of seedborne diseases of rice. **Pest Management Science**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 60-66, 2012.

YUAN, J. *et al.* Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 78, n. 16, p. 5942-5944, 2012.

### **3 Capítulo 1**

**Efeito de *Bacillus* sp. sobre a qualidade de sementes e grãos de milho**

## RESUMO

A qualidade de sementes é definida como um conjunto de características que determinam seu valor para semeadura. A semente infectada e/ou infestada, além de ser fonte de inóculo primário de fitopatógenos, pode provocar podridões pré e após a semeadura. Os grãos, por sua vez, têm sua qualidade classificada conforme a quantidade de defeitos, que podem ser influenciados por diversos fatores, incluindo a incidência de fungos. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da bacterização com isolados de *Bacillus* sp. sobre a qualidade de sementes de milho, assim como o efeito da bacterização e inoculação do solo com *Bacillus* sp. sobre a qualidade de grãos de milho com e sem a presença de tratamento de sementes convencional, com fungicida e inseticida. Foram realizados quatro experimentos, os três primeiros conduzidos em laboratório, em delineamento inteiramente casualizado em esquema bifatorial, testando Variedades de Milho com Isolados bacterianos (*B. safensis* RF69; *B. velezensis* RP103; *B. velezensis* RP242). Foram realizados testes de germinação, comprimento de plântula, matéria seca de plântulas e sanidade de sementes. Constatou-se que há efeito positivo da bacterização com isolados de *Bacillus* sp. sobre a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho, sendo este resultado dependente das variedades e híbridos testados. O quarto e último experimento foi conduzido a campo, em delineamento de blocos casualizados e esquema trifatorial testando Tratamento de Sementes Convencional, Isolados Bacterianos e Forma de Aplicação dos isolados bacterianos sobre a qualidade de grãos de milho do híbrido BG 7049. Observou-se que todos os isolados e o mix apresentaram potencial de controle de fungos toxigênicos como *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* spp., podendo ser selecionados para formular inoculante para sementes de milho. Os isolados RP103 e RP242 apresentaram maior potencial para as cultivares testadas. Concluiu-se que o tratamento de sementes convencional, com inseticida e fungicida no recobrimento de sementes, foi um fator determinante para a produção de grãos de milho de qualidade. Os isolados de *Bacillus* sp. contribuíram na produção de grãos de milho de maior qualidade reduzindo a porcentagem de grãos mofados e ardidos, e podem ser uma opção de manejo sem tratamento de sementes convencional.

### 3.1 Introdução

A interação dos atributos de natureza genética, física, fisiológica e a sanidade são o conjunto de características que definem a qualidade de sementes e determinam seu valor para semeadura (Marcos-Filho, 2005). Sementes infectadas e/ou infestadas constituem importante fonte de inóculo primário e representam uma das vias mais eficientes de transporte de fitopatógenos a longas distâncias (Romeiro, 2005; Vieira *et al.*, 2013), apresentando, portanto, potencial de transmissão da semente para a planta. Uma expressiva quantidade de fungos, incluindo *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, pode atacar sementes, podendo levar à podridão de sementes ou aumentar a podridão após a semeadura (Michereff *et al.*, 2005).

Os grãos de milho destinados à comercialização interna são classificados em grupos, classes e tipos, respectivamente de acordo com a sua consistência, coloração e qualidade. Pela classificação oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), conforme a IN N° 60/2011, as características qualitativas são avaliadas em um lote de milho para sua tipificação, conforme a percentagem de defeitos como grãos ardidos, fermentados, mofados, germinados, gessados, carunchados, chochos ou imaturos, além da percentagem de grãos quebrados, além de matérias estranhas e impurezas (Brasil, 2011).

Dentre os fatores que contribuem para a perda de qualidade e quantidade dos grãos destacam-se: características da espécie e da variedade, condições ambientais durante o seu desenvolvimento, incidência de pragas e doenças, época e procedimento de colheita, método de secagem e práticas de armazenagem. Após a colheita, os fatores mais importantes que influenciam os grãos são a temperatura e a umidade, elementos chaves para a ocorrência de pragas, contaminação fúngica e sua consequente produção de micotoxinas. Os impactos das doenças fúngicas são claramente manifestados nas culturas e há consequências econômicas mensuráveis e diretas associadas a perdas em decorrência de epidemias e de infecção por fungos e oomicetos em plantas cultivadas (Fisher *et al.*, 2012).

Diversas ações compreendem o manejo de doenças fúngicas na cultura do milho em geral. Recomenda-se a utilização de cultivares resistentes, rotação de cultura, redução da densidade de plantas, adubação equilibrada, escolha da época

de semeadura e de colheita, tratamento de sementes, e controle de doenças foliares do milho por meio da aplicação de fungicidas (Sangoi, 2003; Barbosa, 2010; Brito *et al.*, 2012). Das estratégias de manejo de doenças, a resistência genética é ainda uma das mais eficientes, no entanto, não é recomendada sua utilização como única forma de manejo, pois está limitada somente a alguns patógenos (Fancelli & Dourado Neto, 2004). A ocorrência de clima favorável juntamente com os sistemas de plantios e cultivos empregados, ignorando a utilização conjunta de estratégias de manejo e nível tecnológico incorreto contribuíram para a multiplicação e preservação de inóculos de diversos patógenos, deixando a cultura do milho, exposta a condições edafoclimáticas favoráveis a incidência de doenças (Lima, 2017).

Alternativas como o controle biológico de fungos têm sido consideravelmente estudadas. Bactérias provenientes do ambiente rizosférico possuem vantagens competitivas em relação aos fungos fitopatogênicos. Esses microrganismos são extremamente adaptados ao ambiente, conseguem sobreviver com poucas fontes de nutrientes, em diversas condições de estresse ambiental e possuem crescimento rápido. Além disso, aumentam o crescimento das plantas, acelerando a germinação das sementes e melhorando o desenvolvimento radicular (Souza *et al.*, 2015). O desenvolvimento de formulações estáveis de bactérias promotoras de crescimento e antagonistas em sistemas agrícolas sustentáveis, tem sido estabelecida como outra abordagem promissora substituindo o uso de fertilizantes químicos. No entanto, ensaios de campo com plantas cultivadas inoculadas juntamente com rizobactérias são necessários para a exploração comercial máxima de bactérias promotoras de crescimento (Bhattacharyya & Jha, 2012).

O tratamento de sementes com agentes de controle biológico é um dos métodos de aplicação mais adequados para o controle biológico de patógenos transmitidos pelo solo na espermosfera e rizosfera, objetivando controlar doenças de pré-emergência e pós-emergência (Ugoji *et al.*, 2006). Como técnica de aplicação, a bacterização das sementes é amplamente utilizada nos estudos de controle biológico e promoção do crescimento das plantas, mas provavelmente outros métodos, como a incorporação na inoculação de solos ou mudas, também podem ser efetivos (Pereira *et al.*, 2009).

Embora a utilização de agentes de biocontrole/bactérias promotoras de crescimento, via bacterização de sementes ou através de outras formas de aplicação, constitua uma prática bem visada e promissora, assim como se faz para produtos químicos sintéticos, antes de qualquer recomendação, é importante estar bem estabelecido, que esses agentes não prejudicam a qualidade das sementes e dos grãos produzidos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da bacterização com *Bacillus* sp. sobre a qualidade de sementes de milho, assim como o efeito da bacterização e inoculação do solo com *Bacillus* sp. a nível de campo sobre a qualidade de grãos de milho com e sem a presença de tratamento de sementes convencional.

### **3.2 Material e Métodos**

Foram realizados quatro experimentos, os três primeiros nos laboratórios de Bacteriologia Vegetal e Pós-Colheita de Grãos, no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia e o último experimento, a nível de campo, na Estação Experimental Agronômica (EEA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com avaliações realizadas no Pólo de Pós-colheita de Grãos da EEA-UFRGS e laboratório de Pós-Colheita de Grãos. A região geoclimática onde se encontra a EEA é denominada Depressão Central do estado do Rio Grande do Sul. O clima da região é subtropical de verão úmido quente, do tipo Cfa, conforme a classificação de Koeppen (Bergamaschi *et al.*, 2013). O solo é caracterizado como Argissolo Vermelho Distrófico típico (Streck *et al.*, 2008), pertencente à unidade de mapeamento São Jerônimo.

Os três primeiros experimentos, com intuito de avaliar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho bacterizadas com *Bacillus* sp. foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em esquema bifatorial 3x5 para os dois primeiros (Tabela 1) e 4x5 para o terceiro (Tabela 2). O primeiro fator consistiu em Híbridos de milho, em três níveis para os dois primeiros experimentos e variedades de milho, em 4 níveis para o terceiro experimento. O segundo fator consistiu em Isolados bacterianos, com cinco níveis: Tratamento controle (sem bactéria); *Bacillus safensis* RF69; *Bacillus velezensis* RP103; *Bacillus velezensis* RP242; e Mix bacteriano (mistura dos três isolados). Foram realizados testes de germinação, comprimento de plântula, matéria seca de plântulas e sanidade de sementes.

As estirpes bacterianas utilizadas em todos os experimentos foram isoladas do sistema radicular de plantas de milho e selecionados com potencial para o biocontrole de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* no agroecossistema de cultivo do milho em trabalho prévio realizado por Einloft (2016).

TABELA 1. Relação dos quinze tratamentos de dois experimentos de laboratório, ambos compostos por três híbridos de milho sem ou com tratamento de sementes comercial – TSC (Standak® Top) em combinação com cinco isolados de *Bacillus* sp. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Tratamento	Híbrido sem TSC x Isolado	Híbrido com TSC x Isolado
T1	BG 7049 Tratamento controle	AG 9025 Tratamento controle
T2	BG 7049 + <i>B. safensis</i> RF69	AG 9025 + <i>B. safensis</i> RF69
T3	BG 7049 + <i>B. velezensis</i> RP103	AG 9025 + <i>B. velezensis</i> RP103
T4	BG 7049 + <i>B. velezensis</i> RP242	AG 9025 + <i>B. velezensis</i> RP242
T5	BG 7049 + Mix Bacteriano	AG 9025 Mix Bacteriano
T6	30F53 VYHR Tratamento controle	DKB 230 Tratamento controle
T7	30F53 VYHR + <i>B. safensis</i> RF69	DKB 230 + <i>B. safensis</i> RF69
T8	30F53 VYHR + <i>B. velezensis</i> RP103	DKB 230 + <i>B. velezensis</i> RP103
T9	30F53 VYHR + <i>B. velezensis</i> RP242	DKB 230 + <i>B. velezensis</i> RP242
T10	30F53 VYHR + Mix Bacteriano	DKB 230 + Mix Bacteriano
T11	30F53 VYH Tratamento controle	AG 8690 Tratamento controle
T12	30F53 VYH + <i>B. safensis</i> RF69	AG 8690 + <i>B. safensis</i> RF69
T13	30F53 VYH + <i>B. velezensis</i> RP103	AG 8690 + <i>B. velezensis</i> RP103
T14	30F53 VYH + <i>B. velezensis</i> RP242	AG 8690 + <i>B. velezensis</i> RP242
T15	30F53 VYH + Mix Bacteriano	AG 8690 + Mix Bacteriano

TABELA 2. Relação dos vinte tratamentos de um experimento de laboratório compostos por quatro variedades de milho crioulo sem tratamento de sementes comercial em combinação com cinco isolados de *Bacillus* sp. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Tratamento	Variedade crioula x Isolado
T1	Jaguarão+ Testemunha
T2	Jaguarão + <i>B. safensis</i> RF69
T3	Jaguarão + <i>B. velezensis</i> RP103
T4	Jaguarão + <i>B. velezensis</i> RP242
T5	Jaguarão + Mix Bacteriano
T6	Caiano Tratamento controle
T7	Caiano + <i>B. safensis</i> RF69
T8	Caiano + <i>B. velezensis</i> RP103
T9	Caiano + <i>B. velezensis</i> RP242
T10	Caiano + Mix Bacteriano
T11	AZ 30 Tratamento controle
T12	AZ 30 + <i>B. safensis</i> RF69
T13	AZ 30 + <i>B. velezensis</i> RP103
T14	AZ 30 + <i>B. velezensis</i> RP242
T15	AZ 30 + Mix Bacteriano
T16	AZ 25 Testemunha
T17	AZ 25 + <i>B. safensis</i> RF69
T18	AZ 25 + <i>B. velezensis</i> RP103
T19	AZ 25 + <i>B. velezensis</i> RP242
T20	AZ 25 + Mix Bacteriano

O quarto e último experimento, utilizando o híbrido BG 7049, foi conduzido a campo, em delineamento de blocos casualizados em esquema trifatorial 2x2x5 (Tabela 3).

O primeiro fator do experimento a campo em esquema 2x2x5 consistiu em Tratamento de Sementes Convencional, de produto fungicida e inseticida Standak® Top (BASF), em dois níveis: com e sem. O segundo fator foi a Forma de Aplicação dos isolados bacterianos, em dois níveis: bacterização de sementes e inoculação do solo. O terceiro fator foi Isolado Bacteriano e teve 5 níveis: Tratamento controle (sem bactéria); *B. safensis* RF69; *B. velezensis* RP103; *B. velezensis* RP242; e Mix bacteriano (mistura dos três isolados). Composto por 20 tratamentos e 3 repetições o experimento a campo totalizou 60 unidades experimentais.

TABELA 3. Relação dos vinte tratamentos do experimento a campo compostos por Sementes de milho do híbrido BG 7049, com e sem tratamento de sementes convencional (TSC) em combinação com duas formas de aplicação de cinco isolados de *Bacillus* sp. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Tratamento	TSC x Forma de Aplicação x Isolado
T1	Com TSC + Bacterização de Sementes Tratamento controle
T2	Com TSC + Bacterização de Sementes + <i>B. safensis</i> RF69
T3	Com TSC + Bacterização de Sementes + <i>B. velezensis</i> RP103
T4	Com TSC + Bacterização de Sementes + <i>B. velezensis</i> RP242
T5	Com TSC + Bacterização de Sementes + Mix Bacteriano
T6	Sem TSC + Bacterização de Sementes Tratamento controle
T7	Sem TSC + Bacterização de Sementes + <i>B. safensis</i> RF69
T8	Sem TSC + Bacterização de Sementes + <i>B. velezensis</i> RP103
T9	Sem TSC + Bacterização de Sementes + <i>B. velezensis</i> RP242
T10	Sem TSC + Bacterização de Sementes + Mix Bacteriano
T11	Com TSC + Inoculação do Solo Tratamento controle
T12	Com TSC + Inoculação do Solo + <i>B. safensis</i> RF69
T13	Com TSC + Inoculação do Solo + <i>B. velezensis</i> RP103
T14	Com TSC + Inoculação do Solo + <i>B. velezensis</i> RP242
T15	Com TSC + Inoculação do Solo + Mix Bacteriano
T16	Sem TSC + Inoculação do Solo Tratamento controle
T17	Sem TSC + Inoculação do Solo + <i>B. safensis</i> RF69
T18	Sem TSC + Inoculação do Solo + <i>B. velezensis</i> RP103
T19	Sem TSC + Inoculação do Solo + <i>B. velezensis</i> RP242
T20	Sem TSC + Inoculação do Solo + Mix Bacteriano

Cada unidade experimental consistiu em uma parcela de 5 m de comprimento por 6 linhas de semeadura totalizando área de 11,25 m<sup>2</sup>. Com espaçamento entre linhas de 0,45 m, objetivando população de 70.000 plantas. ha<sup>-1</sup>, a semeadura foi realizada de forma manual, com posterior desbaste para adequação da densidade populacional.

Para adubação de base foi utilizado adubo NPK 10 - 20 - 20 e para adubação de cobertura no estádio V5, ureia e KCl. Em V8 adubação de cobertura somente com ureia, conforme resultado de análise do solo, calculando a dose para expectativa de produtividade de 12.000 kg ha<sup>-1</sup> (Rosa *et al.*, 2017). Para o controle de plantas daninhas, anteriormente à semeadura foi realizado primeiramente o controle físico, por capina, de plantas daninhas de maior porte, assim como controle químico, realizando a dessecação com herbicida. Após a semeadura houve mais

duas realizações de controle físico, conforme identificação de plantas infestantes, até o estádio V12.

Para o controle das pragas identificadas, foram realizadas duas aplicações de inseticidas nos estádios V3 e V8 utilizando Cropstar® e Engeo Pleno®, respectivamente. O experimento foi conduzido com a presença de irrigação por aspersão, mantendo uma média de 200 mm por semana, dividida em duas aplicações semanais, conforme a precipitação pluviométrica no local. A colheita foi realizada de forma manual, considerando 4,05 m<sup>2</sup> centrais como área útil de cada parcela. As espigas de milho foram trilhadas e seu teor de água verificado. Posteriormente os grãos foram secos em estufa com circulação de ar forçado, acondicionados em sacos de papel kraft no Pólo de Pós-Colheita da EEA-UFRGS.

### **3.2.1 Produção do Inóculo Bacteriano**

Os isolados de *Bacillus* sp. foram cultivados em meio esterilizado 523 (Kado e Heskett, 1970) por 24 horas e as concentrações celulares ajustadas a 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup> através de diluições seriadas. A suspensão do mix bacteriano foi formada pela mistura das três suspensões bacterianas ajustadas.

#### **3.2.1.1 Bacterização das Sementes**

Inicialmente as sementes foram desinfestadas em solução de 1% de hipoclorito de sódio por dois minutos. A bacterização das sementes foi conduzida em câmara de fluxo laminar e como proposto por Cavaglieri *et al.* (2005) com algumas modificações, conforme descrito a seguir. As sementes foram submersas em suspensões de inóculo bacteriano dentro de frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 1 mL de suspensão para cada semente. Para os testes de laboratório foram bacterizadas 220 sementes, utilizando 220 mL de suspensão. Para o experimento a campo foram utilizadas 360 sementes por tratamento, em 360 mL de suspensão bacteriana. Para o tratamento controle, as sementes foram submersas em água. Os tratamentos foram incubados por 2 horas em agitador rotativo, em 120 rpm a 28 °C. Após esse processo, o excesso de suspensão foi removido e as sementes utilizadas de imediato para a montagem dos testes em laboratório. As sementes bacterizadas para o experimento a campo foram

acondicionadas em câmara de fluxo laminar durante a noite, em bandejas forradas com papel toalha e semeadas no dia seguinte.

### **3.2.1.2 Inoculação do Solo**

A inoculação do solo foi realizada no experimento a campo aplicando as soluções bacterianas na forma de jato dirigido no sulco de semeadura através de pulverizador manual pressurizado, de forma que o produto atingisse toda superfície da linha de semeadura, utilizando o volume de calda de 20 mL por linha, totalizando 120 mL por parcela.

## **3.2.2 Qualidade de Sementes do Experimento em Laboratório**

### **3.2.2.1 Germinação**

O teste de germinação foi conduzido conforme as Regras para Análise de sementes (Brasil, 2009) utilizando 8 repetições de 50 sementes para cada tratamento. O substrato utilizado foi papel Germitest® umedecido com água destilada esterilizada, em quantidade de água equivalente a três vezes a sua massa. Foram confeccionados rolos envoltos em filme plástico e, posteriormente levados para uma câmara tipo BOD, previamente regulada a 25 °C, sem fotoperíodo. Foram realizadas avaliações do número de plântulas normais aos quatro e sete dias após a semeadura. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais (%).

### **3.2.2.2 Crescimento de plântula**

A avaliação do comprimento de plântulas foi realizada conforme metodologia descrita por Nakagawa (1999), utilizando cinco repetições de 20 sementes de milho dispostas em uma linha no terço superior do papel toalha, em seu sentido longitudinal. Os papéis foram umedecidos previamente com água destilada esterilizada, equivalente a 3 vezes a massa seca do papel. As sementes foram posicionadas de forma que a radícula estivesse voltada para baixo. Os rolos foram envoltos em papel filme e posicionados verticalmente na câmara BOD por sete dias, em temperatura constante de 25 °C. Ao final deste período, foi aferida a parte aérea

e raiz das plântulas normais, utilizando-se uma régua milimetrada. Os resultados médios por plântulas foram expressos em centímetros (cm).

### **3.2.2.3 Massa seca de plântula**

A determinação da massa de matéria seca foi obtida após a aferição do comprimento de plântulas. O material de parte aérea e raiz de cada repetição utilizada no teste de comprimento de plântulas foi acondicionada separadamente em sacos de papel kraft, e levados para uma estufa mantida à temperatura de 80 °C, por 24 horas (Nakagawa, 1999). Após esfriar, em dessecador, cada repetição teve a sua massa determinada. Os resultados médios obtidos foram expressos em miligrama por plântula ( $\text{mg plântula}^{-1}$ ).

### **3.2.2.4 Sanidade de sementes**

Através do *Blotter test* (Brasil, 2009) foi avaliada a qualidade sanitária das sementes de milho submetidas à bacterização. Foram utilizadas 200 sementes para cada tratamento, em 8 repetições, sendo cada repetição composta por uma caixa Gerbox, na qual foram dispostas as 25 sementes individualmente sobre camada dupla de papel Germitest® umedecido em três vezes o seu peso. As caixas com as sementes foram dispostas sob lâmpadas de luz fluorescente branca em câmara incubadora BOD, em regime intermitente de 12 h de luz e 12 h de escuro, temperatura de 24 °C, por 24 horas. Posteriormente, mantidas em freezer para congelamento por 24 horas e por fim novamente incubadas em BOD, por sete dias.

Após o período de incubação, as sementes foram examinadas individualmente, identificando-se os fungos presentes em cada uma, com auxílio de um estereomicroscópio com resolução de 30-80x. Os resultados foram expressos em percentual de ocorrência dos fungos (%).

## **3.2.3 Qualidade de Grãos do Experimento a Campo**

### **3.2.3.1 Teor de água**

Pelo método da estufa a  $105 \pm 3$  °C, com circulação forçada de ar, por 24 horas, conforme descrito nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) foi

realizada avaliação do teor de água dos grãos de milho no momento da colheita e após a secagem. Os resultados foram expressos em percentagem (%) de umidade em base úmida, para grãos recém colhidos e após a secagem.

#### **3.2.3.2 Peso de Mil Grãos**

O peso de mil grãos foi estimado através da média da pesagem de oito repetições de 100 grãos secos, realizada em balança analítica, multiplicando-se o valor médio por 10, conforme descrito nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em gramas (g).

#### **3.2.3.4 Massa específica**

A aferição da massa específica foi realizada através da pesagem dos grãos em balança eletrônica com precisão de 0,001 g, a partir de uma quantidade de grãos colocados em recipiente de volume conhecido. Os resultados dessa variável foram expressos em  $\text{kg m}^{-3}$ , em base seca.

#### **3.2.3.4 Classificação do Milho**

A classificação dos grãos foi realizada de acordo com a Instrução Normativa MAPA nº 60, de 22 de dezembro de 2011, publicada no D.O.U de 23.11.2011. Os defeitos identificados e pesados para tipificação foram grãos mofados, ardidos, chochos e imaturos. Os valores foram expressos em percentagem, sendo quantificada também a percentagem total de grãos avariados, matérias estranhas e impurezas.

#### **3.2.4 Análise estatística**

Após a compilação dos resultados, os dados foram submetidos a análises estatísticas analisando inicialmente a normalidade dos resíduos com o teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett ( $p \leq 0,05$ ). Posteriormente, procedeu-se a análise da variância pelo teste F. Quando a interação dos fatores se apresentou significativa ( $p \leq 0,05$ ) ou houve efeito significativo de algum dos fatores, a análise foi complementada pelo teste de

comparação de médias de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o pacote ExpDes do software R (Ferreira *et al.*, 2018).

### 3.3 Resultados e Discussão

#### 3.3.1 Qualidade de Sementes

##### 3.3.1.1 Germinação

Com os resultados de germinação das sementes obtidos para os híbridos de milho e as variedades crioulas, observou-se através do teste F ( $p \leq 0,05$ ) que não houve interação significativa entre os fatores híbridos/variedades e isolados, tampouco, significância para os fatores isoladamente. Portanto não foi realizado teste de comparação de médias para esses híbridos e variedades (Tabela 4).

TABELA 4. Porcentagem de Germinação de sementes de milho submetidos à bacterização com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Germinação (%)					
Variedades	Isolados				
Híbridos sem TSC	T. Controle	RF69	RP103	RP242	Mix
BG7049	98% <sup>ns</sup>	98%	99%	98%	98%
30F53 VYHR	95%	98%	98%	97%	98%
30F53 VYH	100%	97%	98%	98%	100%
Híbridos com TSC					
AG 9025	98% <sup>ns</sup>	98%	99%	98%	99%
DK 230	94%	95%	97%	94%	95%
AG 8690	98%	100%	98%	97%	98%
Variedades Crioulas Sem TSC					
Jaguarão	80% <sup>ns</sup>	89%	86%	82%	84%
Caiano	81%	84%	93%	89%	90%
AZ 30	84%	88%	83%	86%	87%
AZ 25	88%	88%	87%	85%	85%

<sup>ns</sup> F de interação não significativo ( $p \leq 0,05$ ).

Os dados de porcentagem de germinação demonstram que não houve efeito negativo dos tratamentos sobre a germinação das sementes de milho híbrido, sendo que todos os tratamentos apresentaram germinação de 94% ou mais e não diferiram significativamente da testemunha. Resultados semelhantes ocorreram

para as variedades crioulas, que obtiveram percentual de germinação entre 80%, com a variedade Jaguarão sob o tratamento controle, até 93%, para a variedade Caiano sob a bacterização com *B. velezensis* RP103.

Observa-se que não houve efeito prejudicial desses microrganismos em relação aos processos metabólicos envolvidos na germinação das sementes. No trabalho de Einloft (2016), a bacterização com os isolados RF69, RP103 e RP242 levou ao aumento na germinação de sementes da cultivar 30A77HX em relação ao tratamento controle inoculado com *F. verticillioides* e *A. flavus*, não diferindo, no entanto, do tratamento controle sem inoculação desses fungos (Einloft, 2016).

Vários trabalhos têm concluído que bactérias não apresentaram efeitos negativos na germinação de sementes. Em estudos como os de Ugoji *et al.* (2006) e Martínez-Álvarez *et al.* (2016), testando formulações de *Bacillus* sp., observaram que essas bactérias, mesmo em diferentes formulações não apresentaram efeitos negativos na germinação de sementes de milho.

Inoculando sementes de diferentes híbridos de milho, soja e algodão com *Bacillus subtilis*, Araújo (2008) verificou em ensaio de casa de vegetação que a bactéria não prejudicou a germinação e emergência de plântulas. O autor verificou que *B. subtilis* formulado com farinha de ostras apresentou resultados melhores para parâmetros como altura e massa seca de plântulas, apresentando potencial para incrementar o crescimento e a nutrição das plantas.

Bacon *et al.* (2001) demonstraram que *B. subtilis* é um endófito de raízes de milho que promove o crescimento aéreo e aumenta a germinação de sementes em solo infestado com *Fusarium verticillioides*. Segundo Araújo *et al.* (2010), a inoculação com bactérias diazotróficas pode aumentar a velocidade de germinação das sementes de cultivares de arroz, com menor contaminação por fungos.

### **3.3.1.2 Comprimento de plântula**

A análise de variância dos resultados obtidos para a variável comprimento de plântula em híbridos de milho sem tratamento de sementes comercial demonstrou interação significativa entre os fatores Híbridos x Isolados. Para os híbridos com tratamento de sementes comercial houve interação entre os fatores

híbridos x isolados, assim como, efeito significativo dos fatores de maneira isolada sobre o comprimento de plântulas de milho. Houve interação ( $p \leq 0,01$ ) entre os fatores variedades e isolados para as variedades de milho crioulo e os dados médios podem ser observados na Tabela 5.

TABELA 5. Comprimento de plântulas (cm) de híbridos e variedades de milho com ou sem Tratamento de Sementes Comercial (TSC) cujas sementes foram submetidas à bacterização com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um mix bacteriano. UFRGS – Porto Alegre, 2019.

Comprimento de plântula (cm)					
Variedades		Isolados			
Híbridos sem TSC	T. Controle	RF69	RP103	RP242	Mix
BG7049	26,60 Ba*	26,66 Ba	27,66 Aa	25,97 Ba	25,742 Ba
30F53 VYHR	22,03 Bc	22,86 Bb	21,59 Bb	22,19 Bc	24,68 Aa
30F53 VYH	23,56 Ab	20,95 Bc	21,83 Bb	23,93 Ab	20,99 Bb
Híbridos com TSC					
AG 9025	22,64 Aa*	18,48 Bb	24,95 Aa	20,79 Bb	25,41 Aa
DK 230	16,17 Ab	16,33 Ab	14,93 Ab	18,55 Ab	20,01 Aa
AG 8690	20,55 Ca	35,48 Aa	26,70 Ba	36,88 Aa	22,51 Ca
Variedades sem TSC					
Jaguarão	24,48 Bb**	29,85 Ab	27,63 Bb	31,38 Ab	32,77 Ab
Caiano	35,60 Aa	29,50 Bb	34,55 Aa	38,48 Aa	26,53 Bc
AZ 30	37,25 Aa	37,43 Aa	24,42 Cb	29,78 Bb	19,92 Dd
AZ 25	35,43 Aa	36,34 Aa	37,41 Aa	37,26 Aa	37,90 Aa

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Para o híbrido 30F53 VYHR, a bacterização de sementes com RF69, RP103 e RP242 não diferiu do tratamento controle em comprimento de plântulas. Já a bacterização com o Mix foi mais eficiente em promover o crescimento de plântulas de milho para o mesmo híbrido, em relação ao tratamento controle. Para o híbrido BG7049 ocorreu incremento do crescimento das plântulas sob o tratamento com a estirpe RP103. Esse mesmo híbrido apresentou desenvolvimento superior aos demais em todos os tratamentos, exceto ao híbrido 30F53 VYHR com o Mix bacteriano, ao qual, foi igual estatisticamente.

O híbrido de milho AG 8690 apresentou-se superior aos demais híbridos quando utilizados os isolados RF69 e RP242, que promoveram o crescimento de aproximadamente 15 centímetros na média do comprimento total de plântula em

relação ao tratamento controle. Esses mesmos isolados, para o híbrido AG 9025, provocaram efeito negativo sobre o crescimento de suas plântulas em relação ao tratamento controle. O híbrido DKB 230 não diferiu estatisticamente ao tratamento controle sobre o crescimento das plântulas de milho.

A comparação das médias de comprimento de plântula demonstra que a única variedade que sofreu influência positiva dos tratamentos sobre essa variável foi a Jaguarão, que teve incremento de comprimento quando as sementes foram submetidas ao tratamento com as estirpes RF69, RP242 e o mix bacteriano. A variedade que se manteve superior às demais foi a AZ 25, embora os isolados não tenham diferido do tratamento controle. Para a variedade Caiano, o isolado RF69 e o mix bacteriano não influenciaram o crescimento das plântulas. Houve resposta semelhante para a variedade AZ 30. Porém, além do mix, os isolados que apresentaram efeito negativo foram RP242 e RP103.

Soares (2011), estudando o efeito de rizobactérias, dentre elas, do gênero *Bacillus*, não verificaram efeito positivo no comprimento de plântulas de sementes de arroz, porém, concluíram que esses resultados mostram que as rizobactérias não apresentam efeito tóxico às plântulas de arroz. Maciel *et al.* (2014), avaliando o efeito do biocontrole por contato com *Bacillus subtilis* em sementes de *Pinus elliottii*, verificaram que não ocorreu diferença positiva para o comprimento de plântulas em comparação a testemunha, porém também não verificaram efeito negativo para esta característica avaliada, resultados semelhantes aos observados nesse trabalho para algumas estirpes e cultivares.

### **3.3.1.3 Massa seca de plântula**

Os híbridos de milho sem tratamento de sementes comercial foram submetidos à análise de variância que demonstrou haver interação ( $p \leq 0,05$ ) entre os fatores híbridos x isolados bacterianos. Para os híbridos com tratamento de sementes comercial e para as variedades crioulas essa interação foi ainda mais significativa ( $p \leq 0,01$ ) demonstrando também significância para os fatores isoladamente dos híbridos (Tabela 6).

TABELA 6. Massa Seca de Plântulas de milho (mg plântula<sup>-1</sup>) cujas sementes foram submetidas à bacterização com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Massa Seca de Plântula (mg plântula <sup>-1</sup> )					
Variedades		Isolados			
Híbridos sem TSC	T. Controle	RF69	RP103	RP242	Mix
BG7049	97,7 Ba*	96,0 Ba	129,4 Aa	133,8 Aa	118,6 Aa
30F53 VYHR	66,1 Ab	67,4 Ab	62,0 Ab	68,7 Ab	72,0 Ab
30F53 VYH	102,3 Aa	77,2 Bb	74,9 Bb	70,6 Bb	83,7 Bb
Híbridos com TSC					
AG 9025	56,2 Aa**	43,0 Bb	54,1 Ab	54,4 Ab	54,0 Aa
DK 230	48,1 Aa	48,9 Ab	46,1 Ab	52,4 Ab	46,0 Aa
AG 8690	57,7 Ba	79,6 Aa	64,9 Ba	84,6 Aa	46,4 Ca
Variedades Crioulas Sem TSC					
Jaguarão	62,3 Bb**	98,2 Aa	68,2 Bc	74,6 Bb	85,8 Aa
Caiano	78,9 Cb	69,2 Cb	119,3 Aa	92,7 Ba	63,1 Cb
AZ 30	106,4 Aa	103,8 Aa	72,8 Bc	88,1 Ba	78,9 Bb
AZ 25	96,4 Aa	97,4 Aa	99,9 Ab	105,3 Aa	102,6 Aa

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ );

\*\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias de Scott Knott ( $p \leq 0,01$ ).

Com relação aos resultados dos híbridos sem TSC, observa-se através da análise dos resultados não existir influências significativas dos diferentes isolados sobre a massa seca das plântulas do híbrido 30F53 VYHR. Os três isolados e o mix tiveram efeito negativo no aumento de massa seca das plântulas do híbrido 30F53 VYH. No entanto, resultados positivos foram obtidos para o híbrido BG7049 com os tratamentos RP103, RP242 e mix bacteriano, que incrementaram em 32%, 37% e 21% a massa seca das plântulas, em relação ao tratamento controle.

Para os híbridos com TSC, observou-se que para o cultivar AG 8690, com tratamento de sementes comercial, apresentaram respostas positivas para massa seca de plântulas sob a bacterização com os isolados RF69 e RP242, aumentando o teor de massa seca em 38% e 47%, quando comparadas com o tratamento controle. Para o híbrido AG 9025, o isolado RF69 provocou resposta negativa. No caso do híbrido DKB 230 todos os tratamentos proporcionaram resposta similar ao tratamento controle, demonstrando não haver influência da bacterização de sementes sobre a produção de massa seca no início de desenvolvimento das

plântulas de milho dessa cultivar, porém, não foram observados resultados negativos.

É possível verificar que entre as variedades de milho crioulo também existiram respostas diferentes aos isolados testados. O acúmulo de massa seca nas plântulas foi responsivo à bacterização com RF69 e mix bacteriano na variedade Jaguarão com incremento de 58 e 38%, respectivamente. E com RP103 e RP242, na variedade Caiano, houve um incremento de 51 e 17%, respectivamente. A variedade AZ 25 não demonstrou sofrer influência dos isolados com bacterização das sementes, uma vez que não diferiu quanto ao acúmulo de massa seca nas plântulas. Apenas para a variedade AZ 30 a bacterização com RP103, RP242 e mix bacteriano afetou negativamente a massa seca das plântulas de milho.

A comunicação no ambiente rizosférico é um fator importante para o sucesso das interações entre plantas e microrganismos, e esse ambiente é bem mais diversificado e dinâmico do que o ambiente esterilizado dos testes em laboratório. Além disso, a possível ativação de rotas de defesa vegetal pode gerar um custo energético para as plântulas. Essas, por sua vez, sem outra forma de captar nutrientes a não ser as reservas do endosperma, podem ter seu desenvolvimento inicial prejudicado devido ao consumo energético despendido para a sua defesa em detrimento ao crescimento e o acúmulo de massa seca inicial.

Os resultados do trabalho de Bákonyi *et al.* (2013) mostram que os tratamentos com isolados de *Azotobacter* e *Bacillus* em diferentes culturas, incluindo milho, tiveram um efeito favorável no crescimento das plântulas, evidenciado na massa seca, o que concorda com os resultados deste trabalho, em que as respostas de incremento de massa seca foram positivas para quatro variedades de milho em combinações com os diferentes isolados.

Em um trabalho realizado em casa de vegetação, Pereira *et al.* (2009) observaram que a adição de *B. amyloliquefaciens* ou *Microbacterium oleovorans*, na concentração de  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> em sementes de milho reduziu significativamente a contagem de *F. verticillioides* nos tecidos internos das raízes das plântulas resultantes. E a adição de *F. verticillioides* em  $10^7$  esporos mL<sup>-1</sup> às sementes por sua vez reduziu significativamente o comprimento do colmo e a massa seca

radicular das plântulas de milho (Pereira *et al.*, 2009). Isso denota que no estudo citado, mesmo as bactérias não tendo incrementado o comprimento e massa seca de plântulas, evitaram a perda dessas variáveis devido a supressão da contaminação fúngica.

### 3.3.1.4 Sanidade de sementes

Os resultados obtidos referentes ao teste de sanidade das sementes de milho revelaram diferenças significativas entre os tratamentos com os diferentes isolados bacterianos em relação ao tratamento controle para grande parte das variedades avaliadas (Tabela 7). Na avaliação da sanidade sob a bacterização com diferentes isolados aos quais foram submetidas as sementes de milho, foram detectados os seguintes fungos: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* spp., e *Rhizopus* spp.

TABELA 7. Porcentagem de incidência de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., e *Penicillium* spp., detectados em sementes de híbridos de milho sem Tratamento de Sementes Comercial (TSC) submetidas à bacterização com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Híbridos	Isolados				
	T. Controle	RF69	RP103	RP242	Mix
<i>Aspergillus</i> sp.					
BG7049	3,0% <sup>ns</sup>	1,5%	0%	0,5%	0%
30F53 VYHR	0%	0%	0%	0%	0%
30F53 VYH	0,5%	0%	0%	0%	0,5%
<i>Fusarium</i> sp.					
BG7049	71% Ab <sup>**</sup>	43% Bb	63,5% Ba	63,5% Ba	59% Ba
30F53 VYHR	85% Aa	88,5% Aa	84,5% Aa	82% Aa	82,5% Aa
30F53 VYH	86% Aa	80,5% Aa	80% Aa	69,5% Bb	86,5% Aa
<i>Penicillium</i> spp.					
BG7049	51,5% Aa <sup>**</sup>	57% Aa	21% Ba	24% Ba	25,5% Ba
30F53 VYHR	5% Ac	0,5% Ac	1,5% Ab	1,5% Ab	4,5% Ab
30F53 VYH	14% Ab	6% Bb	5% Bb	3,5% Bb	9,5% Ab

<sup>\*\*</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias de Scott Knott ( $p \leq 0,01$ );

<sup>ns</sup>F de interação não significativo ( $p \leq 0,05$ ), dados não submetidos à teste de comparação de médias.

As respostas dos híbridos de milho sem tratamento de sementes comercial à bacterização das sementes podem ser observadas na Tabela 7. Conforme a análise de variância não houve interação entre os fatores híbrido x isolados bacterianos para a incidência de *Aspergillus* sp. Já para incidência de *Fusarium* sp.

e *Penicillium* spp. houve interação e efeito dos fatores, com 1% de probabilidade de erro.

Os três isolados RF69, RP103 e RP242 e o mix propiciaram a menor incidência de *Fusarium* sp. nas sementes dos híbridos BG7049 em comparação ao tratamento controle. Para o híbrido 30F53 VYH, o isolado RP242, apresentou o menor crescimento de *Fusarium* sp. em relação aos demais tratamentos. Para o híbrido 30F53 VYHR, os tratamentos não diferiram entre si quanto à incidência desse fungo. Constatou-se que quanto à incidência de *Penicillium* spp., os isolados RP103, RP242 e Mix foram eficientes em controlar esse fungo no híbrido BG7049.

Os isolados RF69, RP103 e RP242 foram eficientes em reduzir a incidência de *Penicillium* spp. no híbrido 30F53 VYH. A bacterização com os isolados e o Mix não foi capaz de reduzir a incidência de *Penicillium* spp. nas sementes do híbrido 30F53 VYHR, cujo tratamento testemunhas teve 5% de incidência de *Penicillium* spp.

As sementes dos híbridos com tratamento de sementes comercial apresentaram incidência de fungos inferior aos demais experimentos (Tabela 8).

TABELA 8. Porcentagem de incidência de *Fusarium* sp., e *Penicillium* spp., detectados em sementes de híbridos de milho com Tratamento de Sementes Comercial (TSC) submetidas à bacterização com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Híbridos	Isolados				
	T. Controle	RF69	RP103	RP242	Mix
<i>Fusarium</i> sp.					
AG 9025	15,5% Ab**	5% Bc	3% Ba	0,5% Ca	0,5% Cb
DKB 230	32,5% Aa	12% Bb	5% Ca	2,5% Ca	3,5% Ca
AG 8690	39,5% Aa	33,5% Aa	4,5% Ba	4,5% Ba	5% Ba
<i>Penicillium</i> spp.					
AG 9025	0% Ab*	0% Aa	0% Aa	0,5% Aa	0% Aa
DKB 230	0,5% Ab	0% Aa	0% Aa	0% Aa	1% Aa
AG 8690	3,5% Aa	1% Ba	0% Ba	0% Ba	0% Ba

\*\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias de Scott Knott ( $p \leq 0,01$ );

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Com respostas positivas à bacterização com os isolados de *Bacillus* sp. A análise de variância do experimento com sementes dos híbridos com tratamento

de sementes, pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ) demonstrou interação entre fatores híbridos x isolados e efeito dos tratamentos sobre a incidência de *Fusarium* sp. e *Penicillium* spp. Para os híbridos AG 9025 e DKB 230 todos os isolados foram eficientes em reduzir significativamente a incidência de *Fusarium* sp. Para o híbrido AG 8690 também houve resultado semelhante exceto para o isolado RF69, que não diferiu do tratamento controle.

Não houve incidência expressiva de *Penicillium* spp. em nenhum dos híbridos com tratamento de sementes comercial submetidas à bacterização, sendo inferior a 3,5%. No entanto, pode-se observar efeito benéfico de todos os isolados em reduzir significativamente a incidência desse fungo em relação ao tratamento controle no híbrido AG 8690. Nos demais híbridos não ocorreram efeitos negativos.

As variedades de milho crioulo apresentaram respostas diferentes em relação a cada fungo detectado no teste. Através da análise de variância verificou-se que houve interação entre os fatores variedade x isolados e efeito dos fatores sobre a incidência dos fungos *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* spp. e os dados médios podem ser observados na Tabela 9.

Quanto à incidência de *Aspergillus* sp. nas sementes de milho crioulo o efeito mais expressivo foi na variedade AZ 30. Todos os isolados reduziram significativamente a porcentagem de incidência do fungo *Aspergillus* sp. nas sementes de milho crioulo variedade AZ 30. A incidência foi de 20,8% no tratamento controle, variando de 4 a 5,6% entre o mix e demais isolados. Resultado semelhante ocorreu para a variedade AZ 25, com exceção do mix bacteriano, que não diferiu do tratamento controle. Para a variedade Jaguarão o isolado efetivo em reduzir a incidência de *Aspergillus* sp. foi o mix bacteriano e para a variedade Caiano houve resposta positiva da bacterização com os isolados RF69 e RP242.

TABELA 9. Porcentagem de incidência de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp., detectados em sementes de variedades crioulas milho sem TSC submetidas à bacterização com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Variedades	Isolados				
	T. Controle	RF69	RP103	RP242	Mix
<i>Aspergillus</i> sp.					
Jaguarão	20% Aa**	21,6% Aa	17,6% Aa	20% Aa	7,2% Ba
Caiano	4% Ab	0,8% Bb	3,2% Ab	0% Bb	3,2% Aa
AZ 30	20,8% Aa	4,8% Bb	4,8% Bb	5,6% Bb	4% Ba
AZ 25	16,8% Aa	5,6% Bb	5,6% Bb	6,4% Bb	12% Aa
<i>Fusarium</i> sp.					
Jaguarão	12% Bb**	53,6% Ab	55,2% Ab	70,4% Aa	80% Aa
Caiano	30,4% Ca	84% Aa	89,6% Aa	92,8% Aa	56% Ba
AZ 30	29,6% Ba	65,6% Ab	87,2% Aa	82,4% Aa	69,6% Aa
AZ 25	44,8% Ba	55,2% Bb	65,6% Ab	67,2% Aa	73,6% Aa
<i>Penicillium</i> spp.					
Jaguarão	87,2% Aa**	76% Aa	48% Ba	44,8% Ba	24% Ca
Caiano	84% Aa	19,2% Bb	14,4% Bb	2,4% Cc	25,6% Ba
AZ 30	76% Aa	32% Bb	12,8% Cb	9,6% Cc	4% Db
AZ 25	64% Aa	50,4% Aa	22,4% Bb	24% Bb	13,6% Ba
<i>Rhizopus</i> spp.					
Jaguarão	0% Ad**	0% Aa	0% Aa	0% Aa	0% Aa
Caiano	8,8% Ab	0% Ba	0% Ba	0% Ba	0% Ba
AZ 30	11,8% Aa	0% Ba	0% Ba	0% Ba	0% Ba
AZ 25	4% Ac	0% Ba	0% Ba	0% Ba	0% Ba

\*\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias de Scott Knott ( $p \leq 0,01$ ).

Para o fungo *Fusarium* sp. a menor incidência ocorreu no tratamento controle. Sua incidência foi mais elevada nos tratamentos com todos os isolados para as variedades Jaguarão, Caiano e AZ 30. Para AZ 25 só o isolado RF69 não diferiu do tratamento controle, os demais isolados também prejudicaram as sementes quanto à incidência de *Fusarium* sp. Resultado oposto foi encontrado em relação à incidência do fungo *Rhizopus* spp., em que o fungo só foi detectado no tratamento controle.

Conforme os resultados observados de incidência de *Fusarium* sp., observa-se que tanto para os híbridos quanto para as variedades crioulas sem tratamento de sementes comercial, não houve muitos resultados positivos da bacterização das sementes com os isolados de *Bacillus* sp. Apenas para o híbrido BG 7049 em que os isolados e o mix proporcionaram a significativa redução desse fungo e para o

híbrido 30F53 VHY em que o isolado RP242 reduziu 16,5% a incidência de *Fusarium* sp. Assim, pode-se dizer que para os demais lotes de sementes sem tratamento convencional, o biocontrole de *Fusarium* sp. não foi efetivo.

Quando foi realizado o mesmo processo de bacterização nos híbridos com tratamento de sementes comercial, observou-se que ocorreu redução significativa no desenvolvimento de *Fusarium* sp. Esse resultado contempla as expectativas sobre a interação do biocontrole com o controle químico. Isso porque a presença do tratamento químico por si só já garante boa redução da incidência fúngica, e, uma vez sendo essa incidência em menores proporções possibilitou os isolados de agirem sobre os fungos, seja por competição ou antibiose, os dois mecanismos de controle dessas estirpes bacterianas, relatados por Einloft (2016).

Todas as variedades de milho crioulo responderam positivamente a bacterização com as rizobactérias, reduzindo a incidência de *Penicillium* sp. A variedade Jaguarão teve resultados positivos com os isolados RP103 e RP242 que reduziram em cerca de 40% a incidência do fungo, e o mix bacteriano reduziu em 60%. As variedades AZ 30 e Caiano responderam a todos os tratamentos, tendo a primeira, sua incidência desse fungo, reduzida em 74% com o Mix e a segunda chegando à redução de 80% da incidência de *Penicillium* sp. na bacterização com RP242. E para a variedade AZ 25, uma redução de 40% com RP103 e RP242, chegando à supressão de 50,4% da contaminação deste fungo com o mix bacteriano.

Os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. tiveram redução bastante expressiva reduzindo de 20% para 7,2% a incidência de *Aspergillus* sp. na variedade Jaguarão e redução de 20,8% para 4% na variedade AZ 30, ambos com o Mix bacteriano. Esta última variedade que teve a incidência de *Penicillium* sp. reduzida em 72% com o Mix bacteriano e a variedade Caiano em 81,6% com o isolado RP242.

Além desses fungos já citados, é conveniente salientar que o fungo *Rhizopus* spp. incidiu apenas na testemunha. Sabe-se que esse fungo possui crescimento extremamente rápido, podendo muitas vezes se sobrepor aos demais. Assim, como não houve incidência de *Rhizopus* spp., somado à redução significativa dos outros

fungos, é possível que tenha sido criada nessa situação a oportunidade de crescimento de *Fusarium* sp. presente nessas sementes sem tratamento químico.

Os resultados obtidos por Einloft (2016), inoculando *A. flavus* e as rizobactérias diretamente em grãos, indicam que todos os isolados, RF69, RP103 e RP242 foram capazes de reduzir o crescimento de *A. flavus* nos grãos de milho, sugerindo a possibilidade de futuras aplicações dos isolados em espigas de milho no campo. Em testes de laboratório, testando a aplicação de *Bacillus amyloliquefaciens* BA-S13 *in vitro*, no solo e diretamente sobre a espiga. Etcheverry *et al.* (2009) também observaram redução significativa de *A. flavus*.

Diante do que foi exposto, se faz notória a necessidade de valorizar as alternativas existentes para o controle fúngico em plantas. O tratamento de sementes, por si só, já é uma prática reconhecida como uma das mais eficientes, uma vez que possibilita menor utilização de defensivos quando comparado à aplicação a campo. A eventualidade de se refinar essa prática, somando a utilização de produtos biológicos e não menos eficientes, confirma constante evolução no manejo integrado de doenças em plantas.

### **3.3.2 Qualidade de Grãos**

A análise de variância evidenciou efeito da interação entre utilização de tratamento de sementes convencional (TSC) e isolados bacterianos sobre o teor de água nos grãos na colheita. Quanto aos dados de peso de mil grãos e massa específica nenhum fator exerceu influência significativa.

#### **3.3.2.1 Teor de água**

Observou-se maior teor de água com o tratamento controle sem TSC em comparação ao tratamento controle com TSC (Figura 1). Além disso, para grãos sem TSC, os isolados bacterianos proporcionaram menor teor de água no momento da colheita. Após a colheita e secagem, os grãos chegaram a uma média homogênea de 10,1% de teor de água.

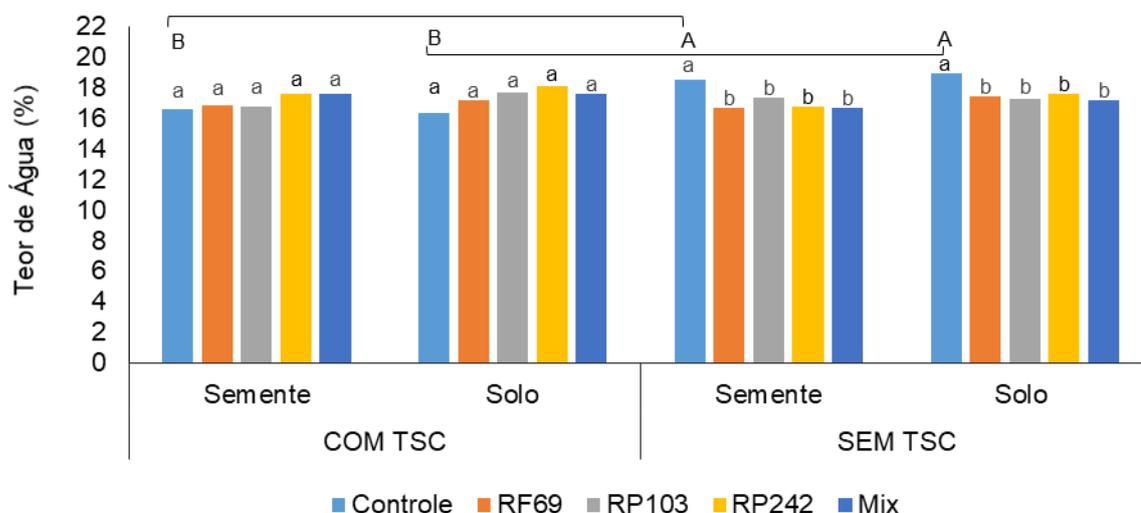


FIGURA 1. Teor de água (%) em grãos de milho após a colheita de experimento testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido BG 7049 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

A capacidade do tratamento de sementes com fungicidas em reduzir a incidência de fungos como *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. poderia estar relacionada a esta diferença de umidade entre os tratamentos controle com e sem TSC, no entanto, não foram obtidos dados que pudessem explicar tal resultado.

O teor de água é uma das variáveis mais importantes a ser considerada na avaliação de qualidade dos grãos, pois é em função desse parâmetro associado à temperatura, que se dá o favorecimento do crescimento e desenvolvimento fúngico na massa de grãos.

Para os fungos de campo, como é o caso de *F. verticillioides*, as condições ótimas de crescimento e produção de fumonisinas no milho são quando a umidade do grão atinge de 20 a 21% (Bernd, 2014). Além disso, o teor de água é determinante para a manutenção da qualidade do produto durante o armazenamento.

A redução no teor de água nos grãos originados do tratamento com os isolados bacterianos em comparação aos grãos do tratamento controle pode ser em função da aceleração da maturação e processo de senescência provocado pela ação das rizobactérias.

Dentre os mecanismos que podem estar relacionados a esse fenômeno, estão aqueles envolvidos na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, assim como aqueles envolvidos na ativação de rotas de defesa vegetal. Isto porque, em ambos, há a produção e ativação de rotas metabólicas envolvendo fitohormônios.

Quanto às rotas em si, as principais rotas de sinalização estimuladas no sistema de defesa da planta, induzida por rizobactérias, segundo a grande maioria de informações na literatura, compreendem o ácido jasmônico e o etileno em consequência à colonização da raiz por rizobactérias, que inicia uma cascata de sinalização (Glick, 2012; Glick, 2014; Taiz e Zeiger, 2013; Medeiros *et al.*, 2014).

O etileno regula a expressão gênica, epinastia das folhas, regula o florescimento, aumenta a taxa de senescência foliar, medeia algumas respostas de defesa e age na camada de abscisão. O ácido abscísico regula a expressão gênica, é intermediário da sinalização em outras rotas hormonais, regula a maturação de sementes, promove acúmulo de reservas nas sementes, e ainda promove a senescência foliar independente do etileno (Taiz e Zeiger, 2013).

Dessa forma, é razoável afirmar que é possível que a aceleração da maturação pode se dar em decorrência da ativação de defesa vegetal em decorrência de incidência fúngica em período próximo à maturação fisiológica, funcionando, assim, como um mecanismo de garantia da dispersão da espécie.

No presente estudo houve um atraso na colheita em torno de 8 dias em função de chuva. Além disso, houve um período de espera para secagem dos grãos colhidos de 7 dias em função do preparo das amostras, incluindo a debulha e avaliações realizadas antes da secagem, como teor de água e produtividade. Isto pode ter interferido na umidade dos grãos, visto que eles apresentam uma tendência em entrar em equilíbrio higroscópico com as condições do ambiente (Temperatura e UR), e este equilíbrio pode levar um período maior do que sete dias, o que pode ter levado a esta diferença na umidade de colheita dos grãos, ou seja, os grãos ainda não haviam entrado em equilíbrio higroscópico com o ambiente.

Evidenciando a importância de realizar a colheita no momento adequado, avaliando o efeito do aumento do atraso na colheita de diferentes híbridos de milho,

Costa *et al.* (2018) consideraram como ótimo para a colheita, a umidade dos grãos de 18%. Os autores observaram que houve uma tendência significativa de aumentar a incidência de podridão e contaminação por fumonisinas totais nos grãos ao retardar a colheita, resultado esse, variável conforme o híbrido. Os autores concluíram que atrasar a colheita para minimizar os custos de secagem pode aumentar o risco de contaminação por micotoxinas em milho nos trópicos do Brasil.

### 3.3.2.2 Peso de mil grãos e Massa Específica

O peso de mil grãos (PMG) corrigindo o teor de água para mesma base, ou seja, 13% não foi influenciado por nenhum dos fatores. Os resultados médios de massa específica (ME) também tiveram respostas semelhantes. A Tabela 10 mostra os valores médios para essas variáveis.

Grãos com menor umidade apresentam menor tamanho e aderência, o que favorece melhor acomodação dos grãos, justificando o maior peso por volume. Segundo Brooker *et al.* (1992), o peso volumétrico está inversamente relacionado com o teor de água dos grãos. Em seu trabalho, avaliando grãos de milho inoculados com fungos e sendo armazenados sob diferentes umidades, Camargo (2017) observou menor peso volumétrico na umidade de 16% quando comparado a umidade de 13%. Possivelmente pelo fato de a avaliação de peso volumétrico neste trabalho ter sido realizada após a uniformização do teor de água, após secagem dos grãos, não foi possível detectar diferença entre os tratamentos.

TABELA 10. Peso de Mil Grãos (PMG) e Massa Específica (ME) de grãos de milho após a colheita e secagem de experimento testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Tratamentos	Peso de Mil Grãos				Massa Específica			
	COM TSC		SEM TSC		COM TSC		SEM TSC	
	Semente	Solo	Semente	Solo	Semente	Solo	Semente	Solo
T. Controle	472,0 <sup>ns</sup>	445,9	459,8	434,0	745,3 <sup>ns</sup>	737,0	748,7	699,1
RF69	506,5	464,8	492,5	504,7	784,4	741,3	726,7	790,1
RP103	492,2	508,1	465,5	499,6	723,1	794,5	743,2	777,4
RP242	493,5	485,5	478,9	524,5	775,3	762,8	759,9	810,4
Mix	499,8	484,5	459,6	510,6	792,0	773,6	747,6	792,4

<sup>ns</sup> Não significativo, dados não submetidos à teste de comparação de médias.

### 3.3.2.3 Classificação do milho

Na avaliação da classificação de grãos de milho constatou-se que quanto aos defeitos em grãos de milho, dentre os grãos avariados, foram encontrados grãos mofados, ardidos e chochos. Além disso, foram encontradas nas amostras colhidas, matérias estranhas e impurezas.

Através da análise de variância, observou-se que para a ocorrência de grãos mofados houve efeito da presença de tratamento de sementes convencional (TSC), efeito dos isolados de *Bacillus* sp., da forma de aplicação dos isolados, bem como interação entre os fatores TSC x Isolados de *Bacillus* sp. Para a ocorrência de grãos ardidos, houve efeito da interação entre os fatores TSC x Isolados.

Para a ocorrência de grãos chochos houve efeito apenas da interação entre TSC x Forma de Aplicação dos Isolados. Já o total de grãos avariados sofreu influência do TSC, dos Isolados e interação entre TSC x Isolados de *Bacillus* sp. A porcentagem de matérias estranhas e impurezas não sofreu efeito de nenhum fator, visto que não houve diferença significativa para essa variável, que geralmente ocorre em função da operação de colheita e processo de limpeza dos grãos.

Os dados médios de porcentagem de grãos mofados (Tabela 11), mostram que o TSC foi capaz de diminuir esse defeito nos grãos do tratamento controle (sem *Bacillus* sp.), e os isolados foram eficientes em reduzir a média geral de grãos mofados em relação ao tratamento controle.

O efeito positivo de todos os isolados e mix bacteriano em diminuir a porcentagem de grãos mofados foi independente da forma de aplicação, bacterização de sementes ou inoculação do solo. Este resultado sugere que o tratamento de sementes convencionalmente utilizado auxilia a manter a qualidade dos grãos e que a utilização dos isolados é capaz de contribuir para a qualidade dos grãos, inclusive na ausência de TSC.

Mofados são os grãos que apresentam contaminações fúngicas visíveis a olho nu ou então coloração esverdeada ou azulada no germe, produzida pela presença de fungos. Fungos como *Aspergillus* sp., e *Penicillium* spp. influenciam diretamente na expressão do defeito em questão. Segundo Valmorbida (2016), não há uma resolução nacional que estabeleça um limite máximo para fungos em cereais. Entretanto, a presença de fungos no milho, pode ser indicativo de

deterioração e contaminação por micotoxinas, assim como é o caso de grãos ardidos, que serão abordados em seguida.

TABELA 11. Porcentagem de Grãos Mofados após a colheita e secagem de experimento de milho testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Isolado x TSC		Formas de Aplicação				Média dos Isolados (%)
		Bacterização de Semente (%)		Inoculação do Solo (%)		
Tratamento Controle	Com TSC	0,25	b*	0	b*	3,90 a*
	Sem TSC	3,23	a	4,55	a	
<i>B. safensis</i> RF69	Com TSC	0		0,10		0,26 b
	Sem TSC	0,13		0,38		
<i>B. velezensis</i> RP103	Com TSC	0,22		0,49		0,22 b
	Sem TSC	0,14		0,30		
<i>B. velezensis</i> RP242	Com TSC	0		0,47		0,20 b
	Sem TSC	0,08		0,33		
Mix dos Isolados	Com TSC	0		0,38		0,08 b
	Sem TSC	0		0,17		

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na subdivisão das colunas e na coluna direita não diferem entre si pelo teste de Scott Knott  $\leq 0,05$ .

Os dados médios de porcentagem de grãos ardidos (Tabela 12) mostram que na ausência dos tratamentos com *Bacillus* sp., o tratamento de sementes convencional, com inseticida e fungicida (TSC) também foi capaz de diminuir esse defeito nos grãos.

Observou-se, também, que os isolados foram eficientes em reduzir a média geral de grãos ardidos em relação ao tratamento controle. A ocorrência de grãos ardidos em milho é uma consequência da intensidade de podridões de espigas, principalmente pela colonização da espiga durante a fase de enchimento de grãos (Pinto *et al.*, 2007; Wordell Filho, 2010). Esses grãos ardidos constituem um dos principais problemas de redução da qualidade de grãos de milho devido à produção de micotoxinas, incluindo as fumonisinas produzidas por *F. moniliforme*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (Wordell Filho, 2010; Wordell Filho & Spagnolo, 2013).

TABELA 12. Porcentagem de Grãos Ardidos após a colheita e secagem de experimento de milho testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Isolado x TSC		Formas de Aplicação				Média dos Isolados
		Bacterização de Semente		Inoculação do Solo		
Tratamento Controle	Com TSC	0,42	b*	0,15	b*	1,57 a*
	Sem TSC	1,24	a	0,90	a	
<i>B. safensis</i> RF69	Com TSC	0,29		0,57		0,26 b
	Sem TSC	0,35		0,17		
<i>B. velezensis</i> RP103	Com TSC	0,32		0,38		0,41 b
	Sem TSC	0,21		0,60		
<i>B. velezensis</i> RP242	Com TSC	0,34		0,72		0,29 b
	Sem TSC	0,28		0,34		
Mix dos isolados	Com TSC	0,34		0,08		0,21 b
	Sem TSC	0,08		0,34		

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na subdivisão das colunas e na coluna direta não diferem entre si pelo teste de Scott Knott  $\leq 0,05$ .

Além da possibilidade de contaminação por micotoxinas, os grãos ardidos são indesejáveis por prejudicarem seu valor na comercialização, uma vez que o produto no momento da venda pode sofrer desconto a partir de 6% de grãos ardidos. Os grãos ardidos também são mais leves, provocando a consequente redução da produção apresentando qualidade inferior em relação ao valor nutricional. Todos esses fatores contribuem para a desvalorização do produto no mercado, diminuindo o valor de venda (Ribeiro *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2011; Lima, 2017).

Os estudos realizados por Pinto *et al.* (2007) e Freitas *et al.* (2009) demonstraram que há diferenças significativas entre cultivares de milho em relação à produção de grãos ardidos e mofados. Houve acentuada interação entre cultivares e o fungo toxigênico *F. subglutinans* (*Gibberella fujikuroi* var. *subglutinans*) quanto à biossíntese de fumonisina B1 em grãos de milho (Pinto *et al.*, 2007) e o percentual de grãos ardidos correlaciona-se negativamente com a produtividade de grãos (Freitas *et al.*, 2009).

Quanto aos dados de grãos chochos, considerando que houve interação entre os fatores TSC e forma de aplicação, para os isolados aplicados via

bacterização de sementes, observou-se que o TSC diminuiu a média de grãos chochos (Tabela 13). Para os grãos obtidos a partir das sementes sem TSC, a aplicação dos isolados via inoculação do solo propiciaram menor porcentagem de grãos chochos.

TABELA 13. Porcentagem de Grãos Chochos após a colheita e secagem de experimento de milho testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Isolados	COM TSC		SEM TSC	
	Bacterização de Semente	Inoculação do Solo	Bacterização de Semente	Inoculação do Solo
Tratamento Controle	0,08	0,20	0,19	0,11
<i>B. safensis</i> RF69	0,02	0,22	0,22	0,02
<i>B. velezensis</i> RP103	0,07	0,02	0,08	0,02
<i>B. velezensis</i> RP242	0,00	0,00	0,05	0,09
Mix dos isolados	0,03	0,17	0,20	0,13
Médias TSC x Aplicação	0,04 b*	-	0,24 A** a	0,07 B

\*Letras minúsculas iguais na linha não diferem entre si para o efeito de TSC dentro do nível Forma de aplicação via Bacterização de sementes; \*\*Letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si para o efeito da forma de aplicação dentro do nível sem TSC pelo teste de comparação de médias de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Conforme a IN 60/2011, grãos chochos ou imaturos: são os grãos desprovidos de massa interna, enrijecidos e que se apresentam enrugados por desenvolvimento fisiológico incompleto, sendo que os grãos pequenos e os de endosperma córneo (ponta de espiga) não são considerados chochos ou imaturos, sendo considerados grãos normais. Isto também tem uma relação direta com produção e produtividade, quanto mais grãos chochos, menores são produção e produtividade (Brasil, 2011).

A porcentagem de grãos avariados foi semelhante ao resultado obtido de porcentagem de grãos mofados e ardidos quanto ao efeito do TSC (Tabela 14), em que a presença de TSC foi eficiente em reduzir efetivamente a porcentagem de grãos avariados (mofados+ardidos+chochos) no tratamento controle (sem bacterização de sementes ou inoculação de *Bacillus* sp. no solo). O efeito dos isolados em reduzir o total de grãos avariados foi observado em grãos obtidos de sementes sem TSC (Figura 2).

TABELA 14. Porcentagem de Total de Grãos Avariados (Mofados+Ardidos+Chochos) após a colheita e secagem de experimento de milho testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Isolado x TSC		Formas de Aplicação			
		Bacterização de Sementes		Inoculação do Solo	
Tratamento Controle	Com TSC	0,75	b*	0,89	b
	Sem TSC	4,33	a	6,57	a
<i>B. safensis</i> RF69	Com TSC	0,31	a	0,89	a
	Sem TSC	0,71	a	0,57	a
<i>B. velezensis</i> RP103	Com TSC	0,60	a	0,89	a
	Sem TSC	0,43	a	0,92	a
<i>B. velezensis</i> RP242	Com TSC	0,34	a	1,19	a
	Sem TSC	0,84	a	0,76	a
Mix dos isolados	Com TSC	0,37	a	0,63	a
	Sem TSC	0,27	a	0,64	a

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na subdivisão das colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott  $\leq 0,05$ .

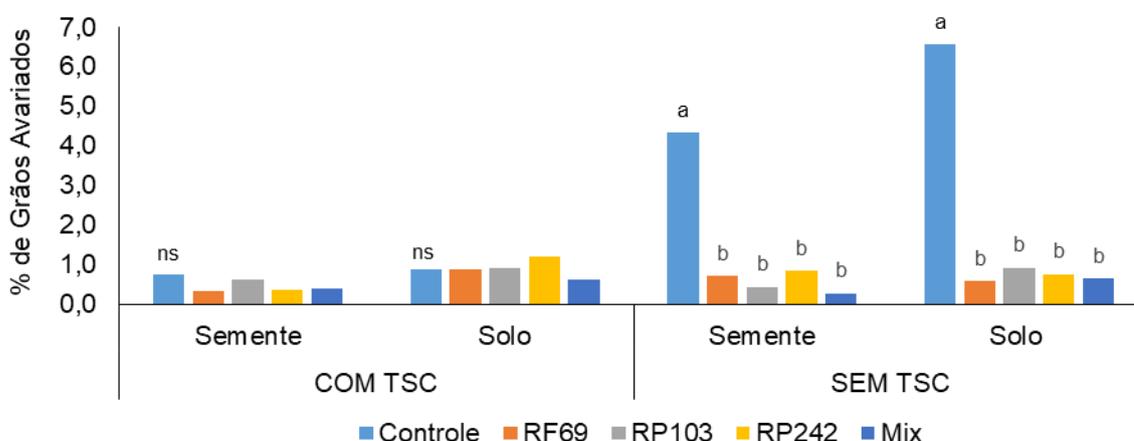


FIGURA 2. Efeito dos isolados *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e do Mix bacteriano sobre a porcentagem de Total de Avariados em grãos de milho após colheita de experimento testando aplicação via bacterização de sementes e inoculação do solo com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

A proporção máxima como padrão de qualidade para grãos avariados utilizada, de modo geral, é 6% (Pinto *et al.*, 2007), mesmo limite estabelecido pelo Ministério da Agricultura para classificar os grãos como Tipo 1 (Brasil, 2011). O percentual de grãos ardidos em um lote também é utilizado para classificar o milho em Tipos, sendo Tipo 1 com até 1% de grãos ardidos, Tipo 2 com até 2% e Tipo 3

com até 3%, acima dessa percentagem até o limite de 5% o lote já é considerado Fora de Tipo (Brasil, 2011), sendo recomendado um reprocessamento para separar os grãos defeituosos da massa de grãos e assim reclassificar o lote como aceitável para comercialização.

Após realizar a segregação visual por defeitos em grãos de milho, Piedade *et al.* (2002) avaliaram a distribuição de aflatoxinas nessas frações, e concluíram que as amostras de grãos classificados como defeituosos apresentaram os maiores níveis de contaminação em todas as amostras. Esses autores verificaram que essa fração de grãos defeituosos, representando cerca de 20% da amostragem total, contribuiu com 84% da contaminação por aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) dentre todas as amostras avaliadas.

Os autores recomendam que a segregação dos grãos com defeitos favorece a redução da contaminação dos lotes de milho. Em acréscimo, é relevante salientar a importância de se obter o máximo de grãos inteiros sadios para diminuir a probabilidade de contaminações como essas, sem depender totalmente de um processo físico de segregação de grãos defeituosos. Assim, é fundamental o manejo integrado de pragas e doenças e boas práticas agrícolas.

Através dos dados obtidos de porcentagem de matérias estranhas e impurezas (Tabela 15), é possível notar que as médias não sofreram efeito dos fatores testados, não havendo diferença entre os tratamentos aplicados sobre essa variável.

TABELA 15. Porcentagem de Matérias Estranhas e Impurezas em massa de grãos de milho após a colheita e secagem de experimento de milho testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Isolados	COM TSC		SEM TSC	
	Bacterização de Semente	Inoculação do Solo	Bacterização de Semente	Inoculação do Solo
Tratamento Controle	0,04 <sup>ns</sup>	0,21	0,10	0,20
<i>B. safensis</i> RF69	0,13	0,23	0,13	0,12
<i>B. velezensis</i> RP103	0,12	0,09	0,15	0,06
<i>B. velezensis</i> RP242	0,11	0,10	0,11	0,09
Mix dos isolados	0,08	0,11	0,13	0,14

<sup>ns</sup> Não significativo, dados não submetidos à teste de comparação de médias.

São escassos na literatura relatos sobre a influência da utilização de agentes de biocontrole ou rizobactérias promotoras de crescimento sobre a qualidade física e tecnológica de grãos. A classificação dos grãos de milho em tipos é um dos parâmetros que se traduz em qualidade comercial do produto. Após analisar e quantificar os grãos mofados, ardidos, chochos, total de avariados e matérias estranhas e impurezas, as amostras de milho foram então classificadas em tipos e esses dados podem ser observados na Tabela 16.

TABELA 16. Tipificação de grãos de milho obtidos de experimento de milho testando a bacterização de sementes e inoculação do solo com *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e um Mix bacteriano utilizando sementes do híbrido AG 9025 com e sem tratamento de sementes convencional (TSC). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Isolados	COM TSC		SEM TSC	
	Bacterização de Semente	Inoculação do Solo	Bacterização de Semente	Inoculação do Solo
Tratamento Controle	1*	1	2**	2
<i>B. safensis</i> RF69	1	1	1	1
<i>B. velezensis</i> RP103	1	1	1	1
<i>B. velezensis</i> RP242	1	1	1	1
Mix dos isolados	1	1	1	1

\*Milho Tipo 1: lote com porcentagem total de grãos avariados (ardidos+mofados+chochos) menor que 6%, dos quais, a porcentagem de grãos ardidos foi menor que 1%.

\*\*Milho Tipo 2: lote com porcentagem total de grãos avariados (ardidos+mofados+chochos) menor que 10%, dos quais, a porcentagem de grãos ardidos foi menor que 2%.

Os grãos de milho, obtidos de sementes com TSC não sofreram nenhum tipo de influência dos tratamentos sobre a classificação do milho. Já os grãos advindos de sementes sem TSC, demonstraram sofrer influência dos Isolados Bacterianos em enquadrar o milho em Tipo 1, por manter a porcentagem média de grãos ardidos menor que 1% (Tabela 12) e da porcentagem de grãos avariados abaixo de 6% (Tabela 1; Figura 2) conforme as exigências descritas pela Instrução Normativa - IN 60/2011 (Brasil, 2011). Na Instrução Normativa estão descritos os valores máximos permitidos para o enquadramento de tipo dos grãos de milho. Conforme prevê esta IN, no total de grãos avariados são contabilizados todos os defeitos, com exceção dos carunchados, que tem seus limites pré-definidos separadamente. Esses resultados indicam que os isolados bacterianos representam uma possível alternativa ao tratamento convencional de sementes.

### 3.4 Conclusões

Observou-se que o efeito da bacterização com *Bacillus* sp. sobre a qualidade de sementes de milho foi positivo. A germinação das sementes não foi afetada pelos isolados. O comprimento de plântula foi influenciado pelos isolados, mas dependeu da variedade de milho. Os híbridos de milho que merecem atenção em próximos estudos de promoção de crescimento são BG7049, 30F53 VYHR e AG 8690, e as variedades crioulas Jaguarão e Caiano, com destaque dos isolados *B. safensis* R69 e *B. velezensis* RP242, pois apresentaram bons resultados em promover o crescimento de plântulas.

Houve destaque para o híbrido AG 8690 com TSC, que teve o comprimento de plântulas incrementado pelos três isolados. O isolado RP103 teve destaque para o híbrido BG 7049 sem TSC, o Mix bacteriano para o híbrido 30F53 VYHR sem TSC, e os isolados RF69, RP242 e Mix bacteriano para a variedade crioula Jaguarão sem TSC.

A massa seca de plântulas foi influenciada pela bacterização de sementes com *Bacillus* sp., mas também dependeu da variedade de milho. Os isolados RP103, RP242 e o Mix Bacteriano se destacaram no incremento de massa seca do híbrido BG 7049 sem TSC, o isolado RF69 e o Mix Bacteriano aumentaram a massa seca da variedade Jaguarão e os isolados RP103 e RP242 elevou a massa seca das plântulas da variedade Caiano sem TSC.

Quanto à sanidade das sementes bacterizadas com *Bacillus* sp., observou-se que para os híbridos com ou sem TSC, quanto menor a incidência de fungos na testemunha, maior a eficiência dos isolados no controle. Já no caso das variedades crioulas, sem TSC, os resultados de incidência foram variáveis, mas mesmo com alta incidência de fungos como *Aspergillus* sp. e *Penicillium* spp. houve efeito positivo dos isolados e do Mix no controle.

A maioria das cultivares de milho poderá responder de forma positiva em próximos estudos de biocontrole com os isolados testados, e o grande destaque foi o híbrido BG7049, pois apresentou bons resultados de qualidade de semente e de qualidade de grãos, principalmente quanto à sanidade em sementes e grãos.

Todos os isolados e o mix apresentaram potencial de controle de fungos toxigênicos como *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* spp. em grãos de

milho, podendo ser selecionados para formular inoculante para sementes de milho sendo o *B. velezensis* RP103 e *B. velezensis* RP242, os isolados com maior potencial para as cultivares testadas.

O tratamento de sementes convencional (TSC), com fungicida e inseticida, reduziu a ocorrência de defeitos nos grãos de milho nos tratamentos controle, e constitui uma ferramenta importante no manejo da cultura do milho. Na ausência de tratamentos com os isolados de *Bacillus* sp., o TSC é indispensável.

Os isolados de *Bacillus* sp. e o mix contribuíram na produção de grãos de milho de maior qualidade reduzindo a porcentagem de grãos mofados e ardidos, e podem ser uma opção de manejo sem tratamento de sementes convencional por terem sido capazes de influenciar na tipificação dos grãos, reduzindo a porcentagem total de grãos avariados.

### 3.5 Referências

ARAÚJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostra e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 340-346, 2008.

ARAÚJO, A. E. S. *et al.* Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 932-939, 2010.

BACON, C. W. *et al.* Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, Washington, DC, v. 109, n. 2, p. 325-332, 2001.

BÁKONYI, N. *et al.* Using biofertilizer to improve seed germination and early development of maize. **Polish Journal of Environmental Studies**, Olsztyn, v. 22, n. 6, p. 1595-1599, 2013.

BARBOSA, C. A. **Manual da cultura do milho**. Viçosa, MG: AgroJuris, 2010, 199 p.

BERGAMASCHI, H. *et al.* **Clima da Estação Experimental da UFRGS e região de abrangência**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 78 p.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA, 2009. 399 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 60 de 22 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 23 dez. 2011.

BRITO, A. H.; Controle químico de doenças foliares e grãos ardidos em milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 11, n. 1, p. 49-59, 2012.

BROOKER, D. B.; BAKKER-ARKEMA, F. W.; HALL, C. W. **Drying and storage of grains and oilseeds**. New York: Van Nostrand Reinold, 1992. 450 p.

CAMARGO, C. M. **Efeitos da radiação UV-C na qualidade nutricional e tecnológica de grãos de milho inoculados com fungos e armazenados sob diferentes umidades**. 2017. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; MOREIRA, E. N. Transmissão de fungos em sementes de cereais de inverno e milho: implicações epidemiológicas. *In*: ZAMBOLIM, L. (ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 55-71.

CAVAGLIERI, L. R. *et al.* Rhizobacteria and their potential to control *Fusarium verticillioides*: effect of maize bacterisation and inoculum density. **Antonie van Leeuwenhoek**, Louvain, v. 87, n. 3, p. 179-187, 2005.

CHAVES-LOPEZ, C. *et al.* Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 119, n. 2, p. 487-499, 2015.

COSTA, R. V. *et al.* **Recomendações para a redução da incidência de grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. 22 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 38.).

COSTA, R. V. *et al.* Delaying harvest for naturally drying maize grain increases the risk of kernel rot and fumonisin contamination. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 43, n. 5, p. 452-459, 2018.

BERND, L. P. *et al.* Inoculation of *Pseudomonas fluorescens* and NPK fertilization on chemical composition and contamination fungus-fumonisin corn. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 12, p. 1274-1280, 2014.

EINLOFT, T. C. **Biocontrole de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* por *Bacillus* spp. isolados de plantas de milho**. 2016. 137 f. Tese (Doutorado) -

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

ETCHEVERRY, M. G. *et al.* Biological interactions to select biocontrol agents against toxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* from maize. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 167, n. 5, p. 287-295, 2009.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção do milho**. 2. ed. Campinas: Guaíba Agropecuária, 2004. 360 p.

FERREIRA, E. B. CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: pacote experimental designs (Portuguese): version 1.2.0**. Wien: The R Foundation, 2018.

FISHER, M. C. *et al.* Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, London, v. 484, n. 1, p. 186-194, 2012.

FREITAS, M. B. *et al.* Produtividade e incidência de grãos ardidos em híbridos de milho cultivados no Sudoeste de Goiás. **Agrarian**, Dourados, v. 2, n. 4, p. 73-81, 2009.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, London, v. 2012, [art.] 963401, [p. 1-15], 2012.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiology Research**, Basel, v. 169, n. 1, p. 30-39, 2014.

KADO, C. J.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 1, p. 969-976, 1970.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 11, p. 1259-1266, 2004.

LIMA, A. **Quantificação de fungos e de grãos avariados em milho no estado de Santa Catarina**. 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2017.

MACIEL, C. G. *et al.* Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* Engelm. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 38, n. 3, p. 505-512, 2014.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. C. *et al.* Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium*

*verticillioides* in maize plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 32, n. 75, p. 1-10, 2016.

MEDEIROS, F. H. V. *et al.* Ganho de função em plantas mediadas por bactérias e fungos. *In*: SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. *et al.* (ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Maringá: UEM/MPA, 2014. p. 233-253.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, 2005. 398 p.

MONTEIRO, L.; MARIANOLL, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 1, p. 23-29, 2005.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseado no desempenho das plântulas. *In*: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. p. 1-24.

ONGENA, M. *et al.* Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 1084-1090, 2007.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

PEIXOTO, A. R. Controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro, por *Pseudomonas* spp. fluorescentes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 153-160, 1997.

PEREIRA, P.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. G. Efficacy of bacterial seed treatments for the control of *Fusarium verticillioides* in maize. **BioControl**, Dordrecht, v. 54, n. 1, p. 103-111, 2009.

PEREIRA, P. *et al.* Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. **BioControl**, Dordrecht, v. 53, n. 3, p. 258-266, 2010.

PIEIDADE, F. S. *et al.* Distribution of aflatoxins in corn fractions visually segregated for defects. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 250-254, 2002.

PINTO, N. F. J. A.; VARGAS, E. A.; PREIS, R. A. Qualidade sanitária e produção de fumonisina B1 em grãos de milho na fase de pré-colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 304-306, 2007.

RIBEIRO, N. A. *et al.* Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1003-1009, 2005.

RODRIGUES, S. I. F. C. *et al.* Chemical and energetic content of corn before and after pre-cleaning. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 16, n. 2, p. 158-168, 2015.

ROMEIRO, R. D. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2005. 333 p.

ROSA, A. P. S. A.; EMYGDYO, B. M.; BISPO, N. B. (ed.). **62ª Reunião técnica anual da pesquisa do milho. 45ª Reunião técnica anual da pesquisa do sorgo: indicações técnicas para o cultivo de milho e sorgo no Rio Grande do Sul safras 2017/2018 e 2018/2019**. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 209 p.

SANGOI, L. *et al.* Níveis de manejo na cultura do milho em dois ambientes contrastantes: análise técnico-econômica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 1021-1029, 2003.

SBCS-NRS - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: SBCS-NRS, 2016. 376 p.

SOARES, V. N. **Physiological potential of rice seeds treated with rhizobacteria or thiamethoxam**. 2011. 125 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.

STRECK, E. V. *et al.* **Solos do Rio Grande do Sul**. 2. ed. Porto Alegre: EMATER/RS, 2008. 222 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Hormônios vegetais e sinais. *In*: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 541-596.

UGOJI, E. O.; LAING, M. D.; HUNTER, C. H. An investigation of the shelf-life (storage) of *Bacillus* isolates on seeds. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 72, n. 1, p. 28-33, 2006.

VALMORBIDA, R. **Fungos e micotoxinas em grãos de milho (*Zea mays* L.) e seus derivados produzidos no Estado de Rondônia, Região Norte do Brasil**. 2016. 151 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

VIEIRA, B. G. T. L. *et al.* Structural changes in soybean seed coat due to harvest time and storage. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 11, n. 1, p. 625-628, 2013.

WORDELL FILHO, J. A. Micotoxinas na cultura do milho. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 23, p. 46-48, 2010.

WORDELL FILHO, J. A.; SPAGNOLLO, E. Sistema de cultivo e doses de nitrogênio na sanidade e no rendimento do milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 2, p. 199-205, 2013.

### 3.6 Apêndices

APÊNDICE 1. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados médios de Teor de Água (%) nos grãos de milho do híbrido BG 7049 obtidos em experimento a campo, em resposta a existência de Tratamento de Sementes Convencional (TSC), Formas de Aplicação dos isolados (F. Apl.) e Isolados bacterianos (Iso). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	0,68677	0,34339	0,3538	0,7043
TSC	1	0,28843	0,28843	0,2971	0,5889
Forma de Aplicação	1	1,46016	1,46016	1,5043	0,2276
Isolados	4	2,38857	0,59714	0,6152	0,6543
TSC*F.Apl.	1	0,41003	0,41003	0,4224	0,5196
TSC*Iso	4	19,61671	4,90418	5,0524	0,0023
F.Apl.*Iso	4	1,28497	0,32124	0,331	0,8554
TSC*F.Apl.*Iso	4	2,08111	0,52028	0,536	0,7101
Resíduo	38	36,8853	0,97067		
Total	57	65,10204			
CV					16,28%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 2. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados médios de peso de mil grãos (PMG) de milho do híbrido BG 7049 obtidos em experimento a campo, em resposta a existência de Tratamento de Sementes Convencional (TSC), Formas de Aplicação dos isolados (F.Apl.) e Isolados bacterianos (Iso). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	15.684,345	7.842,173	2,8068	0,073
TSC	1	20,122	20,122	0,0072	0,9328
Forma de Aplicação	1	16,869	16,869	0,006	0,9385
Isolados	4	14.479,619	3.619,905	1,2956	0,289
TSC*F.Apl.	1	1.606,984	1.606,984	0,5752	0,4529
TSC*Iso	4	4.180,144	1.045,036	0,374	0,8257
F.Apl.*Iso	4	23.501,356	5.875,339	2,1029	0,0995
TSC*F.Apl.*Iso	4	7.889,443	1.972,361	0,7059	0,5929
Resíduo	38	106.170,180	2.793,952		
Total	57	173.549,062			
CV					0,55%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 3. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados médios de massa específica (ME) de grãos de milho do híbrido BG 7049 obtidos em experimento a campo, em resposta a existência de Tratamento de Sementes Convencional (TSC), Formas de Aplicação dos isolados (F.Apl.) e Isolados bacterianos (Iso). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	13.429,788	6.714,894	2,603	0,0872
TSC	1	169,904	169,904	0,0659	0,7988
Forma de Aplicação	1	2.540,126	2.540,126	0,9847	0,3273
Isolados	4	9.098,020	2.274,505	0,8817	0,4841
TSC*F.Apl.	1	3.446,383	3.446,382	1,336	0,255
TSC*Iso	4	2.027,513	506,878	0,1965	0,9387
F.Apl.*Iso	4	10.005,303	2.501,326	0,9696	0,4354
TSC*F.Apl.*Iso	4	12.972,357	3.243,089	1,2572	0,3037
Resíduo	38	98.029,141	2.579,714		
Total	57	151.718,536			
CV					0,33%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 4. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados médios de porcentagem de grãos de milho mofados do híbrido BG 7049 obtidos em experimento a campo, em resposta a existência de Tratamento de Sementes Convencional (TSC), Formas de Aplicação dos isolados (F.Apl.) e Isolados bacterianos (Iso). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	0,46133	0,23067	1,3658	0,2674
TSC	1	8,22636	8,22636	48,7108	0
Forma de Aplicação	1	1,46835	1,46835	8,6945	0,0054
Isolados	4	31,62119	7,9053	46,8097	0
TSC*F.Apl.	1	0,20254	0,20254	1,1993	0,2804
TSC*Iso	4	34,70357	8,67589	51,3726	0
F.Apl.*Iso	4	0,25391	0,06348	0,3759	0,8244
TSC*F.Apl.*Iso	4	1,74796	0,43699	2,5875	0,0521
Resíduo	38	6,4175	0,16888		
Total	57	85,10271			
CV					18,78%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 5. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados médios de porcentagem de grãos de milho ardidos do híbrido BG 7049 obtidos em experimento a campo, em resposta a existência de Tratamento de Sementes Convencional (TSC), Formas de Aplicação dos isolados (F.Apl.) e Isolados bacterianos (Iso). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	0,59915	0,29958	0,9041	0,4134
TSC	1	0,52159	0,52159	1,5741	0,2173
Forma de Aplicação	1	0,30377	0,30377	0,9167	0,3444
Isolados	4	3,64929	0,91232	2,7533	0,0419
TSC*F.Apl.	1	0,15994	0,15994	0,4827	0,4914
TSC*Iso	4	4,65771	1,16443	3,5141	0,0155
F.Apl.*Iso	4	0,14005	0,03501	0,1057	0,9798
TSC*F.Apl.*Iso	4	1,01323	0,25331	0,7645	0,555
Resíduo	38	12,5916	0,33136		
Total	57	23,63633			
CV					15,45%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 6. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados médios de porcentagem de grãos de milho chochos do híbrido BG 7049 obtidos em experimento a campo, em resposta a existência de Tratamento de Sementes Convencional (TSC), Formas de Aplicação dos isolados (F. Apl.) e Isolados bacterianos (Iso). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	0,24434	0,12217	2,8159	0,0724
TSC	1	0,08365	0,08365	1,9282	0,173
Forma de Aplicação	1	0,02667	0,02667	0,6148	0,4379
Isolados	4	0,08539	0,02135	0,4921	0,7415
TSC*F.Apl.	1	0,22819	0,22819	5,2597	0,0274
TSC*Iso	4	0,19686	0,04922	1,1344	0,355
F.Apl.*Iso	4	0,11548	0,02887	0,6655	0,6199
TSC*F.Apl.*Iso	4	0,08192	0,02048	0,4721	0,7559
Resíduo	38	1,64861	0,04338		
Total	57	2,71111			
CV					16,20%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 7. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados médios de porcentagem total de grãos de milho avariados do híbrido BG 7049 obtidos em experimento a campo, em resposta a existência de Tratamento de Sementes Convencional (TSC), Formas de Aplicação dos isolados (F.Apl.) e Isolados bacterianos (Iso). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	1,30663	0,65331	0,8118	0,4516
TSC	1	14,06631	14,06631	17,4794	0,0002
Forma de Aplicação	1	2,98836	2,98836	3,7135	0,0615
Isolados	4	53,79784	13,44946	16,7129	0
TSC*F.Apl.	1	0,25137	0,25137	0,3124	0,5795
TSC*Iso	4	57,7679	14,44198	17,9462	0
F.Apl.*Iso	4	0,90066	0,22517	0,2798	0,8892
TSC*F.Apl.*Iso	4	6,02478	1,5062	1,8717	0,1354
Resíduo	38	30,57993	0,80474		
Total	57	167,6838			
CV					17,34%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 8. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados médios de porcentagem de matérias estranhas e impurezas (MEI) em grãos de milho do híbrido BG 7049 obtidos em experimento a campo, em resposta a existência de Tratamento de Sementes Convencional (TSC), Formas de Aplicação dos isolados (F. Apl.) e Isolados bacterianos (Iso). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	0,00967	0,00483	0,188	0,8294
TSC	1	0,00089	0,00089	0,0346	0,8535
Forma de Aplicação	1	0,01754	0,01754	0,6824	0,4139
Isolados	4	0,04983	0,01246	0,4846	0,7469
TSC*F. Apl.	1	0,019	0,019	0,739	0,3954
TSC*Iso	4	0,03589	0,00897	0,349	0,8431
F. Apl.*Iso	4	0,07505	0,01876	0,7299	0,5772
TSC*F.Apl.*Iso	4	0,01836	0,00459	0,1785	0,9481
Resíduo	38	0,97683	0,02571		
Total	57	1,20305			
CV					2,53%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

## **4 Capítulo 2**

***Bacillus* sp. na promoção de crescimento em milho**

## RESUMO

A utilização de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP's) vem sendo investigada em diferentes culturas agrícolas e muitos resultados positivos têm sido encontrados em diversas pesquisas com vários isolados. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de isolados de *Bacillus* sp. aplicadas por bacterização de sementes e via inoculação do solo sobre o crescimento das plântulas e plantas de milho, em casa de vegetação e sob condições de campo. Um experimento em casa de vegetação foi conduzido na Faculdade de Agronomia da UFRGS, em delineamento de blocos casualizados, esquema trifatorial 2x4x5. O primeiro fator foi Forma de Aplicação de isolados bacterianos em dois níveis: Bacterização de Semente e Inoculação do Solo. O segundo fator foi Variedade de milho em quatro níveis: AZ 25, AG 8690, BG7049, e DKB 230. O terceiro fator foi Isolado Bacteriano em cinco níveis: *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242, um Mix dos três isolados e Tratamento Controle. Os 40 tratamentos, com cinco repetições, totalizaram 200 unidades experimentais. Outro experimento, a campo, utilizando o híbrido BG7049, foi conduzido na Estação Experimental Agrônômica da UFRGS, com delineamento de blocos casualizados em esquema trifatorial 2x2x5. O primeiro fator foi Tratamento de Sementes Convencional, com fungicida e inseticida, em dois níveis: Com TSC e Sem TSC. O segundo e o terceiro fator foram Forma de Aplicação e Isolado Bacteriano, tal qual o primeiro experimento. Cada um dos 20 tratamentos foi submetido a três repetições, totalizando 60 unidades experimentais. Os resultados apontam que a interação entre os fatores testados provoca respostas diferentes de altura de plantas, mas de modo geral as rizobactérias testadas promoveram incremento de produtividade de milho, com destaque para o Mix bacteriano que aumentou em 18,8% rendimento da cultura. Os testes em condições de casa de vegetação não foram suficientes para prever a influência das rizobactérias sobre o crescimento e rendimento de grãos em milho a nível de campo. A conclusão deste estudo foi que os isolados foram eficazes no milho e poderiam ser exploradas como bioformulados.

#### 4.1 Introdução

O maior produtor mundial de milho, os EUA, segundo a USDA (2019), estimam uma produção de 353 milhões de toneladas para a safra 2018/2019, e média de rendimento de 10.640 kg ha<sup>-1</sup>. O Brasil, terceiro maior produtor mundial, projeta uma produção de 101 milhões de toneladas, e rendimento médio de 5.580 kg ha<sup>-1</sup>. Considerando os avanços em manejo e tecnologia na produção agrícola brasileira e em comparação à produção dos EUA, a média de produtividade do milho no Brasil ainda é baixa. Dessa forma, ainda há uma grande margem a ser explorada quanto ao potencial produtivo brasileiro.

As condições de solo e clima são responsáveis pela maior parte da variação do efeito do ambiente sobre o desenvolvimento da planta e o rendimento de grãos. Ainda assim, o produtor de milho pode maximizar a exploração dos recursos ambientais pela adoção de práticas de manejo adequadas. Dentre essas práticas, destacam-se a escolha correta da época de semeadura e do arranjo de plantas, a realização de adubação de acordo com as necessidades da planta, irrigação e controle de plantas daninhas, pragas e doenças (Rosa *et al.*, 2017).

A partir da chamada “revolução verde”, as técnicas de produção foram modernizadas, com o intuito de aumentar a produção de grãos para erradicar a fome mundial, sem o estabelecimento de novas áreas cultivadas, o que trouxe também o aumento do uso de fertilizantes e defensivos agrícolas, que quando utilizados em demasia podem ocasionar contaminação da água e do solo (Octaviano, 2010; Oliveira *et al.*, 2014). Em função disso, surgem questionamentos sobre a eficácia de tal maneira de produzir, conscientização ambiental, direcionando estudos e pesquisas ao desenvolvimento de alternativas que atenuem os impactos do modelo convencional de produção (Jesus, 2013).

Pesquisas no mundo inteiro vêm tentando atender as metas de produção agrícola, cultivares de milho estão sendo desenvolvidas e, em um cenário de mudança climática, enfatizam-se materiais genéticos de ciclo curto e resilientes. Além disso, para obter altos rendimentos na maioria das culturas, como é particularmente verdade no milho, é necessário aplicar grande quantidade de fertilizantes minerais ao solo (Arruda *et al.*, 2013). Atividade essa, que contribui para a contaminação dos solos e da água, especialmente subterrânea, levando a riscos

de saúde e comprometendo a sustentabilidade agrícola. Portanto, são necessárias alternativas ambientalmente favoráveis e conservacionistas para proteger a biodiversidade e a sustentabilidade dos agroecossistemas.

Para tanto, têm sido estudados diversos microrganismos como biofertilizantes em diferentes culturas. Bactérias que vivem na rizosfera, chamadas de rizobactérias, são os microrganismos mais abundantes desse ambiente. São especialistas em colonizar raízes em todos os estágios de crescimento das plantas, mesmo na presença de uma microflora competitiva (Haghighi *et al.*, 2011). Podem viver dentro de plantas como endófitos facultativos, tendendo a viver alternando entre plantas e o ambiente rizosférico externo às raízes, ou seja, no solo (Marag & Suman, 2018).

Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP's) não só ajudam a beneficiar a saúde das plantas e aumentar a produtividade através de mais disponibilidade de nutrientes do solo, mas também podem induzir a resistência sistêmica para abranger os efeitos prejudiciais de estresses bióticos e abióticos (Basu *et al.*, 2017). Os mecanismos pelos quais as RPCP's podem influenciar o crescimento das plantas incluem biofertilização, fitoestimulação e biocontrole, de acordo com os efeitos da RPCP na fisiologia das plantas (Souza *et al.*, 2015; Noumavo *et al.*, 2016).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de *Bacillus* sp. sobre o crescimento de plantas de milho em diferentes variedades em condições de casa de vegetação, assim como de diferentes formas de aplicação em casa de vegetação e a nível de campo.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Preparação dos inóculos**

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio 523 (Kado e Heskett, 1970) por 24 horas e as concentrações celulares ajustadas a  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> por diluições seriadas. A suspensão do mix bacteriano foi formada pela mistura de cada suspensão bacteriana ajustada.

### **4.2.2 Aplicação dos agentes de biocontrole**

A bacterização das sementes foi conduzida como proposto por Cavaglieri *et al.* (2005) utilizando água mineral esterilizada como solvente nas suspensões bacterianas. Para cada tratamento foram utilizadas 360 sementes de milho submergidas em 360 mL de inoculo bacteriano dentro de frascos Erlenmeyer de 500 mL. Para o tratamento controle, as sementes foram submersas em 360 mL de água. Os tratamentos foram incubados por 2 horas em agitador rotativo a 120 rpm em 28 °C. Após o tratamento, o excesso de suspensão bacteriana foi removido e as sementes acondicionadas em bandejas com papel toalha e levadas à casa de vegetação para serem semeadas em vasos e à Estação Experimental para serem semeadas a campo.

A aplicação das suspensões com os inóculos bacterianos no solo foi realizada aplicando o produto diluído em água na forma de jato dirigido na linha de semeadura através de pulverizador manual utilizando o volume de calda de 20 mL por linha, ou 533 L.ha<sup>-1</sup>.

### **4.2.3 Casa de vegetação**

Foi conduzido um experimento em casa de vegetação no Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Conduzido em delineamento de blocos casualizados. O experimento consistiu em um esquema trifatorial 2x4x5. O primeiro fator foi Forma de Aplicação de isolados bacterianos em dois níveis: Bacterização de Semente e Inoculação do Solo. O segundo fator foi Variedade de milho em quatro níveis: AZ 25, AG 8690, BG7049, e DKB 230, todas elas com as sementes pré-tratadas de forma convencional, com inseticida e fungicida. O terceiro fator foi Isolado

Bacteriano em cinco níveis: *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242, um Mix dos três isolados e Tratamento Controle.

Somando 40 tratamentos, contando com 5 repetições, o experimento totalizou 200 unidades experimentais, cada uma composta por um vaso de polipropileno de 14 L com duas plantas de milho. A semeadura foi realizada manualmente, com cinco sementes por vaso, sendo realizado o desbaste 7 dias após. O substrato utilizado foi uma mistura de solo não autoclavado e incorporação de 1/3 de seu volume com substrato Carolina II. O solo utilizado, Argissolo Vermelho Distrófico típico (Streck *et al.*, 2008), foi coletado de área de produção de milho na Estação Experimental Agronômica da UFRGS (EEA - UFRGS), que após análise foi submetido à correção e adubação com calcário e adubo mineral conforme Manual de Adubação e Calagem (SBCS, 2016).

#### **4.2.3.1 Avaliações na casa de vegetação**

Periodicamente, a cada 15 dias após o dia da semeadura foi realizada a aferição da altura das plantas e diâmetro do colmo, nos estádios V3 e V6 segundo a escala de Ritchie *et al.* (1993). O procedimento considerou a base da planta rente ao solo até a última folha completamente expandida, utilizando uma régua. Os dados de diâmetro de colmo foram obtidos com uso de um paquímetro. Aproximadamente aos 45 dias após a semeadura, no fim do período experimental, quando as plantas estavam em estágio V7/V8, foi coletado material para avaliação da massa seca de raiz. As raízes foram separadas da parte aérea, lavadas, devidamente etiquetadas e acondicionadas em estufa de vidro para secagem por 8 dias. A determinação da massa seca foi efetuada em balança eletrônica com precisão de 0,001 g.

#### **4.2.4 Campo**

Foi conduzido um experimento de campo, na EEA-UFRGS, localizada no município de Eldorado do Sul no ano agrícola 2018/19. A região geoclimática é denominada Depressão Central do estado do Rio Grande do Sul. O clima da região é subtropical de verão úmido quente, do tipo Cfa, conforme a classificação de Koeppen (Bergamaschi *et al.*, 2003). O solo da área experimental é caracterizado

como Argissolo Vermelho Distrófico típico (Streck *et al.*, 2008), pertencente à unidade de mapeamento São Jerônimo.

O delineamento utilizado foi de blocos casualizados em esquema trifatorial 2x2x5. O primeiro fator foi Tratamento de Sementes Convencional, com fungicida e inseticida, em dois níveis: Com TSC e Sem TSC. O segundo fator foi a Forma de Aplicação, com dois níveis: Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo. O terceiro fator foi Isolado Bacteriano e teve 5 níveis: *B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242, um Mix de bactérias (mistura das três estirpes), e tratamento controle (sem bactéria). O híbrido utilizado para esse estudo foi o BG7049.

Cada um dos 20 tratamentos foi submetido a três repetições, totalizando 60 unidades experimentais. A unidade experimental consistiu em parcela formada por seis linhas de semeadura com 5 m de comprimento e 2,25 m de largura, totalizando 11,25 m<sup>2</sup>, sendo considerada área útil de 4,05 m<sup>2</sup>. O espaçamento entre linhas foi de 0,45 m, totalizando uma população de plantas de 70.000 plantas ha<sup>-1</sup>. A semeadura foi realizada com auxílio de semeadora manual (saraquá) e posterior desbaste para adequação da densidade populacional.

Foi realizada adubação de base com adubo NPK 10 - 20 - 20 e adubação de cobertura no estágio V5, com ureia e KCl. Em V8 adubação de cobertura somente com ureia, conforme resultado de análise do solo, calculando a dose para expectativa de produtividade de 12.000 kg ha<sup>-1</sup> (Rosa *et al.*, 2017). Foi realizado o controle mecânico, por capina, de plantas daninhas assim como controle químico anteriormente à semeadura, com aplicação localizada de herbicida. Após a semeadura, houve mais duas realizações de controle mecânico, conforme identificação de plantas infestantes, até o estágio V12. Para o controle de insetos praga identificados, foram realizadas duas aplicações de inseticida nos estádios V3 e V8 com Cropstar® e Engeo Pleno®, respectivamente. O experimento foi conduzido com a presença de irrigação por aspersão, mantendo uma média de 200 mm por semana, dividida em duas aplicações semanais, conforme a precipitação pluviométrica no local.

#### 4.2.4.1 Avaliações no campo

Periodicamente, a cada 15 dias após a semeadura, nos estádios V3, V6 e V10 segundo a escala de Ritchie *et al.* (1993), até após a completa formação do pendão (VT), já em R1, foi realizada a aferição da altura das plantas. As quatro avaliações foram realizadas em quatro plantas com homogeneidade morfológica nas linhas centrais de cada unidade experimental. O procedimento considerou a base da planta, rente ao solo, até a última folha inteiramente formada nos estádios vegetativos e até a inserção do pendão na última avaliação de altura, utilizando uma trena métrica.

A colheita foi realizada manualmente, coletando-se a área útil de cada unidade experimental. De dez espigas selecionadas aleatoriamente foi determinado o número de fileiras por espiga, o número de grãos por fileira estimando-se o número médio de grãos por espiga. As espigas foram trilhadas e a massa de grãos por parcela foi determinada em quilogramas, convertendo para kg ha<sup>-1</sup> e corrigindo para 13% de teor de água obtendo-se assim o rendimento de grãos da área útil de cada unidade experimental.

#### 4.2.5 Análise estatística

Após a compilação dos resultados, os dados foram submetidos a análises estatísticas, analisando inicialmente a normalidade dos resíduos com o teste de Shapiro-Wilk e quanto a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett ( $p \leq 0,05$ ). Posteriormente, os dados médios foram submetidos à análise da variância pelo teste F. Quando a interação dos fatores se apresentou significativa ( $p \leq 0,05$ ) ou houve efeito significativo de algum dos fatores, a análise foi complementada pelo teste de comparação de médias de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o pacote ExpDes do software R (Ferreira, 2018).

### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Casa de vegetação

##### 4.3.1.1 Altura de planta e diâmetro de colmo

Na Tabela 1 consta o resumo da análise de variância para altura e diâmetro de colmos de plantas de milho aos 15 e 30 dias após a semeadura (DAS).

TABELA 17. Resumo da Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), referente à avaliação de altura de plantas e diâmetro de colmo de milho aos 15 e 30 dias após a semeadura (DAS) em relação a forma de aplicação dos tratamentos (F. Aplicação), Variedade (Var), e Isolado bacteriano (Iso) em casa de vegetação. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV*	GL	Pr>FC			
		Altura 15 DAS	Altura 30 DAS	Diâmetro 15 DAS	Diâmetro 30 DAS
Bloco	4	0,323	0,219	0,683	0,811
Forma de Aplicação	1	0,525	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$
Variedade	3	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$
Isolado	4	0,087	$\leq 0,01$	0,494	0,060
F. Aplicação*Var	3	$\leq 0,01$	0,155	0,187	0,783
F. Aplicação*Iso	4	0,426	0,595	0,286	0,492
Variedade*Isolado	12	0,697	0,494	0,823	0,383
F. Aplicação*Var*Iso	12	0,005	0,054	0,520	0,866
CV (%)	-	9,75	7,83	9,48	9,48

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Coeficiente de Variação (CV).

Observou-se que para a variável altura de planta aos 15 DAS houve interação tripla entre os fatores analisados, denotando dependência associativa das formas de aplicação, variedades de milho, e isolados bacterianos. Para a altura de plantas, avaliada aos 30 DAS, houve efeito dos três fatores analisados de forma independente. Já para o diâmetro de colmo avaliado aos 15 e 30 DAS houve efeito independente dos fatores formas de aplicação e variedades de milho.

Observou-se efeito das variedades de milho e das formas de aplicação dos isolados sobre a altura das plantas aos 15 dias após a semeadura (Tabela 2) e aos 30 dias após a semeadura (Tabela 3). Os híbridos AG 8690 e DKB 230 já apresentam plantas mais baixas aos 15 DAS. E para a maioria das combinações dos fatores variedade e isolado bacteriano, a forma de aplicação que melhor influenciou a altura de plantas foi a bacterização de sementes.

TABELA 218. Efeito de quatro variedades de milho (AZ 25, AG 8690, BG7049, e DKB 230) e duas formas de aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) de isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242 e um mix) sobre a altura de plantas (cm) aos 15 dias após a semeadura (DAS) em casa de vegetação. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

		Altura de Plantas (cm) 15 DAS							
Isolado x F. Aplicação		Variedades de Milho							
		AZ 25		AG 8690		BG7049		DKB 230	
T. Controle	B. Semente	16,20 A*	a*	14,65 A	a	15,30 A	a	14,65 A	a
	I. Solo	15,85 A	a	16,10 A	a	15,88 A	a	15,15 A	a
RF69	B. Semente	16,55 A	a	14,95 B	a	17,35 A	a	12,80 C	b
	I.Solo	14,60 A	b	13,55 A	a	15,50 A	b	15,30 A	a
RP103	B. Semente	15,25 A	a	14,80 A	a	15,45 A	a	13,70 A	a
	I.Solo	16,10 A	a	12,40 B	b	15,25 A	a	13,90 B	a
RP242	B. Semente	15,70 A	a	14,55 A	a	15,55 A	a	13,30 B	a
	I.Solo	15,60 A	a	13,15 B	a	15,05 A	a	15,13 A	a
Mix	B. Semente	16,60 A	a	14,89 B	a	14,85 B	b	13,75 B	a
	I.Solo	13,95 B	b	13,65 B	a	17,05 A	a	15,05 B	a

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula nas subdivisões da coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott  $\leq 0,05$ .

TABELA 3. Efeito de quatro variedades de milho (AZ 25, AG 8690, BG7049, e DKB 230) e duas Formas de Aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) de isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242 e um mix) sobre a altura de plantas (cm) aos 30 dias após a semeadura (DAS) em casa de vegetação. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

		Altura de Plantas (cm) 30 DAS				Média F. Aplicação
F. Aplicação x Isolado		Variedades de Milho				
		AZ 25	AG 8690	BG7049	DKB 230	
B. Semente	T. Controle	52,05	47,50	49,40	49,50	47,77 a*
	RF69	48,80	47,85	49,70	43,70	
	RP103	49,05	47,10	44,55	46,50	
	RP242	51,90	46,30	45,85	46,60	
	Mix	52,10	45,40	44,10	47,50	
I. Solo	T. Controle	48,05	43,45	44,88	46,60	42,64 b
	RF69	41,48	40,60	41,55	44,95	
	RP103	44,00	41,76	42,20	40,55	
	RP242	44,35	40,40	38,38	42,00	
	Mix	41,25	42,10	43,60	40,60	
Média Variedades		47,30 A*	44,25 B	44,42 B	44,85 B	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott  $\leq 0,05$ .

A resposta de altura de plantas obtida aos 15 DAS se confirmou aos 30 DAS em relação à forma de aplicação. Nesse caso o efeito foi geral, com as médias de altura de plantas superiores na forma de aplicação bacterização de sementes. Quanto à resposta das variedades, os híbridos produziram plantas mais baixas e a variedade crioula AZ 25 foi a que obteve as plantas maiores.

Aos 15 DAS houve efeito negativo dos isolados sobre altura de plantas de milho somente na combinação híbrido AG 8690 com os isolados aplicados por inoculação do solo (Tabela 4). Assim como aos 15 DAS, observou-se efeito dos isolados bacterianos em suprimir altura e plantas aos 30 DAS em casa de vegetação. Mas diferente da primeira avaliação, nesta se verificou que o efeito foi para as médias de todos os isolados, independente da combinação dos fatores variedade x forma de aplicação.

TABELA 4. Efeito de três isolados de *Bacillus* (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103 *B. velezensis* RP242) e um mix desses isolados, aplicados via bacterização de sementes e inoculação do solo, sobre altura de plantas (cm) aos 15 e 30 dias após a semeadura (DAS) em casa de vegetação. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Altura de Plantas (cm)									
15 DAS									
Isolados	Variedades de Milho								
	AZ 25		AG 8690		BG7049		DKB 230		
	Semente	Solo	Semente	Solo	Semente	Solo	Semente	Solo	
Controle	16,20 a*	15,85 a	14,65 a	16,10 a	15,30 a	15,88 a	14,65 a	15,15 a	
RF69	16,55 a	14,60 a	14,95 a	13,55 b	17,35 a	15,50 a	12,80 a	15,30 a	
RP103	15,25 a	16,10 a	14,80 a	12,40 b	15,45 a	15,25 a	13,70 a	13,90 a	
RP242	15,70 a	15,60 a	14,55 a	13,15 b	15,55 a	15,05 a	13,30 a	15,13 a	
Mix	16,60 a	13,95 a	14,89 a	13,65 b	14,85 a	17,05 a	13,75 a	15,05 a	
30 DAS									
Isolados	Variedades de Milho								Média Isolados
	AZ 25		AG 8690		BG7049		DKB 230		
	Semente	Solo	Semente	Solo	Semente	Solo	Semente	Solo	
Controle	52,05	48,05	47,50	43,45	49,40	44,88	49,50	46,60	47,68 a*
RF69	48,80	41,48	47,85	40,60	49,70	41,55	43,70	44,95	44,83 b
RP103	49,05	44,00	47,10	41,76	44,55	42,20	46,50	40,55	44,46 b
RP242	51,90	44,35	46,30	40,40	45,85	38,38	46,60	42,00	44,47 b
Mix	52,10	41,25	45,40	42,10	44,10	43,60	47,50	40,60	44,58 b

\*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott  $\leq 0,05$ .

Avaliando altura de plantas até os 20 DAS, utilizando solo esterilizado, Einloft (2016) encontrou resultados dissimilares com esses mesmos três isolados e mix bacteriano testados no híbrido 30A77HX em casa de vegetação. Esse resultado reforça a variabilidade de resposta obtida para as diferentes variedades de milho avaliadas em ambos os trabalhos e a complexidade do efeito que um ambiente rizosférico mais similar às condições diversas de uma lavoura pode efetuar sobre uma comunidade microbiana.

Os dados de diâmetro de colmo aos 15 e 30 DAS constam na Tabela 5.

TABELA 5. Efeito de quatro variedades de milho (AZ 25, AG 8690, BG7049, e DKB 230) e duas Formas de Aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) de isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103 *B. velezensis* RP242 e um mix) sobre o diâmetro de colmo (mm) aos 15 e 30 dias após a semeadura (DAS) em casa de vegetação. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Diâmetro de Colmo (mm)						
15 DAS						
F. Aplicação x Isolado		Variedades de Milho				Média Forma de Aplicação
		AZ 25	AG 8690	BG7049	DKB 230	
B. Semente	T. Controle	10,13	9,28	10,12	8,80	9,60 a*
	RF69	10,53	10,37	10,66	7,82	
	RP103	9,51	9,84	10,43	8,21	
	RP242	9,47	9,91	10,08	8,05	
	Mix	10,51	9,97	10,04	8,28	
I. Solo	T. Controle	9,27	9,32	9,32	8,27	8,73 b
	RF69	8,96	8,89	9,18	7,85	
	RP103	9,19	8,23	9,24	7,51	
	RP242	9,36	8,63	9,14	8,16	
	Mix	8,87	8,90	9,03	7,26	
Média Variedades		9,58 A*	9,33 A	9,72 A	8,02 B	
30 DAS						
B. Semente	T. Controle	20,66	21,92	20,96	19,72	20,56 a*
	RF69	21,21	22,54	20,97	18,79	
	RP103	19,85	22,33	19,54	18,12	
	RP242	20,69	21,70	19,36	18,71	
	Mix	22,98	23,04	19,61	18,61	
I. Solo	T. Controle	19,55	23,30	18,78	19,60	19,35 b
	RF69	19,22	20,04	18,69	18,06	
	RP103	18,68	20,98	19,07	17,76	
	RP242	19,88	20,74	17,96	17,01	
	Mix	20,55	21,24	18,67	17,33	
Média Variedades		20,33 B*	21,78 A	19,36 C	18,37 D	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott  $\leq 0,05$ .

O efeito interativo da utilização de bactérias e fertilizantes no comprimento da parte aérea em estudo realizado por Marag & Suman (2018) foi significativo em todas as bactérias selecionadas, como *Lactococcus lactis*, *Klebsiella* sp., *Pantoea dispersa* e *Bacillus cereus*. Os autores observaram um aumento significativo na promoção de crescimento das plantas, inferindo que a inoculação de isolados bacterianos com 75% da adubação NPK compensou o potencial de 100% de NPK. Sugere-se então novos trabalhos objetivando avaliar o potencial dos isolados testados neste trabalho em substituir a fertilização química de diferentes nutrientes, a começar pela adubação nitrogenada, fosfatada e potássica.

Todas as 12 estirpes de *Bacillus* testadas por Akinrinlola *et al* (2018) aumentaram o crescimento do milho em comparação ao tratamento controle. O *Bacillus simplex* R180 apresentou a maior frequência de estimulação de crescimento (FEC), de 100%, ou seja, aumentou todos os parâmetros de crescimento testados nos ensaios, seguido por *B. safensis* R176 (FEC de 83%) e *B. megaterium* R181 (FEC de 78%). Esses autores verificaram também, que em três experimentos idênticos, em condições controladas de casa de vegetação, avaliando as mesmas variáveis, altura de plantas e massa fresca de parte aérea e de raiz, houve respostas diferentes aos tratamentos com *Bacillus* sp. Os autores concluíram que não houve nenhuma condição ambiental óbvia que pudesse explicar a variabilidade observada.

Os resultados obtidos neste trabalho substanciam a alegação de que os fatores que influenciam o crescimento das plantas são muito diversos e, ainda mais, quando considerada a interação entre esses fatores, as possibilidades de combinações de resultados aumentam. Assim sendo, um fator isolado em condições controladas pode não promover o mesmo resultado quando em interação com outros fatores, incluindo o efeito ambiental que é largamente mutável.

#### **4.3.1.2 Massa seca de raiz**

A análise de variância revelou que houve efeito dos fatores variedade e forma de aplicação dos tratamentos sobre o acúmulo de massa seca nas raízes de

milho. Observou-se que a resposta se manteve similar às observadas para altura e diâmetro de colmo, de modo geral (Tabela 6).

TABELA 6. Efeito de quatro variedades de milho (AZ 25, AG 8690, BG7049, e DKB 230) e duas Formas de Aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) de isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103 *B. velezensis* RP242 e um mix) sobre a massa seca de raiz (g) aos 45 dias após a semeadura (DAS) em casa de vegetação. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

		Massa Seca de Raiz (g)				
F. Aplicação x Isolado	Variedades de Milho				Média F. Aplicação	
	AZ 25	AG 8690	BG7049	DKB 230		
B. Semente	T. Controle	28,54	27,02	28,36	24,78	26,59 a*
	RF69	26,10	29,08	27,16	25,26	
	RP103	25,19	28,25	26,24	24,09	
	RP242	26,80	26,98	25,92	23,03	
	Mix	28,59	27,24	28,03	25,05	
I. Solo	T. Controle	20,94	26,72	22,70	23,67	23,14 b
	RF69	25,01	24,24	24,08	21,77	
	RP103	23,22	22,57	21,21	21,84	
	RP242	24,16	23,26	22,36	21,08	
	Mix	24,78	25,69	22,93	20,54	
Média Variedades		25,34 A*	26,10 A	24,90 A	23,11 B	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott  $\leq 0,05$ .

As melhores respostas dos tratamentos aplicados foram obtidas via bacterização de sementes, embora não se tenha observado efeito significativo dos isolados bacterianos sobre essa variável. Além disso, o híbrido DKB 230, assim como para altura e diâmetro de colmo, também foi o híbrido que obteve menor acúmulo de massa seca nas raízes de milho e as demais variedades não diferiram entre si.

Não foi encontrado efeito dos isolados de *Bacillus* sp. sobre o acúmulo de massa seca na raiz das plantas de milho. Já Marag & Suman (2018) observaram que o peso fresco da raiz foi significativamente aumentado (duplicado) por inoculações bacterianas, incluindo *Bacillus cereus*, sendo significativo ao nível de NPK 75%, uma vez que o peso fresco das raízes coincidiu com NPK 100%. Estirpes de *Bacillus circulans* e *B. cereus* aumentaram o crescimento em milho, trigo e

guandu, mas a maior resposta aos tratamentos bacterianos foi encontrada no milho, segundo Tilak & Reddy (2006). *Bacillus safensis* foi relatado por aumentar o crescimento das plantas de milho em Breedt *et al.* (2017) e Akinrinlola *et al.* (2018).

Segundo Breedt *et al.* (2017), acredita-se que as rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP) produtores de ácido indol acético (AIA) causem um aumento no crescimento das raízes, resultando, conforme explica Vessey (2003), em maior área de superfície da raiz, permitindo que a planta tenha acesso a mais nutrientes do solo. Além de AIA, os autores observaram que *Bacillus safensis* apresentou capacidade de solubilização de fosfato e fixação em N. Resultados semelhantes foram obtidos por Akinrinlola *et al.* (2018), que atribuíram a promoção do crescimento a modo de ação direto, o modo de ação mais comum, pois 10 das 12 estirpes testadas, incluindo estirpes de *B. safensis*, exibiram a atividade de promover o crescimento de milho através de solubilização de fosfato e produção de AIA. Entretanto, os autores enfatizam que sua expressão *in vitro* não é preditiva da promoção do crescimento.

Então, assumindo-se que as rizobactérias avaliadas no presente estudo sejam promotoras de crescimento, possivelmente o principal mecanismo utilizado por elas não envolva produção de AIA, fitormônio mais comumente relacionado ao crescimento radicular, conforme relatado por Akinrinlola *et al.* (2018), pois neste estudo não se observou incremento de raiz em condições de casa de vegetação. Outra forma de promover o crescimento em plantas, que Akinrinlola *et al.* (2018) classificam como promotoras de baixa eficácia, como aconteceu com *B. pumilus* em milho, parece envolver mecanismos indiretos com as estirpes exibindo antagonismo antibacteriano e antifúngico, atividade já atribuída às estirpes testadas no presente estudo por Einloft (2016), bem como combinações de atividades de sideróforos, biossurfactantes e protease.

### **4.3.2 Campo**

#### **4.3.2.1 Altura de planta**

A análise de variância revelou interação tripla para altura de plantas a nível de campo em avaliações realizadas aos 15, 45 e 60 dias após a semeadura (DAS) e na avaliação dos 30 DAS houve efeito somente da forma de aplicação para altura

de plantas. Na tabela 7 consta o efeito das formas de aplicação e da presença de TSC sobre a altura de plantas aos 15, 30, 45 e 60 DAS

TABELA 7. Efeito das formas de aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) de isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242 e um mix) e da presença de tratamento de sementes convencional (TSC) sobre a altura de plantas (cm) aos 15, 30, 45 e 60 dias após a semeadura (DAS) do híbrido de milho BG7049 em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Isolado x TSC		Altura de Plantas (cm)							
		Formas de Aplicação							
		B. Sem.				I. Solo			
		15 DAS				30 DAS			
Controle	Com	17,04 A*	a*	16,99 A	a	47,82 ns	ns	46,00	
	Sem	16,25 A	a	17,90 A	a	49,08		50,50	
RF69	Com	17,42 A	a	16,33 A	b	52,96		50,83	
	Sem	19,39 A	a	18,51 A	a	51,83		51,13	
RP103	Com	19,26 A	a	16,54 B	a	50,54		49,92	
	Sem	18,00 A	a	17,13 A	a	50,13		47,54	
RP242	Com	16,00 A	b	16,42 A	a	50,21		52,08	
	Sem	18,13 A	a	14,85 A	a	51,33		48,25	
Mix	Com	16,17 A	b	15,38 B	a	51,67		48,21	
	Sem	19,00 A	a	14,17 B	a	52,75		48,71	
Média F. Aplicação		-		-		50,83 A		49,32 B	
		45 DAS				60 DAS			
		B. Sem.	I. Solo	B. Sem.	I. Solo	B. Sem.	I. Solo	B. Sem.	I. Solo
Controle	Com	170,00 A	b	168,83 A	a	243,14 A	a	240,8 A	a
	Sem	180,88 A	a	174,83 A	a	241,42 A	a	245,74 A	a
RF69	Com	192,67 A	a	189,83 A	a	253,17 A	a	249,48 A	b
	Sem	181,56 B	b	198,67 A	a	250,08 B	a	260,42 A	a
RP103	Com	180,75 A	a	172,92 A	b	240,08 B	b	245,33 A	b
	Sem	179,67 B	a	192,00 A	a	252,85 A	a	252,33 A	a
RP242	Com	181,63 A	a	172,67 A	b	255,00 A	a	252,69 A	a
	Sem	179,64 A	a	186,92 A	a	242,56 B	b	256,44 A	a
Mix	Com	186,33 A	a	183,75 A	a	255,22 A	a	251,08 A	a
	Sem	181,32 A	a	177,42 A	a	250,79 A	a	254,92 A	a

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula nas subdivisões das colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott  $\leq 0,05$ ;

<sup>ns</sup> Não significativo.

Aos 15 dias após a semeadura (DAS) observou-se que a presença de tratamento de sementes convencional (TSC) prejudicou o crescimento das plantas utilizando RF69 em inoculação do solo e também utilizando RP242 e mix via

bacterização de sementes. Nos casos em que houve diferença significativa, a melhor forma de aplicação dos isolados foi a bacterização de sementes

Aos 30 DAS se observou efeito positivo da forma de aplicação bacterização de sementes, de forma geral, sobre as médias de altura de plantas, não havendo efeito dos demais fatores. Aos 45 DAS o tratamento de sementes convencional (TSC) conferiu menor crescimento às plantas nas combinações de RP103 e RP242 via Inoculação do Solo, o que ocorreu aos 60 DAS também, com RP103 via bacterização de sementes e inoculação do solo, e também com RF69 via inoculação do solo, denotando maior eficiência dessas bactérias na ausência de tratamento químico nas sementes.

Ao contrário do que ocorreu aos 15 e 30 DAS, aos 45 e 60 DAS, a forma de aplicação dos isolados que proporcionou incremento na altura de plantas quando houve diferença significativa foi a inoculação do solo. A bacterização de sementes parece ter sido mais eficiente com alguns isolados (RP103 e Mix) conferindo efeito imediato de crescimento, até 30 DAS. Já a inoculação do solo conferiu efeito mais tardio para os três isolados, após 45 DAS.

No período de 10 a 14 dias após a emergência, as plântulas se mantêm das reservas acumuladas nas sementes. Após as primeiras quatro a cinco semanas de desenvolvimento, quando ocorre a diferenciação do meristema apical, todas as folhas já estão diferenciadas (Rosa *et al.*, 2017), podendo esse ser o período mais oportuno para a presença de rizobactérias promotoras de crescimento no solo, com o efeito podendo ser visto posteriormente, neste caso, nas avaliações aos 45 e 60 DAS.

Assim, pode-se dizer que a bacterização de sementes de RP103 com TSC e a bacterização com todos os isolados sem TSC influenciaram o crescimento das plântulas, o que não ocorreu durante o período da diferenciação do meristema das plantas. A partir dos 45 DAS voltou a se observar efeito dos tratamentos sobre a altura de plantas. Na figura 1 é possível visualizar o efeito dos isolados de *Bacillus* sp. aos 15, 30, 45 e 60 DAS.



altura de plantas, aos 30 DAS, as condições de suprimento de nutrientes no solo podem ter sido suficientes sem a necessidade de requerer o “auxílio” da associação com os isolados de *Bacillus* sp., ou ainda algum tipo de interação das plantas com um possível patógeno de solo, como *Fusarium verticillioides*, pode ter atrasado a relação endofítica.

A partir dos 45 DAS, a interação entre plantas e rizobactérias parece ter se estabelecido até o último estágio de crescimento vegetativo, aos 60 DAS (R1). A obtenção de plantas mais altas, com mais folhas, e consequente maior área fotossinteticamente ativa resulta em maior provimento de fotoassimilados para o enchimento de grãos. A dimensão do aparato fotossintético depende do potencial genético da espécie e/ou da cultivar que, por sua vez, interage com o ambiente e com as práticas de manejo (Rosa *et al.*, 2017).

Em trabalho prévio, utilizando as mesmas estirpes de rizobactérias testadas neste estudo, Einloft (2016) observou em casa de vegetação que 10 DAS, todos os tratamentos com rizobactérias apresentaram valores aumentados de comprimento de plântula e peso de raízes. Segundo o autor, RP103 e o Mix bacteriano apresentaram os melhores resultados de crescimento de plântulas de milho 10 DAS. Aos 20 DAS, todos os tratamentos com rizobactérias apresentaram aumento no comprimento e peso das plântulas e raízes. Tais resultados indicam ausência de fitotoxicidade nas plântulas de milho até os 20 DAS.

Os resultados obtidos por Einloft (2016) sugerem uma ação mais efetiva das estirpes de *Bacillus* sp. testadas do que os resultados obtidos no presente estudo para o crescimento inicial (até 20 DAS) de plantas de milho. No entanto, é necessário considerar que no primeiro estudo foi utilizando o híbrido 30A77HX e no presente estudo se utilizou o híbrido BG7049, dois genótipos distintos que podem por si só apresentar respostas diferentes aos mesmos tratamentos. Além disso, no primeiro estudo foi utilizado solo duplamente esterilizado na condução dos testes, o que diminui bastante a variabilidade do ambiente rizosférico, já no presente estudo, o solo não foi esterilizado, simulando algo mais similar ao ambiente rizosférico natural, que é essencialmente mais competitivo.

Superada a fase inicial de crescimento do milho, antes do pendoamento, surgem as raízes adventícias junto aos nós inferiores do colmo acima do solo.

Segundo Rosa *et al.* (2017), até recentemente, supunha-se que sua única função era a de servir de suporte à planta, no entanto, pesquisas têm evidenciado que elas também podem absorver quantidades significativas de fósforo e de outros nutrientes da camada mais superficial do solo. Isto é um fator importante considerando que os resultados obtidos neste trabalho aos 45 DAS, quando já se havia observado raízes adventícias sendo formadas, alguns isolados aplicados via inoculação do solo promoveram maior crescimento das plantas.

Além disso, resultados obtidos por Marag & Suman (2018) sugerem que a fase de florescimento do milho é o estágio que mais favoreceram a colonização bacteriana, e o tecido vegetal mais propício foi o radicular. Essa pode ser outra explicação para o efeito dos isolados em promover o crescimento das plantas ter tido destaque via inoculação do solo no estágio R1, aos 60 DAS, momento em que a atividade bacteriana foi, supostamente, favorecida.

#### 4.3.2.2 Número de grãos por espiga e rendimento de grãos

Não houve influência significativa dos fatores testados sobre número de fileiras por espiga e número de grãos por fileira somente efeito do fator forma de aplicação sobre o número de grãos por espiga (Tabela 8).

TABELA 8. Efeito das formas de aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) de isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242 e um Mix) sobre o número de Grãos por Fileira, número de Fileiras por espiga, e número de grãos por espiga do híbrido de milho BG7049 em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Isolado*	Número de Grãos por fileira				
	Bacterização de Semente		Inoculação do solo		
	COM TSC	SEM TSC	COM TSC	SEM TSC	
T. Controle	38,50 <sup>ns</sup>	36,77	38,27	36,63	
<i>B. safensis</i> RF69	37,40	37,83	37,27	39,13	
<i>B. velezensis</i> RP103	36,20	37,43	39,83	39,07	
<i>B. velezensis</i> RP242	37,77	37,90	37,77	38,67	
Mix bacteriano	38,27	36,31	36,53	39,37	
Isolado*	Número de Fileiras por espiga				
	Controle	13,53 <sup>ns</sup>	14,33	13,53	14,33
	<i>B. safensis</i> RF69	13,93	13,80	14,00	14,13
	<i>B. velezensis</i> RP103	14,06	14,60	14,53	13,93
	<i>B. velezensis</i> RP242	14,00	13,93	14,36	14,13
	Mix bacteriano	14,20	14,01	14,20	14,53

continuação TABELA 8. Efeito das formas de aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) de isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242 e um Mix) sobre o número de Grãos por Fileira, número de Fileiras por espiga, e número de grãos por espiga do híbrido de milho BG7049 em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Isolado	Número de Grãos por espiga			
Controle	518,67 <sup>ns</sup>	525,07	516,20	526,07
<i>B. safensis</i> RF69	518,27	521,27	519,73	551,47
<i>B. velezensis</i> RP103	509,80	541,60	577,73	543,60
<i>B. velezensis</i> RP242	527,00	527,13	541,47	544,60
Mix bacteriano	542,80	508,11	517,20	569,73
Médias Forma de Aplicação	523,97 B*		540,78 A	

<sup>ns</sup> Não significativo; \*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott Knott  $\leq 0,05$ .

Constatou-se a inoculação do solo como a forma de aplicação dos isolados que melhor contribuiu para o incremento do número de grãos por espiga. O número de grãos por inflorescência sofre grande influência do número de plantas e inflorescências/m<sup>2</sup> e das condições ambientais, como deficiência hídrica, densidade de plantas excessiva, ocorrência de outros estresses bióticos ou abióticos no estágio de florescimento-polinização. Nesse caso, ocorre defasagem entre a liberação do pólen e a emissão de estigmas, havendo redução do número de grãos formados na espiga (Rosa *et al.*, 2017). Durante esse subperíodo, estão sendo definidos dois componentes do rendimento de grãos, ou seja, o número de grãos por inflorescência e o peso do grão. Considerando os resultados obtidos para as variáveis relacionadas a número de grãos por espiga, nota-se que a utilização ou não de tratamento convencional de sementes e a utilização de rizobactérias como promotoras de crescimento são fatores que não exerceram influência sobre o número de grãos por espiga.

Os resultados da análise de variância revelaram que o rendimento de grãos foi influenciado significativamente pelos isolados bacterianos. Todos os isolados e o mix bacteriano promoveram o aumento do rendimento de grãos do milho, sendo que esse incremento foi de 18,8% com o mix bacteriano e uma média de 13% com os isolados RF69, RP103 e RP242 em relação ao tratamento controle (Tabela 9). O peso do grão é um componente de rendimento que é influenciado diretamente pela disponibilidade de fotoassimilados, da área foliar (aparato fotossintético) e

fatores ambientais como deficiência hídrica ou nutricional, principalmente no período de polinização, crucial para a definição do número de grãos por inflorescência, até a maturação fisiológica. Isto está relacionado aos dados obtidos em altura de plantas após o pendoamento e reflete na resposta de rendimento de grãos.

TABELA 9. Rendimento de grãos de milho (kg ha<sup>-1</sup>) do híbrido BG7049 em função do tratamento com isolados de *Bacillus* sp. (*B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242 e Mix) sob duas formas de aplicação (Bacterização de Sementes e Inoculação do Solo) e duas condições de tratamento de sementes convencional (Com e Sem TSC) em experimento a campo. UFRGS – Porto Alegre, 2019.

Isolado	Bacterização de Semente		Inoculação do solo		Média dos Isolados de <i>Bacillus</i> sp.
	COM TSC	SEM TSC	COM TSC	SEM TSC	
Controle	9453	8740	9946	8210	9087 b*
<i>B. safensis</i> RF69	11104	9823	9939	10190	10264 a
<i>B. velezensis</i> RP103	10844	9600	10460	10264	10292 a
<i>B. velezensis</i> RP242	10510	10015	9881	11075	10370 a
Mix bacteriano	10109	11847	10945	10286	10796 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott  $\leq 0,05$ .

O mix dos três isolados foi o tratamento com aumento mais expressivo no rendimento de grãos em relação ao tratamento controle, mesmo não diferindo significativamente dos isolados RF69, RP103 e RP242. Segundo Silveira *et al.* (2004), a aplicação combinada de bactérias pode resultar em efeitos maiores do que os possíveis com inoculações individuais, podendo haver resposta sinérgica. Qualquer espécie de planta pode usar simultaneamente uma variedade de ações endofíticas que resultam na promoção do crescimento das plantas (Oliveira *et al.*, 2003), podendo receber, então, influência positiva de mais microrganismos ao mesmo tempo (Muhae-Ud-Din *et al.*, 2018). Interações entre plantas e microrganismos que fornecem efeitos benéficos induzem mudanças fisiológicas que não causam estresse e resultam em melhor tolerância a estresses abióticos e bióticos, e/ou maior acúmulo de matéria seca (Leite *et al.*, 2013).

Diversos autores mencionaram a dificuldade de alcançar um desempenho de campo consistente de RPCP's relacionado à heterogeneidade de fatores abióticos e bióticos e à competição com os microrganismos nativos e pode ser devido a variações em muitos fatores edáficos e do hospedeiro (Akinrinlola *et al.*,

2018; McSpadden-Gardener, 2004; Cakmakçi *et al.*, 2006; Banerjee *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2012; Breedts *et al.*, 2017). Por exemplo, Cakmakçi *et al.* (2006) relataram que a variabilidade nas respostas do crescimento das plantas à inoculação bacteriana foi em parte devido a mudanças na matéria orgânica do solo. Marag & Suman, (2018) afirmam que o genótipo de planta, estágio de crescimento e estado fisiológico, tipo de tecido vegetal, condições ambientais (solo) e práticas agrícolas influenciam a colonização e estruturas comunitárias.

Além disso, assim como concluíram Baig *et al.* (2011) em seu estudo comparando estirpes bacterianas, em sua grande maioria *Bacillus*, com mecanismos únicos ou duplos de promoção de crescimento em plantas de trigo, aquelas que possuíam mais de uma característica promotora de crescimento, como por exemplo capacidade de solubilizar fosfato e atividade ACC deaminase, propiciaram maior crescimento das plantas, em comparação com as estirpes que possuem um único mecanismo identificado.

Dado que nenhum traço fisiológico individual é preditivo da eficácia na promoção do crescimento, Akinrinlola *et al.* (2018) não recomendam o teste de características fisiológicas como o primeiro critério para selecionar promotores de crescimento de plantas eficazes e recomendam utilizar estirpes de promoção de crescimento direto em solos deficientes em nutrientes e estirpes de promoção de crescimento indireta em solos com altas populações de microrganismos deletérios. A partir disso, e dos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que uma vez tendo informações sobre a eficácia dos isolados de *Bacillus* em condições de campo, o próximo passo seria investigar os modos de ação dessas estirpes a fim de identificar se agem de forma direta ou indireta e testá-las em solos com e sem deficiência de nutrientes.

#### **4.4 Conclusões**

Não houve efeito significativamente positivo dos isolados de *Bacillus* sp. em promover o crescimento de plantas de milho até 30 DAS em casa de vegetação.

A interação entre utilização de sementes com tratamento de sementes convencional e as diferentes formas de aplicar rizobactérias promotoras de crescimento provocam respostas diferentes de altura de plantas.

A inoculação do solo com *Bacillus* sp. foi melhor em promover o crescimento em plantas oriundas de sementes sem tratamento de sementes convencional.

O isolado RP103 demonstrou melhores respostas de altura em plantas oriundas de sementes sem tratamento de sementes convencional, independente da forma de aplicação.

O isolado RP242 promoveu o crescimento de plantas de milho aplicado via inoculação do solo, e quando aplicado via bacterização de sementes provocou melhores respostas de altura de plantas em conjunto com tratamento de sementes convencional.

O isolado RF69 e o Mix bacteriano foram os tratamentos com as respostas mais constantes em promover o crescimento do híbrido de milho BG7049, independente da presença de tratamento de sementes convencional e da forma de aplicação.

Todas as rizobactérias testadas promoveram incremento de produtividade de milho, com destaque para o Mix bacteriano que aumentou em 18,8% o rendimento da cultura.

Os isolados de *Bacillus* sp. testados como promotores de crescimento neste trabalho possuem potencial para serem explorados como bioformulados.

#### 4.5 Referências

AKINRINLOLA, R. J. *et al.* Evaluation of *Bacillus* strains for plant growth promotion and predictability of efficacy by *In Vitro* physiological traits. **International Journal of Microbiology**, London, v. 56, n. 1, p. 1-11, 2018.

ARRUDA, L. *et al.* Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 15-22, 2013.

BAIG, K. *et al.* Comparative effectiveness of *Bacillus* spp. possessing either dual or single growth-promoting traits for improving phosphorus uptake, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Annals of Microbiology**, Milan, v. 62, n. 3, p. 1109-1119, 2012.

BANERJEE, M. R.; YESMIN, L.; VESSEY, J. K. Plant-growth promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. *In*: RAI, M. K. (ed.). **Handbook of microbial biofertilizers**. New York: Food Products Press, 2006. cap. 6, p. 137-181.

BAREA, J. M. *et al.* Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 56, n. 417, p. 1761-1778, 2005.

BASU, S.; RABARA, R.; NEGI, S. Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: plant growth promoting bacteria. **Plant Gene**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 43-49, 2017.

BERGAMASCHI, H. *et al.* **Clima da Estação Experimental da UFRGS e região de abrangência**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 78 p.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.

BREEDT, G.; LABUSCHAGNE, N.; COUTINHO, T. A. Seed treatment with selected plant growth-promoting rhizobacteria increases maize yield in the field. **Annals of Applied Biology**, London, v. 171, n. 2, p. 229-236, 2017.

CAKMAKÇI, R. *et al.* Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 38, n. 6, p. 1482-1487, 2006.

CAVAGLIERI, L. R. *et al.* Rhizobacteria and their potential to control *Fusarium verticillioides*: effect of maize bacterisation and inoculum density. **Antonie van Leeuwenhoek**, Louvain, v. 87, n. 3, p. 179-187, 2005.

EINLOFT, T. C. **Biocontrole de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* por *Bacillus* spp. isolados de plantas de milho**. 2016. 137 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: pacote experimental designs (Portuguese): version 1.2.0**. Wien: The R Foundation, 2018.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, London, v. 2012, [art.] 963401, [p. 1-15], 2012.

HAGHIGHI, B. J.; ALIZADEH, O.; FIROOZABADI, A. H. The role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in sustainable agriculture. **Advances in Environmental Biology**, London, v. 5, n. 10, p. 3079-3083, 2011.

JESUS, J. A. **Potencial biotecnológico de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas para o crescimento de plantas**. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2013.

KADO, C. J.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 1, p. 969-976, 1970.

LEITE, H. A. *et al.* *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 6, p. 2639-2651, 2013.

LI, J. *et al.* Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. **Journal of Zhejiang University Science**, Zhejiang, v. 10, n. 4, p. 264-272, 2009.

MARAG, P. S.; SUMAN, A. Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). **Microbiological Research**, Jena, v. 214, n. 1, p. 101-113, 2018.

MCSPADDEN-GARDENER, B. B. Ecology of *Bacillus* and *PaeniBacillus* spp. in agricultural systems. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 11, p. 1252-1258, 2004.

MUHAE-UD-DIN, G. *et al.* Consortium application of endophytic bacteria and fungi improves grain yield and physiological attributes in advanced lines of bread wheat. **Food Science and Technology**, New York, v. 6, n. 2, p. 136-144, 2018.

NOUMAVO, P. A. *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria: beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 15, n. 27, p. 1452-1463, 2016.

OCTAVIANO, C. **Muito além da tecnologia: os impactos da Revolução Verde.** **ComCiência**, Campinas, v. 120, n. 1, p. 1-3, 2010.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p.

OLIVEIRA, A. P. G. *et al.* Importância das actinobactérias em processos ecológicos, industriais e econômicos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 2014-3939, 2014.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **How a corn plant develops.** Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1993. 26 p.

ROSA, A. P. S. A.; EMYGDYO, B. M.; BISPO, N. B. (ed.). **62ª Reunião técnica anual da pesquisa do milho. 45ª Reunião técnica anual da pesquisa do sorgo: indicações técnicas para o cultivo de milho e sorgo no Rio Grande do Sul safras 2017/2018 e 2018/2019.** Brasília, DF: Embrapa, 2017. 209 p.

SBCS-NRS - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: SBCS-NRS, 2016. 376 p.

SILVEIRA, E. B. *et al.* Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 22, n. 2, p. 217-221, 2004.

SINGH, M. *et al.* Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 7, n. 315, p. 1-14, 2017.

SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.

STRECK, E. V. *et al.* **Solos do Rio Grande do Sul**. 2. ed. Porto Alegre: EMATER/RS, 2008. 222 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Hormônios vegetais e sinais. *In*: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 541-596.

TILAK, K. V. B. R.; REDDY, B. S. *Bacillus cereus* and *B. circulans*—novel inoculants for crops. **Current Science**, Bangalore, v. 90, n. 5, p. 642-644, 2006.

USDA - U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World agricultural production**. Washington, DC: USDA, 2019. 36 p. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2019.

VERMA, V. C.; SINGH, S. K.; PRAKASH, S. Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 51, n. 5, p. 550-556, 2011.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

WU, Z. *et al.* Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behaviour under simulated soil conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 39, n. 2, p. 317-327, 2012.

## 4.6 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), referente à avaliação de altura de plantas, em casa de vegetação, no estádio V3, aos 15 dias após a semeadura (DAS) em relação a forma de aplicação dos tratamentos (F. Aplicação), Variedade (Var), e Isolado bacteriano (Iso) em milho. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	4	10,043	2,511	1,177	0,323
F. Aplicação	1	0,867	0,867	0,407	0,525
Variedade	3	99,676	33,225	15,573	0
Isolado	4	17,706	4,427	2,075	0,087
F.Apl*Var	3	40,438	13,479	6,318	0,001
F.Apl*Iso	4	8,275	2,069	0,970	0,426
Var*Iso	12	19,295	1,608	0,754	0,697
F.Apl*Var*Iso	12	64,053	5,338	2,502	0,005
Resíduo	156	342,882	2,143		
Total	195	593,192			
CV					9,75%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 2. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), referente à avaliação de altura de plantas, em casa de vegetação, no estádio V6, aos 30 dias após a semeadura (DAS) em relação a forma de aplicação dos tratamentos (F. Aplicação), Variedade (Var), e Isolado bacteriano (Iso) em milho. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	4	72,753	18,188	1,452	0,219
F. Aplicação	1	1318,591	1318,591	105,295	0
Variedade	3	303,148	101,049	8,069	0
Isolado	4	309,334	77,333	6,175	0,001
F.Apl*Var	3	66,566	22,189	1,772	0,155
F.Apl*Iso	4	34,889	8,722	0,697	0,595
Var*Iso	12	143,527	11,961	0,955	0,404
F.Apl*Var*Iso	12	269,078	22,423	1,791	0,054
Resíduo	156	1853,568	12,523		
Total	195	4471,455			
CV					7,83%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 3. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), referente à avaliação de diâmetro de colmo, em casa de vegetação, no estádio V3, aos 15 dias após a semeadura (DAS) em relação a forma de aplicação dos tratamentos (F. Aplicação), Variedade (Var), e Isolado bacteriano (Iso) em milho. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	4	1,728	0,432	0,572	0,683
F. Aplicação	1	37,963	37,963	50,300	0
Variedade	3	90,912	30,304	40,152	0
Isolado	4	2,572	0,643	0,852	0,494
F.Apl*Var	3	3,669	1,223	1,621	0,187
F.Apl*Isso	4	3,820	0,955	1,265	0,286
Var*Iso	12	5,610	0,468	0,620	0,823
F.Apl*Var*Isso	12	8,407	0,701	0,928	0,520
Resíduo	156	117,736	0,755		
Total	195	272,417			
CV					9,48%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 4. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), referente à avaliação de diâmetro de colmo, em casa de vegetação, no estádio V6, aos 30 dias após a semeadura (DAS) em relação a forma de aplicação dos tratamentos (F. Aplicação), Variedade (Var), e Isolado bacteriano (Iso) em milho. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	4	5,683	1,421	0,397	0,811
F. Aplicação	1	73,151	73,151	20,439	0
Variedade	3	317,224	105,741	29,545	0
Isolado	4	33,043	8,261	2,308	0,060
F.Apl*Var	3	3,848	1,283	0,358	0,783
F.Apl*Isso	4	12,259	3,065	0,856	0,492
Var*Iso	12	46,261	3,855	1,077	0,383
F.Apl*Var*Isso	12	24,347	2,029	0,567	0,866
Resíduo	156	558,319	3,579		
Total	195	1074,134			
CV					9,48%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 5. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), referente à avaliação massa seca de raiz, em casa de vegetação, no estádio V8, 45 dias após a semeadura (DAS) em relação a forma de aplicação dos tratamentos (F. Aplicação), Variedade (Var), e Isolado bacteriano (Iso) em milho. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	4	49,078	12,269	1,708	0,151
F. Aplicação	1	593,746	593,746	82,630	0
Variedade	3	241,795	80,599	11,217	0
Isolado	4	70,297	17,574	2,446	0,051
F.Apl*Var	3	21,880	7,293	1,015	0,388
F.Apl*Isso	4	5,520	1,380	0,192	0,942
Var*Iso	12	48,140	4,012	0,558	0,873
F.Apl*Var*Isso	12	139,636	11,636	1,619	0,091
Resíduo	156	1120,949	7,186		
Total	195	2291,042			
CV					10,78%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 6. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dados referentes à avaliação de altura de planta, em experimento a campo, no estádio V3, aos 15 dias após a semeadura (DAS) em relação a presença de tratamento de sementes comercial (TSC), a forma de aplicação dos tratamentos (F. Apl), e Isolado bacteriano (Iso) do híbrido de milho BG7049. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	0,00016	0,00008	4,6724	0,0153
TSC	1	0,00004	0,00004	2,3962	0,1299
F. Aplicação	1	0,00029	0,00029	17,1475	0,0002
Isolado	4	0,00039	0,00010	5,8171	0,0009
TSC*F.Apl	1	0,00004	0,00004	2,4510	0,1257
TSC*Iso	4	0,00011	0,00003	1,6509	0,1816
F.Apl*Iso	4	0,00028	0,00007	4,1707	0,0067
TSC*F.Apl*Iso	4	0,00033	0,00008	4,8905	0,0028
Resíduo	38	0,00064	0,00002		
Total	57	0,00227			
CV					28,69%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

\*\*Dados transformados.

APÊNDICE 7. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dados referentes à avaliação de altura de planta, em experimento a campo, no estádio V6, aos 30 dias após a semeadura (DAS) em relação a presença de tratamento de sementes comercial (TSC), a forma de aplicação dos tratamentos (F. Apl), e Isolado bacteriano (Iso) do híbrido de milho BG7049. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	20,4367	10,2183	1,4572	0,2456
TSC	1	0,1550	0,1550	0,0221	0,8826
F. Aplicação	1	34,4284	34,4284	4,9096	0,0328
Isolado	4	73,1186	18,2797	2,6067	0,0508
TSC*F.Apl	1	1,2184	1,2184	0,1737	0,6792
TSC*Isso	4	38,5332	9,6333	1,3737	0,2613
F.Apl*Isso	4	22,7151	5,6788	0,8098	0,5268
TSC*F.Apl*Isso	4	29,6980	7,4245	1,0587	0,3902
Resíduo	38	266,4754	4,0125		
Total	57	486,7787			
CV					5,65%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 8. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dados referentes à avaliação de altura de planta, em experimento a campo, no estádio V10, aos 45 dias após a semeadura (DAS) em relação a presença de tratamento de sementes comercial (TSC), a forma de aplicação dos tratamentos (F. Apl), e Isolado bacteriano (Iso) do híbrido de milho BG7049. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	473,97569	236,98785	6,14	0,0049
TSC	1	168,43802	168,43802	4,364	0,0435
F. Aplicação	1	1,72382	1,72382	0,0447	0,8338
Isolado	4	1778,95438	444,73859	11,5225	0
TSC*F.Apl	1	377,35368	377,35368	9,7766	0,0034
TSC*Isso	4	501,29534	125,32384	3,2469	0,0219
F.Apl*Isso	4	239,01888	59,75472	1,5481	0,208
TSC*F.Apl*Isso	4	442,99718	110,74929	2,8693	0,0359
Resíduo	38	1466,70684	38,59755		
Total	57	5450,46382			
CV					1,56%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 9. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dados referentes à avaliação de altura de planta, em experimento a campo, aos 60 dias após a semeadura (DAS) em relação a presença de tratamento de sementes comercial (TSC), a forma de aplicação dos tratamentos (F. Apl), e Isolado bacteriano (Iso) do híbrido de milho BG7049 em estádio R1. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	38,28302	19,14151	2,0249	0,146
TSC	1	69,68193	69,68193	7,3712	0,0099
F. Aplicação	1	93,20081	93,20081	9,8591	0,0033
Isolado	4	957,81289	239,45322	25,3303	0
TSC*F.Apl	1	232,61766	232,61766	24,6072	0
TSC*Isso	4	334,62236	83,65559	8,8494	0
F.Apl*Isso	4	60,20774	15,05194	1,5923	0,1962
TSC*F.Apl*Isso	4	220,93602	55,23401	5,8429	0,0009
Resíduo	38	359,22344	9,45325		
Total	57	2366,58587			
CV					1,20%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 10. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dados referentes ao número de fileiras por espiga em relação a presença de tratamento de sementes comercial (TSC), a forma de aplicação dos tratamentos (F. Apl), e Isolado bacteriano (Iso) do híbrido de milho BG7049 em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	0,154	0,077	0,4	0,674
TSC	1	0,283	0,283	1,466	0,234
F. Aplicação	1	0,251	0,251	1,297	0,262
Isolado	4	1,168	0,292	1,512	0,218
TSC*F.Apl	1	0,039	0,039	0,2	0,657
TSC*Isso	4	1,722	0,431	2,229	0,084
F.Apl*Isso	4	0,348	0,087	0,45	0,772
TSC*F.Apl*Isso	4	1,206	0,302	1,561	0,205
Resíduo	38	7,342	0,193		
Total	57	12,513			
CV					15,85%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 11. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dados referentes ao número de grãos por fileira em relação a presença de tratamento de sementes comercial (TSC), a forma de aplicação dos tratamentos (F. Apl), e Isolado bacteriano (Iso) do híbrido de milho BG7049 em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	25,507	12,753	3,802	0,031
TSC	1	0,256	0,256	0,076	0,784
F. Aplicação	1	9,986	9,986	2,977	0,093
Isolado	4	3,154	0,789	0,235	0,917
TSC*F.Apl	1	3,890	3,890	1,160	0,288
TSC*Isso	4	13,749	3,437	1,025	0,407
F.Apl*Isso	4	13,698	3,425	1,021	0,409
TSC*F.Apl*Isso	4	18,326	4,581	1,366	0,264
Resíduo	38	127,478	3,355		
Total	57	216,045			
CV					5,91%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 12. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dados referentes ao número de grãos por espiga em relação a presença de tratamento de sementes comercial (TSC), a forma de aplicação dos tratamentos (F. Apl), e Isolado bacteriano (Iso) do híbrido de milho BG7049 em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	2976,573	1488,287	1,698	0,197
TSC	1	730,341	730,341	0,833	0,367
F. Aplicação	1	4238,081	4238,081	4,836	0,034
Isolado	4	3223,259	805,815	0,92	0,463
TSC*F.Apl	1	478,649	478,649	0,546	0,464
TSC*Isso	4	623,821	155,955	0,178	0,948
F.Apl*Isso	4	1921,623	480,406	0,548	0,701
TSC*F.Apl*Isso	4	9122,508	2280,627	2,603	0,051
Resíduo	38	33300,01	876,316		
Total	57	56614,86			
CV					0,59%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 13. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dados referentes à rendimento de grãos em relação a presença de tratamento de sementes comercial (TSC), a forma de aplicação dos tratamentos (F. Apl), e Isolado bacteriano (Iso) do híbrido de milho BG7049 em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	4744333,300	2372166,667	1,391	0,261
TSC	1	1134375,000	1134375,000	0,665	0,420
F. Aplicação	1	570375,000	570375,000	0,334	0,567
Isolado	4	28460250,000	7115062,500	4,171	<0,01
TSC*F.Apl	1	495041,700	495041,667	0,290	0,593
TSC*Isso	4	2146250,000	536562,500	0,315	0,867
F.Apl*Isso	4	2136916,700	534229,167	0,313	0,867
TSC*F.Apl*Isso	4	16248916,700	4062229,167	2,381	0,069
Resíduo	38	64829000,000	1706026,316		
Total	57	120765458,300			
CV					0,01%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

## **5 Capítulo 3**

***Bacillus* sp. no controle de fungos toxigênicos em milho**

## RESUMO

Dentre os fatores que acarretam perdas quantitativas e qualitativas na produção de grãos está a contaminação fúngica. Fungos dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, que podem causar a morte de sementes, tombamento de plântulas, reduzindo a população de plantas por unidade de área, são caracterizados como as espécies de maior importância em armazenamento de grãos. Isto porque, além de causarem perda de qualidade dos grãos, resultam em contaminação com micotoxinas, que podem causar graves danos à saúde humana e animal, inclusive com elevado potencial carcinogênico. Considerando esses fatores, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de isolados de *Bacillus* sp. em três formas de aplicação sobre o controle de fungos toxigênicos em grãos de milho. Foi conduzido um experimento à nível de lavoura, com delineamento de blocos casualizados, com 30 tratamentos e 3 repetições, perfazendo 90 unidades experimentais. Os tratamentos foram constituídos por três fatores. O primeiro fator foi Tratamento de Sementes Convencional (TSC), com fungicida e inseticida, em dois níveis: com e sem. O segundo fator foi a forma de aplicação, com três níveis: bacterização de sementes, inoculação do solo e pulverização de planta. O terceiro fator foi agente de biocontrole e teve cinco níveis: *B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242, Mix bacteriano (mistura dos três isolados), e tratamento controle (sem bactéria). O híbrido de milho utilizado neste trabalho foi BG 7049. Observou-se que os efeitos dos agentes de biocontrole sobre a incidência dos fungos avaliados variou para cada um e são dependentes da forma de aplicação. A redução da incidência de *Fusarium* sp. teve como destaque os agentes de biocontrole RP103 e RP 242 por bacterização de sementes. A redução da incidência de *Penicillium* spp. se sobressaiu com o agente RF69, com TSC e sendo aplicado através de pulverização de plantas. A redução da incidência de *Aspergillus* sp. foi evidenciada com os agentes RF69 e RP103 via inoculação do solo. O tratamento de sementes convencional não influenciou a incidência de *Fusarium* spp. e *Aspergillus* sp. Conclui-se que os isolados testados possuem potencial como agentes de biocontrole em milho diminuindo a incidência fúngica nos grãos.

## 5.1 Introdução

Dentre os fatores que acarretam perdas quantitativas e qualitativas na produção de grãos está a contaminação fúngica. Nas plantas, os fungos como agentes patogênicos que são, ocasionam doenças. Como exemplo, algumas espécies de *Fusarium* e *Penicillium*, que podem causar a morte de sementes e tombamento de plântulas, reduzindo a população de plantas por unidade de área (Amorim *et al.*, 2011). A atividade fúngica pode também causar efeitos indesejáveis nos grãos, incluindo descoloração, aquecimento da massa de grãos, perdas no valor nutricional, odores desagradáveis, perdas na germinação nas sementes, qualidade do cozimento e moagem, além de resultar em contaminação com micotoxinas (Magan *et al.*, 2003).

A infecção fúngica e posterior desenvolvimento de doenças nas culturas são geralmente controladas ao optar-se por cultivares resistentes, utilizando boas práticas agrícolas e por fim, controle químico pela aplicação de fungicidas químicos. Essa última prática, quando realizada de forma incorreta pode levar à resistência dos patógenos aos fungicidas, na maioria dos casos, representa riscos toxicológicos para o meio ambiente e contaminação residual de alimentos (Silva, Cota e Costa, 2015). Não obstante, mesmo sendo eficaz no controle de fungos, alguns fungicidas químicos podem não ser o suficiente para reduzir ou até mesmo estimular a produção de micotoxinas, aumentando o teor nos grãos (Magan *et al.*, 2002; Falcão *et al.* 2011; Rensburg *et al.*, 2016).

Dentre as formas alternativas de mitigar esse problema, encontra-se o controle biológico. Microrganismos benéficos, como agentes de biocontrole, vem sendo utilizados como alternativa no aumento da produtividade de plantas e na melhora do seu estado fitossanitário, isto, vem sendo um dos principais objetivos da pesquisa agrícola (Carrer Filho *et al.*, 2009). Dentre os microrganismos que apresentam potencial para esse fim estão os microrganismos endofíticos, muito associados à sanidade da planta hospedeira, aumentando a tolerância a estresse, resistência a ataques de pragas, produção de metabólitos antimicrobianos e fitohormônios (Verma *et al.*, 2011), como é o caso de espécies do gênero *Bacillus*. Este gênero está presente em grande número de espécies nativas no solo e possui excelente potencial como agente de biocontrole. Possui adaptabilidade ao solo e

ao ambiente rizosférico, o que confere, a esses microrganismos alta capacidade de sobrevivência e competição, inclusive sob condições adversas.

As estratégias de biocontrole envolvem a utilização de organismos antagonistas e pode ser de natureza direta ou indireta. O antagonismo direto sobre os fitopatógenos diz respeito aos mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes, secreção de enzimas líticas, alteração de pH e a síntese de compostos voláteis. Já o mecanismo indireto é exercido pelo fenômeno de resistência sistêmica induzida (Ongena *et al.*, 2007; Barra *et al.*, 2009; Carvalho, 2012; Cardoso & Andreote, 2016).

Assim, os benefícios da utilização de antagonistas prevalecem sobre a capacidade de reduzir o inóculo de fungos de armazenagem ou contaminação com micotoxinas. Pelo fato de praticamente não serem tóxicos para organismos não-alvo, os agentes de biocontrole são amplamente aceitos. Este novo nicho econômico está influenciando os agricultores a incluírem o controle biológico como alternativa ao controle químico. Por isso, há expectativa de que ocorra aumento da participação de bioformulados nas vendas de químicos agrícolas em breve (Medeiros *et al.*, 2012).

Segundo Figueroa-López (2016), em seu trabalho de revisão bibliográfica sobre pesquisas envolvendo biocontrole de fungos, concluiu que os principais gêneros bacterianos que exibiram efeito antagonista a *Fusarium verticillioides* têm no topo de sua lista o gênero *Bacillus*, com cerca de 341 isolados até aquela data. A bacterização das sementes é uma técnica de aplicação amplamente utilizada nos estudos de controle biológico e promoção do crescimento das plantas, mas é possível que outros métodos, como a incorporação e inoculação de solos ou mudas, também possam ser efetivos (Pereira *et al.*, 2009). Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de espécies de *Bacillus* sp. em três formas de aplicação, sendo elas a bacterização em sementes, a inoculação do solo e a pulverização das plantas de milho no florescimento, sobre o controle de fungos toxigênicos em grãos de milho.

## 5.2 Material e Métodos

Foi conduzido um experimento à nível de lavoura, na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A região geoclimática é denominada Depressão Central do estado do Rio Grande do Sul. O clima da região é subtropical de verão úmido quente, do tipo Cfa, conforme a classificação de Koeppen (Bergamaschi *et al.*, 2013). O solo da área experimental é caracterizado como Argissolo Vermelho Distrófico típico (Streck *et al.*, 2008), pertencente à unidade de mapeamento São Jerônimo.

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com 30 tratamentos e 3 repetições perfazendo 90 unidades experimentais. Os tratamentos foram constituídos por três fatores. O primeiro fator foi Tratamento de Sementes Convencional (TSC), com fungicida e inseticida, em dois níveis: com e sem. O segundo fator foi a forma de aplicação, com três níveis: bacterização de sementes, inoculação do solo e pulverização de planta. O terceiro fator foi agente de biocontrole e teve cinco níveis: *B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242, Mix bacteriano (mistura dos três isolados), e tratamento controle (sem bactéria).

Cada tratamento foi submetido a três repetições, sendo cada repetição constituída por uma parcela. A unidade experimental consistiu em seis linhas de semeadura com 5 m de comprimento e 2,25 m de largura, totalizando 11,25 m<sup>2</sup> foi considerada a área útil de 4,05 m<sup>2</sup>, com espaçamento entre linhas de 0,45 m, totalizando uma população de plantas de 70.000 plantas.ha<sup>-1</sup>. A semeadura foi realizada de forma manual, com posterior desbaste para adequação da densidade populacional. O híbrido de milho utilizado neste estudo foi o BG 7049.

Foi realizada adubação de base com adubo NPK 10 - 20 - 20 e adubação de cobertura no estágio V5, com ureia e KCl. Em V8, adubação de cobertura somente com ureia. Quantidades aplicadas conforme resultado de análise do solo, calculando a dose para expectativa de produtividade de 12.000 kg ha<sup>-1</sup> (Rosa *et al.*, 2017). Para o controle de plantas daninhas, antes da semeadura foi realizado primeiramente o controle mecânico, por capina, de plantas daninhas de maior porte, assim como controle químico, realizando a dessecação com herbicida. Após a

semeadura houve mais duas realizações de controle mecânico, conforme identificação de plantas infestantes, até o estádio V12.

Para o controle de insetos praga identificados, foram realizadas duas aplicações de inseticidas nos estádios V3 e V8, utilizando Cropstar® e Engeo Pleno®, respectivamente. O experimento foi conduzido com a presença de irrigação por aspersão, mantendo uma média de 200 mm por semana, dividida em duas aplicações semanais, conforme a precipitação pluviométrica no local. A colheita foi realizada manualmente, coletando-se a área útil de cada unidade experimental. As espigas foram trilhadas e da massa de grãos de cada parcela foi realizada amostragem para a avaliação da incidência de fungos nos grãos através do teste de sanidade.

### **5.2.1 Preparação dos inóculos**

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) por 24 horas e as concentrações celulares ajustadas em  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> por diluições seriadas. A suspensão do mix bacteriano foi formada pela mistura das três suspensões bacterianas ajustadas. O fungo *Fusarium verticillioides* foi cultivado em BDA por 7 dias a 25 °C, e as colônias lavadas em 10 mL de água peptonada (0.1%) para criar as suspensões de esporos, essas mensuradas em câmara de Neubauer e ajustadas em  $10^6$  esporos mL<sup>-1</sup> por diluições seriadas e 20 mL das suspensões conidiais foram inoculadas por linha, no dia anterior a semeadura (Bluma & Etcheverry 2006).

### **5.2.2 Aplicação dos tratamentos**

A bacterização das sementes foi conduzida como proposto por Cavaglieri *et al.* (2005) com algumas modificações. Para cada tratamento foram utilizadas 360 sementes de milho que foram submersas em 360 mL de inóculo bacteriano dentro de frascos de Erlenmeyer de 500 mL. Para o tratamento controle, as sementes foram submersas em 360 mL de água. Os tratamentos foram incubados por 2 horas em agitador rotativo a 120 rpm em 28 °C, para bacterização das sementes. Após o tratamento, o excesso de meio foi removido e as sementes dispostas sobre camada

dupla de papel toalha, dentro de bandejas de polipropileno, até a semeadura, no dia seguinte.

A aplicação das soluções com os inóculos bacterianos no solo foi realizada aplicando o produto diluído em água na forma de jato dirigido no solo através de pulverizador manual pressurizado, de forma que o produto atingisse toda superfície da linha de semeadura, utilizando o volume de calda de 20 mL por linha.

Para aplicação dos tratamentos nas plantas, as soluções com inóculo bacterianos foram pulverizadas quando as plantas atingiram o estágio R1 - florescimento (Ritchie *et al.*, 1993). Foi utilizado pulverizador costal dotado com bico de jato cônico vazio da série D e volume de calda de 1.000 L ha<sup>-1</sup>, ou, 1,25 L por unidade experimental.

### **5.2.3 Avaliações**

#### **5.2.3.1 Teste de sanidade**

Através do *Blotter test* (Brasil, 2009), assim como nas regras para análise de sementes, foi avaliada a qualidade sanitária dos grãos de milho. Foram utilizados 200 grãos para cada tratamento, em 8 repetições, sendo cada repetição composta por uma caixa Gerbox, na qual foram dispostos 25 grãos, individualmente, sobre camada dupla de papel Germitest® umedecido em três vezes o seu peso. As caixas com os grãos foram dispostas sob lâmpadas de luz fluorescente branca em câmara incubadora BOD, em regime intermitente de 12 h de luz e 12 h de escuro pelo período de 7 dias em temperatura de 24 °C.

Após o período de incubação as sementes foram examinadas individualmente, identificando-se morfológicamente os fungos presentes em cada grão com auxílio de lupa estereoscópica. Os resultados foram expressos em percentual de ocorrência dos fungos.

#### **5.2.4 Análise estatística**

Após a compilação dos resultados, os dados foram submetidos a análises estatísticas, sendo analisados inicialmente a normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett ( $p \leq 0,05$ ). Posteriormente, os dados médios de incidência de cada fungo foram

submetidos à análise de variância pelo teste F. Quando a interação dos fatores se mostrou significativa ( $p \leq 0,05$ ) ou houve efeito significativo de algum dos fatores, a análise foi complementada pelo teste de comparação de médias de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o pacote ExpDes do software R (Ferreira *et al.*, 2018).

### 5.3 Resultados e Discussão

Verificou-se na análise de variância as interações entre os fatores testados para a incidência dos três fungos avaliados. Não houve interação entre os fatores testados para incidência de *Fusarium* sp. nos grãos de milho. Observou-se efeito significativo dos fatores Forma de Aplicação e Agente de biocontrole sobre esta variável.

Quanto à incidência de *Penicillium* sp., percebe-se que houve interação tripla entre os fatores Tratamento de Sementes Convencional (TSC), Forma de aplicação e Agente de biocontrole, com efeito significativo também dos fatores isoladamente.

A incidência do fungo *Aspergillus* sp. nos grãos de milho foi influenciada significativamente pelas Formas de aplicação, pelos Agentes de biocontrole e, além disso, pela interação entre esses dois fatores e a utilização de TSC, ou seja, uma interação tripla. O fator TSC não contribuiu com efeito isolado para a incidência do fungo, somente em interação com os demais fatores combinados.

#### 5.3.1 *Fusarium* sp.

É possível observar na Tabela 1 o efeito dos agentes de biocontrole e da forma de aplicação desses agentes de biocontrole sobre a incidência de *Fusarium* sp. Verificou-se que todas as bactérias reduziram sua incidência em detrimento ao tratamento controle. Além disso, a forma de aplicação desses agentes de biocontrole que melhor conduziu a essa resposta foi a bacterização de sementes.

As melhores respostas foram obtidas pelas bactérias *Bacillus velezensis* RP103 e *B. velezensis* RP242, que reduziram em média aproximadamente 20% a incidência de *Fusarium* sp. em grãos de milho (Tabela 1), independente da utilização de sementes com tratamento químico industrial, ou seja, a utilização de fungicida e inseticida no tratamento de semente não influenciou a incidência do fungo nem suprimiu o efeito das bactérias.

TABELA 1. Efeito de Agentes de biocontrole (Tratamento controle, *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e Mix bacteriano) e Formas de Aplicação desses agentes (Bacterização de sementes, Inoculação do Solo e Pulverização de Plantas) sobre os dados médios de porcentagem de incidência de *Fusarium* sp. em grãos de milho do híbrido BG 7049. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Forma de Aplicação x TSC		<i>Fusarium</i> sp. (%)					Médias Forma de Aplicação
		Controle	Agente de Biocontrole RF69	RP103	RP242	Mix	
B. Sementes	Com TSC	76	69	58	60	66	66 b**
	Sem TSC	78	64	65	60	69	
I. Solo	Com TSC	87	75	71	62	64	70 a
	Sem TSC	88	69	62	73	70	
P. Planta	Com TSC	86	74	66	67	71	72 a
	Sem TSC	89	70	64	67	68	
<b>Médias Agente de biocontrole</b>		84 A**	70 B	62 C	64 C	67 B	

\*\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias de Scott Knott ( $p \leq 0,01$ ).

A bacterização de sementes foi a forma de aplicação das bactérias que, em média, melhor atingiu o objetivo de diminuir a contaminação de grãos de milho por *Fusarium* sp. Esse resultado corrobora com diversos estudos de casa de vegetação e campo que avaliaram efeito positivo da bacterização de sementes sobre a redução da incidência de espécies do gênero *Fusarium* e contaminação por fumonisinas em plantas de milho (Pereira *et al.*, 2007; Czembor *et al.* 2015; Leyva-Madrugal *et al.*, 2015; Souza *et al.* 2015; Figueroa-López, 2016). A redução significativa da sobrevivência de fungos em função da adição de agentes dos biocontrole *B. safensis* RF69, *B. velezensis* RP103, *B. velezensis* RP242 e Mix bacteriano foi observada por Einloft (2016), onde o autor avaliou contagem de fungos nos tecidos das raízes das mudas de milho após 10 e 20 dias de cultivo.

Com *Azobacter armeniacus* RC2 a  $10^6$  e  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, Cavaglieri *et al.* (2004) encontraram resultado de inibição total da contagem de *F. verticillioides* em raízes de milho. Os tratamentos com *Bacillus amyloliquefaciens* e *Microbacterium oleovorans* a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> diminuíram a contagem de *F. verticillioides* em grãos de milho, *B. amyloliquefaciens* reduziu significativamente os níveis de FB1 e FB2, e *M. oleovorans* reduziu significativamente os níveis de FB2 (Pereira *et al.*, 2007). Em trabalho semelhante, utilizando concentração de  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> Pereira *et al.* (2009) concluíram que a bacterização das sementes foi um método eficaz para

diminuir a colonização de milho pelo fitopatógeno *F. verticillioides* em casa de vegetação.

Avaliando a bacterização de sementes de milho com estirpes de *Bacillus subtilis*, Ugoji e Laing (2008) verificaram que algumas delas foram eficazes em colonizar as raízes das plantas e controlar fungos e diminuir sintomas de doenças provocadas por *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, que causa tombamento de plântulas, e *Pythium* sp., que causou tombamento pré e pós emergência em sementes não tratadas com *B. subtilis*.

Em trabalho realizado com bacterização de sementes, Lizárraga-Sánchez *et al.* (2015) sugerem que a incorporação do *Bacillus cereus* 25 às práticas integradas de manejo, pode ser uma ferramenta eficaz na luta contra o *Fusarium verticillioides* no milho, contribuindo para controle das doenças provocadas por esse patógeno, bem como para diminuir a níveis seguros a fumonisina nos grãos.

O fato de o TSC não influenciar os resultados é uma questão bem importante, considerando que o tratamento de sementes com fungicida e inseticida é uma das principais estratégias de manejo de pragas e doenças na agricultura. O tratamento de sementes é uma prática que visa favorecer o bom desempenho das sementes em campo. Trata-se de uma estratégia fundamental para controlar doenças pelo seu baixo custo, alta eficácia, maior simplicidade, menor uso de agrotóxicos em relação aos volumes gastos para o controle da mesma doença via aplicação foliar em áreas extensas (Machado, 2000).

### **5.3.2 *Penicillium* spp.**

Os resultados apresentados na Tabela 2, explorando o efeito do TSC nas combinações Agentes de biocontrole e Formas de aplicação, observa-se que para as combinações Bacterização de sementes x bactéria RP242, Inoculação do solo x RF69, e Pulverização da planta x RF69, o TSC reduziu a incidência de *Penicillium* spp, quando comparadas com as sementes sem TSC. Em contrapartida, a combinação Bacterização de sementes x Mix bacteriano não beneficiou os grãos para esta variável.

TABELA 2. Efeito de TSC (Com e Sem) e Formas de Aplicação (Bacterização de sementes, Inoculação do Solo e Pulverização de Plantas) de agentes de biocontrole (Tratamento controle, *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e Mix bacteriano) sobre os dados médios de porcentagem de incidência de *Penicillium* spp. em grãos de milho do híbrido BG 7049. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

TSC x Agente de biocontrole		<i>Penicillium</i> spp. (%)					
		B. Semente		I. Solo		P.Planta	
Com TSC	T. Controle	90,0 A**	a**	89,8 A	a	88,9 A	a
Sem TSC		87,3 A	a	88,2 A	a	90,2 A	a
Com TSC	RF69	78,9 A	a	69,78 B	b	63,3 B	b
Sem TSC		86,7 A	a	89,1 A	a	92,0 A	a
Com TSC	RP103	74,4 B	a	89,6 A	a	87,3 A	a
Sem TSC		75,8 B	a	88,7 A	a	92,4 A	a
Com TSC	RP242	65,3 B	b	83,1 A	a	86,1 A	a
Sem TSC		86,7 A	a	86,4 A	a	90,0 A	a
Com TSC	Mix	87,8 A	a	86,0 A	a	90,0 A	a
Sem TSC		76,7 B	b	80,2 B	a	88,9 A	a

\*\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula em cada subdivisão da coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias de Scott Knott ( $p \leq 0,01$ )

Avaliando o efeito das formas de aplicação, combinando os fatores TSC e Agentes de biocontrole, nota-se que para o material oriundo de sementes com TSC a resposta varia para as bactérias RF69, RP103 e RP242, onde as melhores formas de aplicação para estas foram: inoculação do solo e pulverização das plantas para RF69, e bacterização das sementes para RP103 e RP242. Para a combinação Sem TSC x agentes de biocontrole, observou-se que para RP103 a bacterização de sementes também se mostrou mais eficiente em reduzir a incidência de *Penicillium* spp. e o Mix bacteriano sem TSC respondeu melhor sob bacterização de sementes e inoculação do solo. Para as demais combinações entre agentes de biocontrole, com e sem TSC, as médias de incidência não diferiram do tratamento controle.

Desdobrando os Agentes de biocontrole dentro das combinações de TSC e formas de aplicação (Figura 1) verifica-se que para a combinação Com TSC x bacterização de sementes, somente o Mix bacteriano não diferiu do tratamento controle, com redução na incidência de *Penicillium* spp. para RP242. Na combinação Com TSC x pulverização das plantas e Com TSC x inoculação do solo, as bactérias RP103, RP242 e o Mix não diferiram da testemunha, somente a RF69

reduziu *Penicillium* spp. através da inoculação do solo e pulverização das plantas, com TSC.

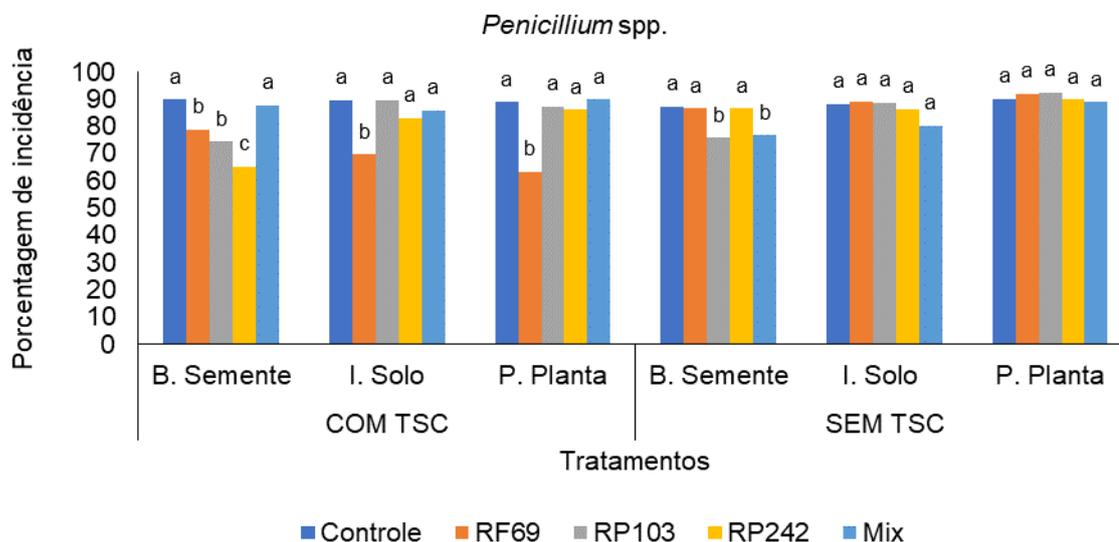


FIGURA 1. Efeito de Agentes de biocontrole (*Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e Mix bacteriano) sobre dados médios de porcentagem de incidência de *Penicillium* spp. em grãos de milho do híbrido BG 7049 obtidos em experimento a campo testando a utilização de Tratamento de Sementes Convencional (TSC) em interação com Agentes de biocontrole e Formas de Aplicação desses agentes (Bacterização de sementes, Inoculação do Solo e Pulverização de Plantas). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

No caso dos grãos oriundos de sementes sem TSC houve efeito dos agentes de biocontrole somente quando aplicados em bacterização de sementes, em que a bactéria RP103 e o Mix bacteriano reduziram o fungo *Penicillium* spp. Os demais agentes de biocontrole não diferiram do controle. Quando aplicados via inoculação do solo e pulverização da planta, sem TSC, os agentes de biocontrole não conferiram resposta de redução de incidência de *Penicillium* spp. em relação ao controle.

O isolado RF69, sob todos as formas de aplicação, com TSC, demonstrou efeito de inibição de *Penicillium* spp. Foi a bactéria que mais diminuiu a incidência do fungo, reduzindo aproximadamente 30% quando aplicada via pulverização das plantas e 20% quando aplicada via inoculação do solo. O isolado RP103, com e sem TSC, aplicado via bacterização de sementes também suprimiu a incidência de *Penicillium* spp. O isolado RP242 com TSC, e o Mix bacteriano sem TSC, também via bacterização de sementes, diminuíram a incidência de *Penicillium* spp.

O TSC foi uma boa combinação com todos os isolados, em especial aplicados via bacterização de sementes, para reduzir o fungo nos grãos. No entanto, a utilização de fungicida por si só não respondeu de forma satisfatória, como é possível observar no tratamento controle com TSC, que não diferiu do tratamento controle sem TSC. A bacterização de sementes sem TSC demonstrou ser a melhor opção de biocontrole, utilizando RP103 e o Mix bacteriano. O TSC, apesar de ter combinado bem com as bactérias isoladamente,

O fato do melhor efeito de supressão de *Penicillium* spp. ter sido via bacterização de sementes pode ser um indício de um efeito de resistência sistêmica das plantas sob o tratamento com as bactérias, uma vez que esse fungo não tem a capacidade que *Fusarium* tem de colonizar endofiticamente a planta, incidindo na semente e/ou rizosfera e colonizar os grãos a partir daí. A infecção e colonização dos grãos por *Penicillium* pode ocorrer pela estrutura reprodutiva das plantas em condições de umidade e temperatura adequadas ao fungo e/ou após a colheita (Pereira *et al.*, 2005). É necessário investigar o potencial desses agentes de biocontrole em induzir a defesa vegetal, principalmente em combinações de formas de aplicação.

A aplicação dos agentes de biocontrole sem TSC poderia ser justificável caso a redução de incidência resultasse em garantia da diminuição de contaminação por micotoxinas produzidas por *Penicillium* spp. O que se recomenda para diminuir a incidência desse fungo em grãos geralmente envolve não exceder o tempo da época de colheita, sendo o ideal próximo a maturação fisiológica, logo que o teor de umidade dos grãos permitir, geralmente próximo de 20% de umidade, e armazená-los com teores de água adequados, realizando uma adequada secagem, encurtando o período entre a colheita e o armazenamento (Henning *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2009).

### **5.3.3 *Aspergillus* sp.**

Em função da interação tripla, o desdobramento de cada um dos fatores testados dentro da combinação dos outros dois para incidência de *Aspergillus* sp. é apresentada a seguir. Percebe-se que para as combinações Bacterização de sementes x RP103, Inoculação do Solo x RP242 e Mix bacteriano, Pulverização da

Planta x RF69, o TSC não foi capaz de reduzir a incidência de *Aspergillus* sp., pelo contrário, sua incidência aumentou. No entanto, o TSC parece ter exercido papel importante na redução da incidência de *Aspergillus* sp. nas combinações de Bacterização de sementes x RP242 e Pulverização da Planta x Mix bacteriano (Tabela 3).

TABELA 3. Efeito de TSC (Com e Sem) e Formas de Aplicação (Bacterização de sementes, Inoculação do Solo e Pulverização de Plantas) de agentes de biocontrole (Tratamento controle, *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e Mix bacteriano) sobre os dados médios de porcentagem de incidência de *Aspergillus* sp. em grãos de milho do híbrido BG 7049. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

TSC x Agente de biocontrole		<i>Aspergillus</i> sp.					
		Formas de Aplicação					
		B. Semente	I. Solo	P. Planta			
Com TSC	T. Controle	18,9 A**	a*	20,9 A	a	19,8 A	a
Sem TSC		20,7 A	a	19,1 A	a	21,1 A	a
Com TSC	RF69	16,9 B	a	9,8 C	a	20,4 A	a
Sem TSC		16,9 A	a	11,6 B	a	17,3 A	b
Com TSC	RP103	20,2 A	a	12,9 B	a	20,4 A	a
Sem TSC		16,9 B	b	12,2 C	a	20,7 A	a
Com TSC	RP242	16,9 B	b	21,1 A	a	13,6 C	a
Sem TSC		20,2 A	a	17,1 B	b	16,2 B	a
Com TSC	Mix	15,3 B	a	19,6 A	a	15,1 B	b
Sem TSC		13,6 C	a	16,7 B	b	19,8 A	a

\*,\*\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ( $p < 0,01$ ) e mesma letra minúscula em cada subdivisão da coluna ( $p < 0,05$ ) não diferem entre si pelo teste de comparação de médias de Scott Knott.

O efeito da forma de aplicação dos agentes de biocontrole também diferiu para as combinações de TSC x Agentes de biocontrole. A inoculação de solo foi mais eficiente com as bactérias RF69 e RP103, com e sem TSC. A aplicação via pulverização das plantas teve resultados mais expressivos de redução de incidência de *Aspergillus* sp. com RP242 e Mix bacteriano, com TSC.

Avaliando o efeito dos agentes de biocontrole dentro de cada combinação de Forma de aplicação x TSC (Figura 2), verifica-se que as bactérias RF69 e RP103 em inoculação do solo x com e sem TSC reduziram a incidência de *Aspergillus* sp. Ao passo que para pulverização das plantas o efeito de redução da incidência de fungo foi promovido pela bactéria RP242 e Mix bacteriano com TSC, e RF69 e RP242, sem TSC. A bactéria RF69 e o Mix bacteriano também se destacaram na

bacterização de sementes, com e sem TSC. Na bacterização de sementes, o maior destaque foi o Mix bacteriano sem TSC, com resultados positivos também com RF69 e RP103.

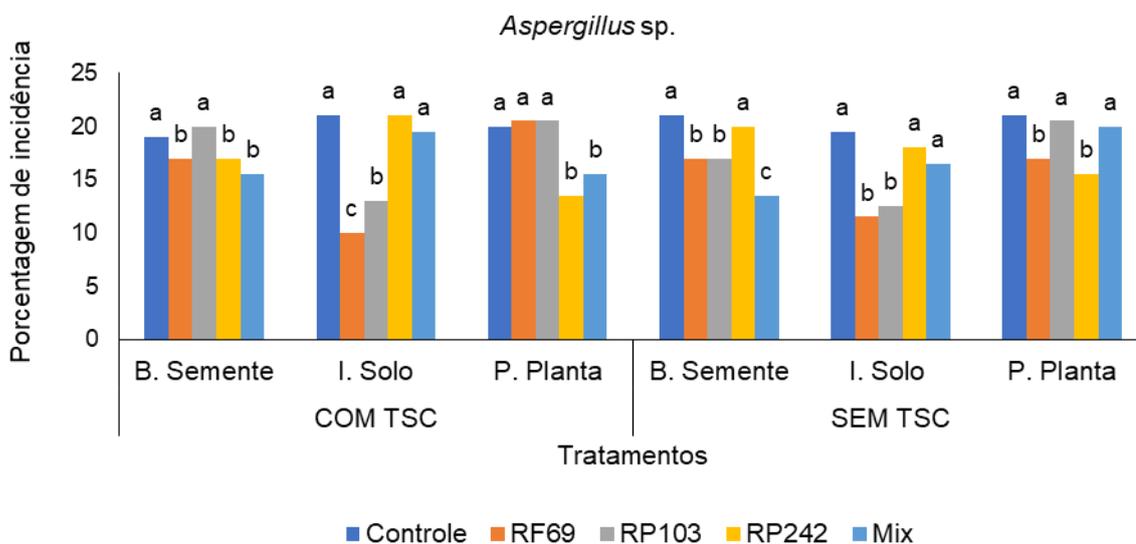


FIGURA 2. Efeito de Agentes de biocontrole (*Bacillus safensis* RF69, *Bacillus velezensis* RP103, *Bacillus velezensis* RP242 e Mix bacteriano) sobre dados médios de porcentagem de incidência de *Aspergillus sp.* em grãos de milho do híbrido BG 7049 obtidos em experimento a campo testando a utilização de Tratamento de Sementes Convencional (TSC) em interação com Agentes de biocontrole e Formas de Aplicação desses agentes (Bacterização de sementes, Inoculação do Solo e Pulverização de Plantas). UFRGS - Porto Alegre, 2019.

Einloft (2016) observou produção de Iturina A pelos isolados RP103 e RP242 quando em contato com *Aspergillus flavus* caracterizando esse metabólito como um dos responsáveis pela atividade antifúngica. Outro resultado obtido por Einloft (2016) envolve dois padrões de dominância na interação entre as bactérias e *A. flavus* sob um conjunto diferente de mudanças ambientais. O primeiro padrão foi a inibição fúngica na distância (5/0) como uma interação predominante entre RP103 x *A. flavus* e RP242 x *A. flavus*, onde a bactéria manteve seu status de dominância após as mudanças ambientais. O segundo padrão foi a diminuição da dominância do RF69 em direção a *A. flavus* quando do aumento de temperatura e redução de atividade de água.

As interações interespecíficas entre espécies microbianas podem ocorrer, e o resultado depende das condições ambientais predominantes. Por exemplo, um Índice de Dominância pode comparar a capacidade competitiva de espécies

microbianas de dominar sob um conjunto particular de condições ambientais (Nesci *et al.*, 2005). Isso caracteriza a relação dos patógenos com as bactérias e com outros fungos também. Um pode se sobressair em relação ao outro, a depender das condições ambientais favoráveis. Então, uma variável a ser considerada em trabalhos futuros é o índice de dominância entre os microrganismos em questão.

As respostas de incidência de *Aspergillus* sp. tiveram efeitos diferentes do fator TSC, tanto a presença como a ausência de TSC em alguma combinação, com os demais fatores, prejudicou a qualidade sanitária dos grãos. O processo de infecção do fungo *Aspergillus* geralmente se dá via estrutura reprodutiva em condições de elevada umidade, assim, é esperado que o tratamento de sementes com fungicida não seja a principal forma de controle.

Todos os isolados bacterianos utilizados neste trabalho já demonstraram capacidade de reduzir as contagens de fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* quando aplicados diretamente em grãos de milho num intervalo entre 19% (RF69) e 47% (RP103). Além disso, níveis detectáveis de AFB1 foram também significativamente reduzidos pelos agentes de biocontrole, diminuindo até 94% da sua contaminação com RP103 (Einloft, 2016).

Considerando a importância da redução da produção de toxinas pelos fungos do gênero *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, a dificuldade que há pelos métodos de detoxificação que têm sido testados, já que não eliminam completamente as micotoxinas dos alimentos, e as informações da literatura de que a principal estratégia para evitar a intoxicação por micotoxinas é prevenir a contaminação e crescimento fúngico, reduzindo ao máximo possível a contaminação por fungos toxigênicos (Aiko e Mehta, 2015; Dambrós, 2015; Chulze, 2010; Nesci *et al.*, 2005;), pode-se afirmar que a redução da incidência dos fungos atingida pelos agentes de biocontrole testados neste trabalho proporcionará a redução do risco de ingestão dessas toxinas.

#### **5.4 Conclusões**

A redução da incidência de *Fusarium* sp. em grãos de milho teve como destaque os agentes de biocontrole *Bacillus velezensis* RP103 e *B. velezensis* RP242 pelo método de aplicação por bacterização de sementes.

A redução da incidência de *Penicillium* spp. em grãos de milho se sobressaiu com o agente *B. safensis* RF69 aplicado através de pulverização de plantas juntamente com o Tratamento de Sementes Convencional.

A redução da incidência de *Aspergillus* sp. em grãos de milho foi ressaltada pelos agentes *B. safensis* RF69 e *B. velezensis* RP103 via inoculação do solo.

O tratamento de sementes convencional não influenciou a incidência de *Fusarium* spp. e *Aspergillus* sp em grãos de milho.

### 5.5 Referências

AIKO, V.; MEHTA, A. Occurrence, detection and detoxification of mycotoxins. **Journal of Bioscience**, New Delhi, v. 40, n. 5, p. 943-954, 2015.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v. 1. 704 p.

BARRA, V. R. *et al.* Antagonismo direto e biocontrole da podridão-mole-do-tomateiro pelo uso de procariotas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 3, p. 327-330, 2009.

BERGAMASCHI, H. *et al.* **Boletins agrometeorológicos da estação experimental agrônômica da UFRGS**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013. 8 p.

BLUMA, R. V.; ETCHEVERRY, M. G. Influence of *Bacillus* spp. isolated from maize agroecosystem on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus* section *Flavi*. **Pest Management Science**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 242-251, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA, 2009. 399 p.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. 221 p.

CARRER FILHO, R. *et al.* Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 3, p. 340-344, 2009.

CARVALHO, N. L. Resistência genética induzida em plantas cultivadas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 7, n. 7, p. 1379-1390, 2012.

CAVAGLIERI, L. R. *et al.* Rhizobacteria and their potential to control *Fusarium verticillioides*: effect of maize bacterisation and inoculum density. **Antonie van Leeuwenhoek**, Louvain, v. 87, n. 3, p. 179-187, 2005.

CAVAGLIERI, L. R.; PASSONE, A.; ETCHEVERRY, M. G. Correlation between screening procedures to select root endophytes for biological control of *Fusarium verticillioides* in *Zea mays* L. **Biological Control**, Orlando, v. 31, n. 3, p. 259-267, 2004.

CHULZE, S. N. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 27, n. 5, p. 651-657, 2010.

COTA, L. V. *et al.* **Histórico e perspectivas das doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 7 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 193). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95066/1/circ-193.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2018.

CZEMBOR, E.; STEPIEŃ, L.; WAŚKIEWICZ, A. Effect of environmental factors on *Fusarium* species and associated mycotoxins in maize grain grown in Poland. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 7, [art.] e0133644, [p. 1-18], 2015.

DAMBRÓS, D. **Caracterização epidemiológica e manejo da podridão pós-colheita por *Aspergillus* em uva de mesa**. 2015. 40 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

EINLOFT, T. C. **Biocontrole de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* por *Bacillus* spp. isolados de plantas de milho**. 2016. 137 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

FALCÃO, V. C. A. *et al.* *Fusarium verticillioides*: evaluation of fumonisin production and effect of fungicides on in vitro inhibition of mycelial growth. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 171, n. 1, p. 77-84, 2011.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: pacote experimental designs (Portuguese): version 1.2.0**. Wien: The R Foundation, 2018.

FIGUEROA-LÓPEZ, A. M. *et al.* Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. **Springer Plus**, [Switzerland], v. 5, n. 330, p. 1-12, 2016.

HENNING, F. A. *et al.* Qualidade sanitária de sementes de milho em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 33, n. 2, p. 316-321, 2011.

KADO, C. J.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 1, p. 969-976, 1970.

LEYVA-MADRIGAL K. Y. *et al.* *Fusarium* species from the *Fusarium fujikuroi* species complex involved in mixed infections of maize in Northern Sinaloa, Mexico. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 163, n. 6, p. 486-497, 2015.

LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ, G. J. *et al.* *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 controls maize stalk and ear rot in Sinaloa, Mexico. **Field Crops Research**, Davis, v. 176, n. 1, p. 11-21, 2015.

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

MAGAN, M. *et al.* Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium graminearum*, biocides and environment. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 7, p. 685-690, 2002.

MAGAN, N. *et al.* Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 723-730, 2003.

MARQUES, O. J. *et al.* Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 667-675, 2009.

MARQUES, O. J. *et al.* Qualidade comercial de diferentes híbridos de milho em função do teor de água nos grãos durante a colheita. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 911-920, 2012.

MEDEIROS, F. H. V. *et al.* Biological control of mycotoxin-producing molds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 5, p. 483-497, 2012.

NESCI, A. V.; BLUMA, R. V.; ETCHEVERRY, M. G. In vitro selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus* section Flavi and aflatoxin production. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 113, n. 2, p. 159-171, 2005.

ONGENA, M. *et al.* Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 1084-1090, 2007.

PEREIRA, O. A. O. *et al.* **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2.

PEREIRA, P.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. G. Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem:

Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. **Biological Control**, Orlando, v. 42, n. 3, p. 281-287, 2007.

PEREIRA, P.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. G. Efficacy of bacterial seed treatments for the control of *Fusarium verticillioides* in maize. **Biological Control**, Orlando, v. 54, n. 1, p. 103-111, 2009.

RENSBURG, B. *et al.* The effects of cultivar and prophylactic fungicide spray for leaf diseases on colonisation of maize ears by fumonisin producing *Fusarium* spp. and fumonisin synthesis in South Africa. **Crop Protection**, Guildford, v. 79, n. 1, p. 56-63, 2016.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **How a corn plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1993. 26 p. (Special Report, no. 48).

ROSA, A. P. S. A.; EMYGDYO, B. M.; BISPO, N. B. (ed.). **62ª Reunião técnica anual da pesquisa do milho. 45ª Reunião técnica anual da pesquisa do sorgo**: indicações técnicas para o cultivo de milho e sorgo no Rio Grande do Sul safras 2017/2018 e 2018/2019. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 209 p.

SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.

STRECK, E. V. *et al.* **Solos do Rio Grande do Sul**. 2. ed. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2008. 222 p.

UGOJI, E. O.; LAING, M. D. Rhizotron studies on *Zea mays* L. to evaluate biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 24, n. 2, p. 269-274, 2008.

VERMA, V. C.; SINGH, S. K.; PRAKASH, S. Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 51, n. 5, p. 550-556, 2011.

## 5.6 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados de incidência de *Fusarium* sp. em grãos de milho do híbrido de milho BG7049 em relação a existência de Tratamento de Sementes C (TSC), Formas de Aplicação de agentes de biocontrole (Apl.) e Agentes de biocontrole (Age) em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	857,035	427,018	18,096	0
Existência de TSC	1	2,126	2,126	0,090	0,765
Forma de Aplicação	2	594,057	297,029	12,587	0
Agente de biocontrole	4	4578,883	1144,721	48,510	0
TSC*Apl	2	36,808	18,404	0,780	0,463
TSC*Age	4	212,270	53,068	2,249	0,075
Apl*Age	8	226,069	28,259	1,198	0,317
TSC*Apl*Age	8	348,948	43,619	1,848	0,863
Resíduo	58	1368,650	23,597		
Total	87	8221,847			
CV					3,18%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 2. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados de incidência de *Penicillium* spp. em grãos de milho do híbrido de milho BG7049 em relação a existência de Tratamento de Sementes Convencional (TSC), Formas de Aplicação de agentes de biocontrole (Apl) e Agentes de biocontrole (Age) em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	657,077	328,538	14,087	0
Existência de TSC	1	429,753	429,753	18,427	0
Forma de Aplicação	2	618,351	309,175	13,257	0
Agente de biocontrole	4	769,383	192,346	8,247	0
TSC*Apl	2	76,958	38,479	1,650	0,201
TSC*Age	4	1642,074	410,519	17,602	0
Apl*Age	8	1055,625	131,953	5,658	0
TSC*Apl*Age	8	748,030	93,504	4,009	0
Resíduo	58	1352,701	23,322		
Total	87	7349,951			
CV					2,37%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 3. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados de incidência de *Penicillium* spp. em grãos de milho híbrido BG 7049 para o fator TSC dentro das combinações dos fatores Forma de Aplicação x Agente de biocontrole em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
TSC: Semente x Contr.	1	10,667	10,667	0,457	0,502
TSC: Semente x RF69	1	90,741	90,741	3,891	0,053
TSC: Semente x RP103	1	2,667	2,667	0,114	0,737
TSC: Semente x RP242	1	682,667	682,667	29,271	0
TSC: Semente x Mix	1	200,300	200,296	8,588	0,005
TSC: Solo x Contr.	1	3,630	3,630	0,156	0,695
TSC: Solo x RF69	1	560,667	560,667	24,040	0,000
TSC: Solo x RP103	1	1,185	1,185	0,051	0,822
TSC: Solo x Rp242	1	16,667	16,667	0,715	0,401
TSC: Solo x Mix	1	50,074	50,074	2,147	0,148
TSC: Planta x Contr.	1	2,667	2,667	0,114	0,737
TSC: Planta x RF69	1	1232,667	1232,667	52,853	0
TSC: Planta x RP103	1	39,185	39,185	1,680	0,2
TSC: Planta x RP242	1	1,185	1,185	0,051	0,822
TSC: Planta x Mix	1	1,185	1,185	0,079	0,779
Resíduo	58	1352,701	23,322		

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC).

APÊNDICE 4. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados de incidência de *Penicillium* spp. em grãos de milho híbrido BG 7049 para o fator Aplicação dentro da combinação dos fatores TSC x Agente de biocontrole em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Aplic: Com TSC x Contr.	2	2,074	1,037	0,045	0,957
Aplic: Com TSC x RF69	2	366,519	183,259	7,858	0,001
Aplic: Com TSC x Rp103	2	399,407	199,704	8,563	0,001
Aplic: Com TSC x RP242	2	917,432	458,716	19,668	0
Aplic: Com TSC x Mix	2	24,099	12,049	0,517	0,599
Aplic: Sem TSC x Contr.	2	13,136	6,568	0,282	0,756
Aplic: Sem TSC x RF69	2	42,765	21,383	0,917	0,406
Aplic: Sem TSC x RP103	2	458,173	229,086	9,823	0,000
Aplic: Sem TSC x RP242	2	23,803	11,901	0,510	0,603
Aplic: Sem TSC x Mix	2	251,556	125,778	5,393	0,007
Resíduo	58	1352,701	23,322		

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC).

APÊNDICE 5. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados de incidência de *Penicillium* spp. em grãos de milho híbrido BG 7049 para o fator Agente de biocontrole dentro das combinações dos fatores TSC x Forma de aplicação em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Age: Com TSC x Semente	4	1215,526	303,882	13,030	0
Age: Com TSC x Solo	4	812,030	203,007	8,704	0,000
Age: Com TSC x Planta	4	1571,674	392,919	16,847	0
Age: Sem TSC x Semente	4	428,030	107,007	4,588	0,003
Age: Sem TSC x Solo	4	161,658	40,415	1,733	0,155
Age: Sem TSC x Planta	4	26,193	6,548	0,281	0,889
Resíduo	58	1352,701	23,322		

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC).

APÊNDICE 6. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados de incidência de *Aspergillus* sp. em grãos de milho híbrido BG 7049 em relação a existência de Tratamento de Sementes Convencional (TSC), Formas de Aplicação de agentes de biocontrole (Apl) e Agentes de biocontrole (Age) em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Bloco	2	11,454	5,727	2,199	0,120
Existência de TSC	1	0,316	0,316	0,121	0,729
Forma de Aplicação	2	86,084	43,042	16,526	0
Agente de biocontrole	4	205,462	51,365	19,721	0
TSC*Apl	2	26,825	13,412	5,150	0,009
TSC*Age	4	10,598	2,649	1,017	0,406
Apl*Age	8	452,879	56,610	21,735	0
TSC*Apl*Age	8	112,336	14,042	5,391	0
Resíduo	58	151,064	2,605		
Total	87	1057,017			
CV					12,86%

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC) Coeficiente de Variação (CV).

APÊNDICE 7. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados de incidência de *Aspergillus* sp. em grãos de milho híbrido BG 7049 para o fator TSC dentro das combinações dos fatores Forma de Aplicação x Agente de biocontrole em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
TSC: Semente x Contr.	1	4,741	4,741	1,820	0,183
TSC: Semente x RF69	1	0	0	0	1
TSC: Semente x RP103	1	16,667	16,667	6,399	0,014
TSC: Semente x RP242	1	16,667	16,667	6,399	0,014
TSC: Semente x Mix	1	4,741	4,741	1,820	0,183
TSC: Solo x Contr.	1	4,741	4,741	1,820	0,183
TSC: Solo x RF69	1	4,741	4,741	1,820	0,183
TSC: Solo x RP103	1	0,667	0,667	0,256	0,615
TSC: Solo x Rp242	1	24	24	9,215	0,004
TSC: Solo x Mix	1	12,519	12,519	4,806	0,032
TSC: Planta x Contr.	1	2,667	2,667	1,024	0,316
TSC: Planta x RF69	1	14,519	14,519	5,574	0,022
TSC: Planta x RP103	1	0,074	0,074	0,028	0,867
TSC: Planta x RP242	1	10,667	10,667	4,095	0,048
TSC: Planta x Mix	1	32,667	32,667	12,542	0,001
Resíduo	58	151,064	2,605		

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC).

APÊNDICE 8. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados de incidência de *Aspergillus* sp. em grãos de milho híbrido BG 7049 para o fator Forma de Aplicação dentro da combinação dos fatores TSC x Agente de biocontrole em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Aplic: Com TSC x Contr.	2	6,025	3,012	1,16	0,322
Aplic: Com TSC x RF69	2	176,99	88,49	33,98	0
Aplic: Com TSC x Rp103	2	110,91	55,46	21,29	0
Aplic: Com TSC x RP242	2	86,03	43,01	16,51	0
Aplic: Com TSC x Mix	2	37,63	18,82	7,22	0,002
Aplic: Sem TSC x Contr.	2	6,62	3,31	1,27	0,288
Aplic: Sem TSC x RF69	2	62,03	31,01	11,91	0
Aplic: Sem TSC x RP103	2	107,36	53,68	20,61	0
Aplic: Sem TSC x RP242	2	26,47	13,24	5,08	0,009
Aplic: Sem TSC x Mix	2	58,077	29,04	11,15	0
Resíduo	58	151,06	2,61		

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC).

APÊNDICE 9. Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), dos dados de incidência de *Aspergillus* sp. em grãos de milho híbrido BG 7049 para o fator Agente de Biocontrole dentro das combinações dos fatores TSC x Forma de Aplicação em experimento a campo. UFRGS - Porto Alegre, 2019.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Age: Com TSC x Semente	4	44,030	11,007	4,23	0,005
Age: Com TSC x Solo	4	322,49	80,622	30,95	0
Age: Com TSC x Planta	4	129,36	32,341	12,42	0
Age: Sem TSC x Semente	4	100,93	25,230	9,69	0
Age: Sem TSC x Solo	4	129,48	32,370	12,43	0
Age: Sem TSC x Planta	4	54,99	13,748	5,28	0,001
Resíduo	58	151,06	2,605		

\*Fonte de Variação (FV), Graus de Liberdade (GL), Soma de Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Valor de F calculado (FC).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qualidade de um produto está relacionada à expectativa que o consumidor tem sobre ele. De forma bem geral e simplificada, quando o produto em questão se trata de um alimento, existe a expectativa de que ele cumpra seu papel nutritivo, seja saboroso/palatável e não ofereça riscos à saúde do consumidor. Isto se aplica para nutrição humana e animal.

Do ponto de vista agrônômico, para obter um produto de qualidade, é necessário considerar as demandas e os objetivos do produtor, o que atualmente inclui produzir da maneira mais sustentável possível. Por isso, o conceito de sustentabilidade “atividade economicamente viável, socialmente justa e ecologicamente correta” deve ser aplicado na agricultura, pois dentre as coisas que mais necessitam ser sustentáveis ao longo do tempo está a produção de alimentos.

Através dos resultados obtidos neste trabalho, é possível inferir que as estirpes de *Bacillus* sp. em interação com os diferentes materiais genéticos de milho testados possuem, em conjunto, elevado potencial para o biocontrole e promoção de crescimento em plantas. Culminando, assim, em alternativa de manejo sustentável que promove a produção de grãos de milho de qualidade.

Conforme observado nos diferentes estudos realizados tanto em laboratório, como em casa de vegetação e a campo, a maioria das cultivares de milho poderá responder de forma positiva em próximos estudos de biocontrole com os isolados testados, e o grande destaque foi o híbrido BG7049.

Foi possível observar que houve efeito positivo da bacterização com isolados de *Bacillus* sp. sobre a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho, sendo este resultado dependente das variedades e híbridos testados. Considerando, no entanto, os atributos de qualidade avaliados neste trabalho é possível concluir que o tratamento de sementes convencional, com inseticida e

fungicida no recobrimento de sementes, foi um fator determinante para a produção de grãos de milho de qualidade.

Os isolados de *Bacillus* sp. testados possuem potencial como agentes de biocontrole em milho diminuindo a incidência fúngica nos grãos. Agentes de biocontrole combinados com outras técnicas de manejo integrado de doenças podem ser úteis no desenvolvimento de um antagonista mais efetivo com aplicações comerciais. Além disso, os testes em condições de casa de vegetação não são suficientes para prever a influência das rizobactérias em promover o crescimento e rendimento de grãos em milho a nível de campo.

É importante enfatizar que muitos estudos em condições de laboratório e casa de vegetação revelam conclusões muito promissoras, e os resultados em testes a campo frequentemente não acompanham essas expectativas geradas em trabalhos prévios. Isso porque em laboratório ou casa de vegetação, as condições para o desenvolvimento dos agentes biológicos de controle são próximas do ideal.

Quando submetidas às condições reais de campo, é possível que a capacidade de competição e adaptação dos agentes biológicos seja insuficiente, afetando sua sobrevivência e capacidade antagonista. Por isso, ao selecionar agentes de controle biológico, a utilização de microrganismos nativos geralmente proporciona melhores resultados, pois já estão bem adaptados ao agroecossistema em questão.

Dentre os desafios do controle biológico está a dificuldade de lidar com a ecologia do ambiente rizosférico, por se tratar de um ambiente com componentes e interações muito complexas e dinâmicas. É necessário considerar a capacidade de fungos habitantes do solo, tendo que haver uma combinação positiva entre os mecanismos envolvidos.

Um ponto de intersecção entre o biocontrole e a promoção de crescimento, os dois temas abordados neste trabalho, é a indução de resistência a doenças em plantas. Trata-se de uma forma indireta de biocontrole, assim como uma forma indireta de promover o crescimento das plantas, merecendo total atenção em próximos estudos.

Avaliar métodos de aplicar os isolados em sementes e sua eficácia no armazenamento também são sugestões para próximos trabalhos. Através da

compreensão prévia dos mecanismos de ação das rizobactérias seria possível submetê-las a novos testes a campo com a cultura do milho ou outras culturas de interesse, adequando as estirpes e forma de aplicação ao seu uso pretendido.

As estirpes de rizobactérias poderiam ser exploradas como uma ferramenta biológica para a produção de culturas sustentáveis através da formulação de inoculantes. Para a formulação de inoculantes é necessário ainda: testar seu efeito sobre outros microrganismos benéficos; o(s) veículo(s) mais adequado(s) para a formulação do inoculante; investigar os mecanismos de ação dos agentes de biocontrole; e os mecanismos de promoção de crescimento. Abordagens biotecnológicas e moleculares poderiam auxiliar essa compreensão.

Diante disso, a utilização de controle biológico com organismos inócuos ao ser humano, animais e meio ambiente constitui-se de uma técnica promissora no objetivo de reduzir os insumos químicos na agricultura. É necessário, ainda, garantir que essas formas de controle sejam realizadas de maneira segura. Esta, além das demais considerações, evidenciam a necessidade de realizar estudos mais aprofundados, e novos esforços devem ser realizados avaliando a capacidade de biocontrole e de promoção de crescimento vegetal das estirpes de *Bacillus* sp. avaliadas neste trabalho.