



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Anita Sampaio Guimarães

Inoculação via semente e foliar de *Azospirillum brasilense* para promover crescimento do milho (*Zea mays*) e tentativa de controlar a doença Antracnose (*Colletotrichum graminicola*)

Florianópolis

2021

Anita Sampaio Guimarães

Inoculação via semente e foliar de *Azospirillum brasilense* para promover crescimento do milho (*Zea mays*) e tentativa de controlar a doença Antracnose (*Colletotrichum graminicola*)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção título de Mestre em Ciências, área de concentração Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Maisonnave Arisi

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sampaio Guimarães, Anita

Inoculação via semente e foliar de *Azospirillum* brasileiro para promover crescimento do milho (*Zea mays*) e tentativa de controlar a doença Antracnose (*Colletotrichum graminicola*) / Anita Sampaio Guimarães ; orientadora, Ana Carolina Maisonnave Arisi, 2021.

63 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal. 3. Antracnose. 4. Biocontrole. 5. *Zea mays*. I. Maisonnave Arisi, Ana Carolina. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Anita Sampaio Guimarães

Inoculação via semente e foliar de *Azospirillum brasilense* para promover crescimento do milho (*Zea mays*) e tentativa de controlar a doença Antracnose (*Colletotrichum graminicola*)

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr.(a) Fernanda Plucani do Amaral
Empresa Joyn Bio

Prof. Dr. Marciel Joao Stadnik
Instituição CCA/UFSC

Profa. Dra. Aline Cristina Velho
Instituição CCA/UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em ciências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi
Orientadora

Florianópolis, 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a orientação da professora Ana Arisi, por ter me aceitado como sua orientada e pela paciência.

Agradeço a todas as colegas de trabalho do laboratório. Mirella, Gabriela, Tuany e Lorena. Um agradecimento especial a Franciele, Ana Marina e Elisandra, obrigada pela companhia e pelo grande auxílio nas atividades do Laboratório de Biologia Molecular. Agradeço também aos estagiários Nicole e Leo pela ajuda nos trabalhos diários.

Agradeço ao professor Marciel João Stadnik, por ter ajudado na construção deste trabalho e por ter disponibilizado o laboratório de fitopatologia. Agradeço a Aline, Vanessa e Paula por terem me auxiliado nas atividades do LabFito.

Agradeço minha família pelo apoio. Sem vocês, com certeza este trabalho não teria sido concluído. Agradeço minha mãe, Leila, pelo grande apoio neste momento difícil. Minhas irmãs Sofia e Leticia, pelo carinho. Agradeço por me ajudarem a ver minha capacidade de vencer este e outros desafios.

Agradeço a CAPES pelo auxílio da bolsa de estudos.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a construção deste trabalho. Agradeço a todos pela contribuição e pelos aprendizados.

“É preciso que eu suporte duas ou três lagartas se eu quiser conhecer as borboletas...”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O uso exacerbado de agrotóxicos traz vários malefícios ao meio ambiente e a saúde humana, por isso, tem-se buscado alternativas para o controle de doenças em plantas principalmente dentro do manejo integrado. Dentre essas alternativas, está o controle biológico, onde utiliza-se de agentes biológicos para diminuir a severidade de doenças. Por isso, é importante o estudo de microrganismos que sejam capazes de controlar essas doenças. Dentre estes, existem bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), tais como *Azospirillum brasilense*, que possuem a capacidade de promover crescimento das plantas e controlar doenças. Neste trabalho, foi testado a capacidade da bactéria *Azospirillum brasilense* FP2 de controlar o crescimento do fungo *Colletotrichum graminicola*, que causa antracnose no milho, *in vitro* e *in vivo* no estágio V2. No ensaio *in vitro* foram realizados dois métodos, no primeiro os dois microrganismos foram repicados no meio de cultivo ao mesmo tempo e no segundo a bactéria foi repicada 48 h antes do fungo. No experimento *in vivo*, realizado em casa de vegetação, a aplicação da bactéria ocorreu via semente no momento do plantio e via foliar no estágio V2, enquanto a inoculação do fungo foi realizada 7 dias após a semeadura (DAS). Para avaliar crescimento, foram realizadas coletas de plantas aos 12, 19 e 26 DAS, enquanto a avaliação da doença foi realizada apenas 12 DAS. Foram avaliados massa fresca e comprimento, tanto parte aérea como raiz. A doença foi avaliada a partir da severidade, realizando coleta de folhas 5 dias após inoculação do patógeno (12 DAS). Como resultado, observou-se que a bactéria não foi capaz de controlar o crescimento do fungo no teste *in vitro*, assim como no experimento *in vivo*, onde não foi capaz de controlar a doença em nenhuma das formas de inoculação. A aplicação da bactéria não promoveu crescimento em 12 DAS e afetou negativamente os parâmetros de crescimento avaliados nas plantas doentes. Ao avaliar o crescimento da planta nos outros tempos, a aplicação da bactéria na semente promoveu maior comprimento e massa fresca na raiz na coleta 26 DAS em relação a aplicação foliar e controle. Conclui-se que a bactéria *A. brasilense* FP2 não foi capaz de inibir o crescimento do fungo *in vitro* e controlar a antracnose do milho no estágio V2, sendo necessários mais estudos para concluir se esta cepa é capaz de promover respostas de defesa no decorrer do crescimento da planta.

Palavras chave: BPCV, Antracnose, Biocontrole, *Zea mays*

ABSTRACT

The exaggerated use of pesticides brings several harms to the environment and human health, therefore, alternatives to control plant diseases have been sought. Among these alternatives, there is biological control, which uses biological agents to reduce the severity of diseases. Therefore, it is important to study microorganisms that are capable of controlling these diseases. Among these, there are plant growth promoting bacteria (PGPB), such as *Azospirillum brasilense*, which have the ability to promote plant growth and control diseases. In this work, the ability of the bacterium *Azospirillum brasilense* strain FP2 was tested to control in vitro and in vivo the growth of the fungus *Colletotrichum graminicola*, which causes anthracnose in corn. In the in vitro assay, two methods were carried out, in the first the two microorganisms were subcultured on the agar plates at the same time and in the second the bacteria were subcultured 48 h before the fungus. In the in vivo experiment, carried out in a greenhouse with sterile soil, bacterial inoculation occurred via seed at the time of planting and the foliar route at stage V2, while fungus inoculation was performed 7 days after sowing (DAS). Collections to assess growth were performed at 12, 19 and 26 DAS, while to assess severity only 12 DAS. Fresh mass of shoot and root, and length of shoot and root were evaluated. The disease was evaluated based on its severity. As a result, it was observed that the bacterium was not able to control the growth of the fungus in the in vitro test, as well as in vivo, where it was not able to control the disease in 7 DAS in any of the inoculation forms, in addition to having negative effects on plant growth when associated with disease, especially in leaf inoculation. In the growth promoted by the bacteria, there was no statistical difference for fresh mass and shoot length, while fresh mass and root length were greater in the collection 26 DAS in the treatment of *A. brasilense* via furrow compared to control and inoculated in the leaf. It is concluded that the bacterium *A. brasilense* FP2 was not able to control the growth of the fungus in vitro and control the disease in stage V2 of corn in sterile soil, further studies are needed to conclude if this strain is able to promote defense responses in the course of plant growth.

Keywords: PGPB, Anthracnose, Biocontrol, *Zea mays*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção e consumo do milho no Brasil entre as safras 2012/2013 e 2019/2020....	16
Figura 2: Fotos de placas de Petri dos dois ensaios <i>in vitro</i> , sendo A do primeiro ensaio e B do segundo ensaio, com os dois microrganismos.....	39
Figura 3: Severidade da antracnose (<i>C.graminicola</i>) em folhas de milho (F1 e F2), aos 7 DAS, em casa de vegetação, com inoculação da bactéria (<i>A.brasilense</i>), na semente(ABS+Cg), na folha (ABf+Cg) e sem co-inoculação(Cg).	40
Figura 4: Crescimento do milho, aos 12 DAS, em decorrência da inoculação de <i>A.brasilense</i> e <i>C. graminicola</i> . CR, comprimento da raiz; CA, comprimento da parte aérea; MFR, massa fresca da raiz; MFA, massa fresca da parte aérea. Tratamentos com a mesma letra não se diferem estatisticamente (P< 0,05).	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais fatores de resistência pré e pós-formados (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN, 2011).	19
Tabela 2: Resumo da análise de variância para severidade da doença nas folhas de milho (F1 e F2), aos 12 DAS, em casa de vegetação, com inoculação da bactéria <i>A. brasilense</i> na semente (AbS+Cg), na folha (AbF+Cg) e sem inoculação da bactéria (Cg). GL: graus de liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: quadrados médios.	41
Tabela 3: Resultados estatísticos dos parâmetros avaliados no crescimento do milho em decorrência da inoculação de <i>A. brasilense</i> e <i>C. graminicola</i>	43
Tabela 4: . Análise estatística da variação do crescimento do milho a partir dos métodos de inoculação nas coletas 12, 19 e 26 dias após o semeio (DAS).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

- AbF Aplicação da bactéria *Azospirillum brasilense* na folha
- AbS Aplicação da bactéria *Azospirillum brasilense* na semente
- ACC 1-aminociclopropano1-carboxilato
- BPCV Bactérias Promotoras De Crescimento Vegetal
- CB controle biológico
- Cg *Colletotrichum graminicola*
- DAS Dias após a semeadura
- ETI imunidade desencadeada por efetor
- ETS Suscetibilidade desencadeada por efetor
- FBN fixação biológica de nitrogênio
- IAA ácido-indol-acético
- MAMPs padrões moleculares associados a micróbios
- MID Manejo integrado de Doenças
- PAMPs padrões moleculares associados a patógenos
- PRRs proteínas de reconhecimento padrão
- PTI Imunidade desencadeada por PAMP/MAMP
- RH Reação de hipersensibilidade
- RNH Resistência não hospedeira
- RSA Resistência Sistêmica Adquirida
- RSI Resistência Sistêmica Induzida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Milho: produção, consumo e importância econômica.....	16
2.2 antracnose no milho	17
2.3 Imunidade inata e os Mecanismos de resistência das plantas.....	18
2.4 Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV)	21
1.1.1 Mecanismos de ação direta das BPCV para crescimento vegetal	22
1.1.2 Mecanismos de ação indireta das BPCV para crescimento vegetal	26
2.5 Métodos de inoculação de BPCV	31
2.6 <i>Azospirillum</i> : Principais mecanismos de promoção de crescimento vegetal e biocontrole.....	28
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivos específicos:.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Condições de Crescimento dos Microrganismos e criação do inóculo	35
4.2 Ensaio In vitro.....	35
4.3 Preparo do experimento em casa de vegetação	36
4.4 avaliação de severidade da doença e crescimento da planta.....	37
4.5 Análise estatística	38
5 RESULTADOS	39
5.1 ENSAIO IN VITRO	39
5.2 EFEITO DA CO-INOCULAÇÃO NA SEVERIDADE DA ANTRACNOSE E NO CRESCIMENTO DA PLANTA.....	39
5.3 Efeito no crescimento do milho com inoculação de <i>A.brasilense</i> no momento do plantio e na folha	44

6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O milho é o cereal mais produzido no mundo, possui grande importância econômica devido ao seu alto valor nutritivo e calórico (PAES, 2006), e é muito utilizado para ração animal, alimentação humana e produção de biocombustível (SOUZA et al., 2018). Várias técnicas agrícolas melhoraram a produtividade do milho (de 3,79 vezes de 1944 até 2013), dentre as quais: o melhoramento de culturas (híbridos e transgênicos), a mecanização agrícola, o aumento na densidade de plantas por hectare e o aumento do uso de agrotóxicos no controle de pragas e doenças (GALVÃO, 2014).

O consumo de agroquímicos cresceu de 204.100 toneladas em 2006 para 549.280 toneladas em 2018 (IBAMA, 2018), contribuindo de forma positiva para a produtividade diminuindo perdas causadas por pragas e doenças (ALBUQUERQUE et al., 2016; MICHEREFF; BARROS, 2001). Porém, o uso excessivo de agrotóxicos, como fungicidas, começou a gerar vários problemas ambientais, como contaminação dos lençóis freáticos (RISSATO et al., 2004; SOARES; FARIA; ROSA, 2016), de afluentes d'água (RISSATO et al., 2004; ALBUQUERQUE et al., 2016), da atmosfera (SOUZA et al., 2017) além da persistência e acúmulo de resíduos tóxicos no solo, atingindo o homem, os animais, peixes, insetos e microrganismos do solo (MICHEREFF; BARROS, 2001; CAVALCANTI, 2005). Além do uso excessivo desses produtos gerar fitopatógenos resistentes, eles também podem modificar a composição da microbiota, o que vai alterar o ecossistema microbiano e logo a população de patógenos, já que seus antagonistas naturais serão também afetados (MICHEREFF; BARROS, 2001).

Devido a isso, buscam-se novos métodos de combater os fitopatógenos, principalmente dentro do contexto de manejo integrado de doenças (MID), no qual utiliza-se várias abordagens que controlam a doença de forma que não gere danos econômicos ao produtor (KOUL; DHALIWAL; CUPERUS, 2004). Algumas delas é o controle biológico (CB) de doenças (BETTIOL, 2011), no qual utiliza-se microrganismos que irão controlar a população do patógeno ou induzir resistência em plantas (MICHEREFF; BARROS, 2001; MARIANO et al., 2004; CAVALCANTI; 2005).

O uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas torna-se interessante para o controle biológico, pois elas possuem atividades antagonistas como: a capacidade de produzir substâncias anti-microbianas, enzimas, competição, *quorum quenching* e indução de

resistência (SANTOYO et al, 2016; OLANREWAJU; GLICK ; BABALOLA, 2017). Exemplos da atividade desses microrganismos podem ser observados no uso do *Azospirillum brasilense* efetivo contra a antracnose (*Colletotrichum acutatum*) em morangueiro (TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011), e isolados de *Bacillus subtilis* contra tombamento causado por *Rhizoctonia solani* no tomate (ASAKA; SHODA., 1996). Produtos à base dessas bactérias já existem no Brasil (Noctin Azo, AzzoFix) e nos Estados Unidos a base dessas bactérias para controle de determinadas doenças, como Actinovate®, Galltrol®, Intercept®, dentre outros (MARIANO et al., 2004).

Diante disso, percebe-se a importância na busca de novos meios de controlar doenças em plantas. Dentre as quais, tem-se a antracnose do milho, causada pelo fitopatógeno *Colletotrichum graminicola*, que atinge as folhas e pode progredir para a o colmo (KIMATI et al., 2005) com impactos diretos e indiretos na produtividade em até 40% (KIMATI et al., 2005; PARREIRA et al., 2014). As principais formas de controle desta doença são o uso de cultivares resistentes, rotação de culturas, manejo do solo e utilização de fungicidas. Um dos novos meios de controle da doença pode ser considerado através do biocontrole com o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal. Dentre essas bactérias, a espécie *Azospirillum brasilense* é comumente utilizado nas plantações de trigo e milho para desenvolvimento vegetal no Brasil (SPOLAOR et al., 2016), já presente em inoculantes comerciais como AzoTotal, Azokop, NITRO1000 gramíneas, dentre outros. A bactéria é conhecida principalmente pela sua capacidade de fixar nitrogênio (VEJAN et al., 2016) e produzir fitormônios (FENDRIHAN et al., 2017), mas além disso, pode atuar no controle biológicos a partir de indução de resistência, como por exemplo, em doenças no morango (TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011; VIEJOBUENO, 2021), arroz (YASUDA et al., 2009) e em grão de bico (PARMASI et al 2019).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

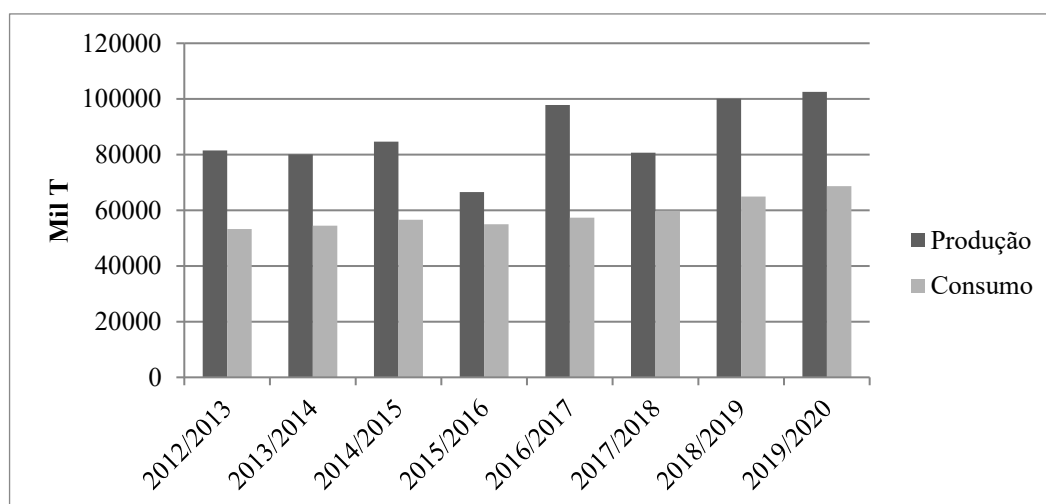
2.1 MILHO: PRODUÇÃO, CONSUMO E IMPORTÂNCIA ECONOMICA

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas produzidas mundialmente, com aproximadamente 2,2 bilhões de toneladas na safra 2019/2020 (FAO, 2021). Deste total, o Brasil está em terceiro lugar com produção na safra 2019/2020 de aproximadamente 102 milhões de toneladas (CONAB, 2021), estando atrás dos Estados Unidos e da China.

A produção do grão, assim como sua demanda, cresceu ao longo dos anos (Figura 1). A expansão da terra cultivada para esse fim, principalmente na segunda safra após o plantio de soja, foi o principal fator para a cultura expandir no Brasil, com produtividade de 5.533 kg/ha na safra 2019/2020 (CONAB, 2021). Além disso, sua variabilidade genotípica permite sua plantação em diferentes condições de latitude (entre zonas temperadas) e altitude (nível do mar até 3.600 m) (MAGALHÃES et al., 2002).

O milho tem participação importante na alimentação brasileira e mundial (produção de fubás, farinhas, canjicas e óleos), além de estar presente também na indústria (amidos industriais na produção de papelão ondulado, adesivos e fitas gomadas), na produção de etanol e de ração animal (SOUZA et al., 2018).

Figura 1: Produção e consumo do milho no Brasil entre as safras 2012/2013 e 2019/2020



Fonte: Conab

2.2 ANTRACNOSE NO MILHO

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são conhecidos por causarem doenças em várias espécies de plantas, como milho, cana-de-açúcar, sorgo, trigo, morango, abacate, maçã, dentre outros, sendo esta conhecida como antracnose. Este gênero foi adotado como o oitavo mais importante grupo de fungos patogênicos no mundo baseado em percepções científicas e na importância econômica (DEAN et al. 2012).

Fungos do gênero são classificados como hemibiotróficos, possuem uma fase biotrófica inicial, no qual se alimentam da célula hospedeira viva, e uma fase necrotrófica, se alimentando da célula morta do hospedeiro (MÜNCH et al, 2008, O'Connel et al. 2012). As espécies do gênero são patogênicas específicas para algumas espécies de planta, sendo milho e sorgo hospedeiros da espécie *C. graminicola* (PARREIRA et al., 2014). Esta doença é de importância mundial (CANNON et al., 2012) e tem ganhado destaque no Brasil desde 2006 por estar se agravando em algumas partes do país (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006), afetando a produção da cultura com perdas de até 40% devido as infecções foliares causadas pela doença, que podem conseqüentemente gerar infecções do colmo (PARREIRA et al., 2014).

No ciclo inicial da doença, o inóculo primário está presente em restos de cultura, no qual se mantêm viáveis por 10 meses (KIMATI et al., 2005), o que reflete justamente no agravamento da doença nos sistemas de plantio direto, onde a cada ciclo, aumenta a quantidade de inóculo do patógeno no campo (PARREIRA et al., 2014). A partir das gotas de chuvas, o fungo alcança as folhas mais baixas e, posteriormente, as folhas mais altas enquanto a planta cresce.

O processo de infecção inicia-se quando o conídio, ao entrar em contato com a folha de milho, germina e forma o tubo germinativo que gera, posteriormente, o apressório melanizado. Esta estrutura consegue gerar pressão mecânica e liberar enzimas que ajudam na penetração do tecido vegetal (MÜNCH et al. 2008). Após penetrar a parede celular, o fungo está na fase biotrófica e não demonstra sintomas de infecção, com hifas que adentram na célula contornando sua membrana plasmática e crescem para outras células epidérmicas e/ou mesófilas adjacentes (SUKNO et al., 2007). De 48 a 72h depois, há a troca para o crescimento necrotrófico e surgem os sintomas na folha, com crescimento de hifas finas e extensas que colonizam inter e intracelularmente, matando a célula do hospedeiro e colonizando-o

(SUKNO et al., 2007). Por fim, os conídios são produzidos em acérvulos, cobertos por uma matriz extracelular mucilaginosa que protege contra dessecação e é essencial para disseminação destes (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999).

Nas plantas suscetíveis, as lesões foliares são castanho, ovais e alongadas, com bordas avermelhadas e progridem para toda a folha; nas resistentes, as lesões são menores, variando em cloróticas a necróticas. Já no colmo, as plantas suscetíveis podem morrer antes de completar o ciclo de desenvolvimento, com lesões encharcadas elípticas de coloração escura marrom avermelhada a negra, podendo coalescer e formar extensas áreas necrosadas (PARREIRA et al., 2014).

Além do tecido foliar, os conídios presentes nas folhas (inóculo secundário) também podem atingir o colmo do milho a partir de ferimentos, causados por insetos por exemplo, e atingir o xilema. Os sintomas podem ser visíveis, com descoloração da casca do colmo para cor preta, e/ou podem ser internos. A colonização vascular pode causar sintomas de *top dieback*, que ocorrem principalmente nos estágios iniciais da formação de grãos e interfere na produtividade (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999).

Como principal forma de controlar a doença, utiliza-se cultivares resistentes, sendo a resistência determinada por genes dominantes diferentes, influenciando separadamente a antracose foliar e a do colmo (FERREIRA; CASELA, 2001). Porém, é um método pouco eficaz devido a variabilidade genética do patógeno (COSTA et al 2014), que o torna resistente a esse mecanismo de defesa (FERREIRA; CASELA, 2001). Além desse, são utilizados outros métodos como rotação de culturas, manejo do solo, uso de densidade de semeadura recomendada, adubação adequada e utilização de fungicidas no tratamento de sementes e aplicação aérea em campo (JARDINE; LACA-BUENDIA, 2009), mas sabe-se que os fungos também se tornam resistentes a esses produtos futuramente.

2.3 IMUNIDADE INATA E OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DAS PLANTAS

As plantas possuem seu próprio mecanismo de defesa. Diferentes dos animais, elas não possuem células específicas para defesa, sendo necessário cada célula ser capaz de se defender e sinalizar as outras sobre a infecção (JONES; DANGL, 2006). A imunidade inata da planta reconhece esses patógenos e impede sua entrada e crescimento, mas algum destes

conseguem burlar esse reconhecimento e/ou inativar esses mecanismos e, desta forma, causar a doença (MUTHAMILARASAN; PRASAD, 2013).

Os mecanismos de defesa utilizados pelas plantas são estruturais ou bioquímicos, sendo alguns destes formados antes (pré-formados/constitutivos) e outros depois da infecção do fitopatógeno (pós-formados/induzíveis) (Tabela 1). Os mecanismos estruturais atuam como barreiras físicas que inibem a entrada do patógeno e seu crescimento na planta, enquanto que os bioquímicos são reações químicas que geram substâncias tóxicas para os fitopatógenos ou condições desfavoráveis para seu crescimento. Essas reações tem variações de acordo com o sistema patógeno-hospedeiro, idade da planta, idade e tecido atacado, condições nutricionais e condições climáticas (AGRIOS, 2005).

Tabela 1: Principais fatores de resistência pré e pós-formados (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN, 2011).

	Pré-formado	Pós-formado
Estrutural	<ul style="list-style-type: none"> • Constituição da cutícula (espessura, presença de compostos tóxicos para o fitopatógenos) • Estômatos (abertura, quantidade) • Tricomas • Parede celular espessa • Fibras/Vasos condutores 	<ul style="list-style-type: none"> • Agregação citoplasmática • Halos • Papilas • Lignificação • Camadas de cortiça • Tiloses
Bioquímico	<ul style="list-style-type: none"> • Fenóis • Alcalóides • Lactonas insaturadas • Glicosídeos fenólicos • Glicosídeos cianogênicos • Fototoxinas • Inibidores Protéicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Fitoalexinas

Vários patógenos, especialmente fungos e bactérias, liberam uma variedade de substâncias que atuam como elicitores e são reconhecimentos pelo hospedeiro. Alguns deles incluem toxinas, glicoproteínas, carboidratos, ácidos graxos, peptídeos e enzimas microbianas extracelulares (como proteases e enzimas pécticas). Após esse reconhecimento, uma série de reações bioquímicas e mudanças estruturais ocorrem na célula da planta, a fim de impedir o crescimento do patógeno e “afastar” suas enzimas, toxinas, etc. A rapidez da planta em reconhecer o patógeno e de começar a mobilizar suas defesas determinam se irá ocorrer

qualquer infecção (como na resposta de hipersensibilidade) ou quanto o patógeno irá se desenvolver (AGRIOS, 2005).

A regra é a planta ser resistente aos fitopatógenos, sendo a exceção aqueles que conseguem infectar e causar doenças. É o caso por exemplo de patógenos que atingem a macieira, mas não conseguem causar doenças em plantas de tomate e arroz (AGRIOS, 2005). Esta resistência não hospedeira (RNH) envolve uma ativação complexa de genes e aciona vários mecanismos de defesa, sendo eficientes para a maioria dos patógenos. A RNH é subdividida em dois tipos: no tipo I, os patógenos falham em superar as respostas de defesa da planta pré e pós-formadas, como espessamento da parede celular, acúmulo de fitoalexinas, síntese de metabólitos secundários da planta e formação de papila; por isso, não ocorre formação de sintomas visíveis na planta. Enquanto no tipo II, esses patógenos conseguem superar esses mecanismos de defesa primário e infecta a célula, mas, desencadeia reação de hipersensibilidade (UMA; RANI; PODILE, 2011).

Para reconhecer o patógeno, as plantas possuem proteínas de reconhecimento padrão (PRRs) na membrana plasmática, estas identificam os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs), resultando em imunidade desencadeada por PAMP/MAMP (PTI) (UMA; RANI; PODILE, 2011).

Assim como os fitopatógenos, as plantas também reconhecem outros microrganismos presentes no solo que possuem MAMPs e alguns deles são idênticos aos do patógenos. Logo, assim como o sistema imune da planta, através da PTI, reprime o crescimento de fitopatógenos, ela também responde a esses microrganismos presentes no solo, regulando aqueles que vão ou não ter algum tipo de relação com o hospedeiro e estar presentes na interação planta-microrganismo. Isso indica que a planta tem controle sobre o crescimento das populações microbianas com seu sistema imune, onde esses microrganismos vão superar ou não essa imunidade. Eles desenvolveram seus MAMPs de forma que não fossem mais reconhecidos pelas plantas, como através da alteração na sequência do MAMP, a partir de degradação ou sequestro do MAMP e por modificação do MAMP (TEIXEIRA et al, 2019).

Quando o patógeno supera a PTI e entra na célula hospedeira, ele libera efetores que contribuem para sua virulência, sendo estes efetores reconhecidos pelas plantas através das proteínas-R, o que gera resposta de imunidade desencadeada pelo efector (ETI) e resulta na reação de hipersensibilidade. Quando o patógeno não é reconhecido neste ultimo caso, que pode ocorrer devido mudança na constituição de seus efetores, ele burla os mecanismos de

resistência e causa a doença, resultando na suscetibilidade desencadeada pelo efector (ETS). Da mesma forma, a planta pode possuir proteínas-R e identificar este patógeno que antes era capaz de causar doença. Percebe-se, conseqüentemente, que existe uma interação planta-patógeno onde eles co-evoluem (JONES; DANGL, 2006; UMA; RANI; PODILE, 2011). Esta interação é conhecida pela teoria *gene-for-gene*, onde existe um gene de avirulência (Avr) do patógeno e um gene de resistência (gene-R) da planta; a planta precisa ter o produto do gene-R (Proteína-R) para identificar o produto do gene-Avr (elicitador), assim como o fungo precisa desse elicitador para ser reconhecido pela planta (JONES; DANGL, 2006; UMA; RANI; PODILE, 2011).

A reação de hipersensibilidade (RH) é uma defesa celular induzida no local da infecção do patógeno ao reconhecer seus eliciadores. RH é o resultado da rápida mobilização de uma cascata de respostas de defesa das células afetadas e circundantes, o que leva a alteração nas funções celulares, assim como a ativação melhorada de compostos ou novos compostos relacionados à defesa. Dentre elas, tem-se a explosão rápida de espécies reativas de oxigênio; aumento fluxos de íons, especialmente de K^+ e H^+ através da membrana celular; ruptura das membranas e perda da compartimentação celular; integração de fenólicos com componentes da parede celular e fortalecimento da parede celular vegetal; ativação transitória de proteínas quinases; produção de substâncias antimicrobianas (como fitoalexinas); e formação das chamadas proteínas antimicrobianas relacionadas com a patogênese (proteínas-PR), como as quitinases. A liberação conseqüente de compostos tóxicos (como espécies reativas de oxigênio – ROS) muitas vezes matam as células invadidas, as adjacentes e o próprio patógeno (AGRIOS, 2005). Entretanto, a morte celular causada pela RH também funciona como uma forma de sinalização para as células adjacentes; importante lembrar que a morte celular não afeta fitopatógenos necrotróficos e hemibiotróficos (HEATH, 2000).

2.4 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)

As BPCV são microrganismos que estão naturalmente presentes no ambiente e nas plantas, colonizando pequena ou grande parte de seus tecidos e criando relações associativas específicas que estimulam o crescimento vegetal, aumentando a produtividade, e diminuem os efeitos adversos causados por fatores bióticos e abióticos (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010). Elas podem colonizar tanto superficialmente (epifíticas) como

internamente (endofíticas) nas plantas e, a partir disso, contribuir de maneira direta ou indireta no crescimento vegetal (GUIMARÃES, et al. 2017; SPOLAOR et al., 2016; SINGH, 2015; MICHEREFF; BARROS, 2001).

2.4.1 Mecanismos de ação direta das BPCV para crescimento vegetal

Na contribuição direta, as BPCV atuam para o desenvolvimento da planta ao facilitar a assimilação de nutrientes ou regular seus níveis hormonais. Para isso, as bactérias realizam fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, solubilização de fosfato, solubilização de potássio e produção de sideróforos (SANTOYO et al., 2016).

2.4.1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio é um importante elemento para o crescimento de todos os seres vivos. Na agricultura, este e outros componentes como fósforo, enxofre e potássio tem relação direta com a produtividade agrícola. Neste contexto, a utilização da fixação biológica de nitrogênio (FBN) na agricultura tem papel importante para a sustentabilidade, pois desta forma, tem-se menor impacto ambiental ao diminuir o uso de fertilizante nitrogenado, já que nesse processo biológico o nitrogênio está mais disponível para as plantas e sofre menos perdas por lixiviação, volatilização ou desnitrificação (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

A FBN consiste na transformação do nitrogênio atmosférico, presente na forma N_2 , para uma forma que possa ser assimilada pelos organismos vivos. Este processo é feito por bactérias específicas que possuem a enzima nitrogenase, que converte o nitrogênio gasoso em amônia. A atividade dessa enzima é limitada na presença de oxigênio, e por isso, os microrganismos aeróbicos desenvolveram alternativas para realizarem a FBN, dentre elas: aumento da atividade respiratória, desenvolvimento preferencial em sítios microaerofílicos, produção de polissacarídeos extracelulares e formação de células especializadas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

As bactérias fixadoras de nitrogênio estão amplamente distribuídas no solo, com diferentes interações com a planta. Essas bactérias podem ser de vida livre (*Azotobacter chroococcum*, *Beijerinckia fluminensis*, *Azotobacter paspali*, *Derxia spp.*, *Paenebacillus azotofixans*), associativas (rizosfera e endofítica) (*Azospirillum spp.*, *Burkholderia spp.*,

Herbaspirillum spp.), ou simbiótica (*Allorhizobium spp.*, *Azorhizobium spp.*, *Bradyrhizobium spp.*, *Mesorhizobium spp.*, *Rhizobium spp.* e *Sinorhizobium spp.*) em relação às plantas (SINGH, 2015; CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

As simbióticas formam estruturas específicas nas raízes das plantas chamadas de nódulos, formando um ambiente estável e favorável a FBN. As outras associações são encontradas em gramíneas e outras monocotiledôneas e não geram estruturas específicas, assim, a variação ambiental interfere no processo de FBN. Logo, esse processo se torna menos eficiente em relação a interação simbiótica, mas, não menos importante por isso, tanto é que auxilia na redução no uso de adubação nitrogenada na agricultura que gera impactos ambientais (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

2.4.1.2 Produção e Regulação de Fitormônios

Em situações ambientais desfavoráveis, a síntese suficiente de fitormônios pelas plantas é comprometida e afeta seu crescimento. Nessas condições, o uso de microrganismos capazes de produzir esses hormônios e regula-los se torna uma ferramenta interessante para amenizar esses efeitos (SALAMONE et al. 2005). Alguns importantes são auxinas, citocininas, giberilinas e etileno.

As auxinas são comumente produzidas por BPCV, atuam principalmente no geotropismo e fototropismo, diferenciação do tecido vascular, dominância apical, iniciação da raiz, divisão celular e alongamento de caule e raiz (GROBELAK et al. 2015). Das variedades conhecidas, o ácido-indol-acético (IAA) tem destaque (SPAEPEN et al. 2007). O principal efeito do IAA produzido por rizobactérias é o aumento do comprimento da raiz e sua área de superfície, permitindo mais contato com o solo e assim maior absorção de nutrientes e água. A sensibilidade das plantas em relação a concentração de IAA é variável, e por isso, a quantidade de IAA exógeno pode gerar impacto positivo, com aumento do crescimento da raiz em relação ao controle, como pode gerar impactos negativos, diminuindo o crescimento da raiz (SPAEPEN et al. 2007, ALI; SABRI; HASNAIN, 2010). O fitormônio é sintetizado principalmente a partir do triptofano, com 5 vias possíveis (SPAEPEN et al. 2007).

As citocininas são um grupo de hormônios vegetais que promovem a divisão celular e desempenham um papel importante na regulação de vários processos biológicos associados ao crescimento ativo, metabolismo e desenvolvimento vegetal; são conhecidos por desempenhar

um papel na síntese e manutenção da clorofila e por influenciar o desenvolvimento e o metabolismo do cloroplasto; são conhecidos por atrasar a senescência; também afetam a translocação de nutrientes nas plantas; e também, desempenham um papel importante na integração de diversas respostas ao estresse ambiental (GIRON et al, 2013). Está associado com a formação de nódulos em leguminosas (FRUGIER et al. 2008) e a resposta ao estresse ambiental (ARKHIPOVA et al. 2007), atuando por isso na regulação do etileno e intervindo no crescimento da raiz (WERNER et al. 2003; GAMALERO; GLICK, 2011). De alguma forma, essa modulação hormonal atua no metabolismo primário e secundário da planta associado a mecanismos de defesa, participando, assim, da regulação do *trade-off* entre crescimento e defesa da planta (GIRON et al, 2013).

As giberelinas são conhecidas por estimular o crescimento e ativação de processos de crescimento como alongamento do caule, germinação de sementes, floração, crescimento e formação de raízes adventícias, assim como capilaridade da raiz (ZAIDI et al. 2015; BOTTINI; CASSÁN; PICCOLI, 2004), sendo justamente essas características da raiz a principal consequência da ausência desse hormônio (DODD et al, 2010).

O hormônio etileno é importante para controlar o desenvolvimento celular e crescimento na planta, assim como para auxiliar a planta em momentos de estresse (ABELES; MORGAN; SALTVEIT, 1992), como por exemplo presença de metais, temperaturas extremas, quantidade de água muito alta ou baixa, dano mecânico e fitopatógenos (ALI; CHARLES; GLICK, 2014; BARNAWAL et al. 2012). Em quantidades altas, afeta negativamente o desenvolvimento da planta, que ocorrem devido sua síntese em dois picos diferentes: o primeiro sendo mais baixo, quando há o uso do 1-aminociclopropano1-carboxilato (ACC) e ocorre expressão de genes relacionado a defesa; e o segundo pico, mais alto que o primeiro, com aumento do ACC em resposta ao estresse, passa a ser prejudicial a planta. Este segundo pico gera uma regulação acima da concentração normal de etileno, o que piora os efeitos do estresse que o desencadeou, logo é interessante diminuir de alguma forma esta regulação. Algumas BPCV produzem a ACC-deaminase, que diminuem a concentração de ACC na planta e conseqüentemente do etileno, diminuindo os efeitos do estresse (TOKLIKISHVILI et al, 2010; GLICK 2012; GLICK 2014). Além disso, a ACC deaminase facilita o funcionamento do IAA produzido pela bactéria, pois o aumento da auxina pode ativar a transcrição da enzima ACC-sintase, resultando no aumento nos níveis de ACC e

consequentemente na quantidade de etileno na planta (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017).

2.4.1.3 Solubilização de fosfato

A solubilização de fosfato é realizada por bactérias específicas como *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* e *Azospirillum* (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017). Esse processo torna o fósforo insolúvel orgânico ou inorgânico acessível para as plantas, sem prejudicar o meio ambiente. As leguminosas e gramíneas apresentam grande incidência desses microrganismos solubilizadores, também chamados de mobilizadores de fósforo, em sua rizosfera e, consequentemente, nos solos cultivados com estas plantas (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982; CARDOSO; ADREOTE, 2016). A solubilização de fósforo inorgânico está associada a liberação de íons hidróxido, sideróforos, CO₂, e principalmente ácidos orgânicos (como ácido glucônico) e seus prótons, que dissolvem diretamente o fósforo ou quelam o cátion associado ao ânion fosfato, liberando-o para o sistema (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; CARDOSO; ADREOTE, 2016). Outra forma de solubilização de fósforo inorgânico ocorre com a assimilação de NH₄⁺ nas células, onde ocorre a liberação de H⁺ que solubiliza o fósforo sem a utilização de ácidos (ILLMER; SCHINNER, 1995; ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017). Enquanto isso, as bactérias apresentam papel crucial para a solubilização de fósforo orgânico, já que esses estão presentes em compostos de alta massa molecular e precisam ser clivados em moléculas menores antes de serem assimiladas (PEIX et al, 2001). Essas moléculas são clivadas por enzimas (fosfatases), como a fitase (CARDOSO; ADREOTE, 2016).

2.4.1.4 Sideróforos

Sideróforos são pequenas moléculas peptídicas capazes de se ligar ao ferro (Fe⁺³) presente no solo e insolúvel, como ferro hidróxidos, oxihidróxidos e óxidos, possibilitando seu transporte e absorção pelas células bacterianas e plantas (BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016). Esses sideróforos desempenham papel importante para a absorção de ferro pelas plantas, sendo essa a principal forma de obtenção desse micronutriente, já que a maior parte do ferro presente no solo está

naturalmente indisponível para absorção e o pouco disponível se torna um agente competitivo entre bactérias, fungos e plantas (GAMALERO; GLICK, 2011).

A produção de sideróforos por bactérias ocorre em meio deficiente em ferro (GARIBALDI; NEILANDS, 1956). As bactérias sintetizam sideróforos também apresentam receptores celulares capazes de se ligar ao complexo ferro-sideróforo, absorvendo-o e reduzido para o estado Fe^{+2} . Além de suprir a necessidade de ferro por plantas e aumentar a concentração do micronutriente na planta (RENGEL; BATTEN; CROWLEY, 1999), os sideróforos também atuam no biocontrole ao reduzir a disponibilidade de ferro para fitopatógenos (SHEN et al., 2013), já que os sideróforos produzidos por BPCV possuem mais afinidade pelo ferro do que os produzidos por plantas ou fungos (SAHA et al. 2012; OLANREWAJU; GLICK ; BABALOLA, 2017).

2.4.2 Mecanismos de ação indireta das BPCV para crescimento vegetal

Na contribuição indireta, as bactérias impedem o crescimento e/ou funcionamento de um ou mais microrganismos patogênicos à planta. De forma geral, os microrganismos atuam de duas formas nesse controle: através da interação micróbio-micróbio, que envolve mecanismos como antagonismo (liberação de substâncias anti-microbianas e enzimas) competição e *quorum quenching*; e a partir da estimulação do sistema imune da planta ou *priming* (SANTOYO et al, 2016; OLANREWAJU; GLICK ; BABALOLA, 2017; TEIXEIRA, 2019).

2.4.2.1 Substâncias anti-microbianas

Algumas BPCV, principalmente dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, produzem uma ou mais substâncias antimicrobianas, como antibióticos e/ou bacteriocinas, que impedem o crescimento e desenvolvimento de fitopatógenos (SIDDIQUI, 2006). Ao produzir estas substâncias e impedir o crescimento de outros microrganismos, essas BPCV possuem mais nutrientes e menos competição, criando um ambiente favorável para elas e, facilitando suas atividades para promover o crescimento da planta (GLICK, 2020).

Importante ressaltar que o antibiótico produzido por essas bactérias se mostra específico, sendo os resultados encontrados em experimentos *in vitro* para uma cepa

específica de fitopatógeno diferentes ao serem testados em campo e contra diferentes cepas da mesma espécie (GLICK, 2020). As bactérias que atuam sobre fitopatógenos de forma mais ampla geralmente possuem mais de um mecanismo de biocontrole, como por exemplo a *Burkholderia gladioli*, encontrada em um milho nativo do México, que possui diversos mecanismos contra fungos fitopatogênicos (quitinases, antibióticos de fenazina, síntese de bacteriocina e capacidade de sintetizar compostos orgânicos voláteis) (GLICK, 2020). Além da ação direta, essas substâncias também podem desencadear a resistência sistêmica induzida (RSI) na planta, o que contribui para a supressão da doença, conferindo uma vantagem competitiva aos agentes de biocontrole. (SIDDIQUI, 2006)

2.4.2.2 *Competição*

Algumas BPCV conseguem competir com fitopatógenos por nutrientes e nichos na superfície da raiz, limitando a incidência da doença ao impedir a ligação do fitopatógeno a planta e dificulta sua proliferação (OLANREWAJU; GLICK ; BABALOLA, 2017; GLICK, 2020). Essas bactérias realizam por exemplo degradação de compostos orgânicos ou sequestro de micronutrientes necessários para o crescimento de microrganismos (GAMALERO; GLICK, 2011).

Algumas plantas secretam espécies reativas de oxigênio pela raiz, inibindo o processo celular do fitopatógeno. Essa produção também pode ser ativada com a presença de algumas BPCV. Assim como alguns fitopatógenos contem enzimas capazes de reduzir a quantidade dessas espécies ativas de oxigênio para sobreviver, é interessante que algumas BPCV também possam sobreviver neste ambiente, podendo ser modificadas geneticamente para serem, desta forma, mais competitivas neste ambiente, persistindo mais na rizosfera e sendo efetiva no biocontrole (GLICK, 2020).

2.4.2.3 *Resistência Sistêmica*

A indução de uma resistência sistêmica pode ser feita a partir de fatores químicos ou bióticos via patógenos ou BPCV, e caracteriza-se por ser de longa duração e amplo espectro (GLICK, 2020). Esse estado é caracterizado pela ativação sistêmica de mecanismos de defesa latentes que são expressos ao ataque de patógenos ou insetos herbívoros (PIETERSE, 2014).

Quando essa resistência é ativada por fatores químicos ou por fitopatógenos, ela é nomeada resistência sistêmica adquirida (RSA), caracterizada pela ativação e expressão dos genes relacionados a patogênese e é regulado pela via do ácido salicílico.

Quando a resistência é ativada por BPCV, ela é nomeada como resistência sistêmica induzida (RSI), e tem sido caracterizada pelo aumento da lignificação e aumento da atividade da peroxidase e superóxido dismutase na planta tratada, sendo regulado pelo ácido jasmônico e etileno. Importante salientar que, embora a regulação da RSI ocorra pelo ácido jasmônico e etileno, ela ocorre principalmente pelo aumento da sensibilidade da planta a essa regulação, não necessariamente ao aumento da síntese dos mesmos (GLICK, 2020). O que ocorre principalmente na RSI é a sensibilização da planta em resposta ao fitopatógeno ao invés da ativação contínua dos genes de defesa, promovendo uma resposta imune sistêmica mais rápida e forte (PIETERSE, 2014).

Alguns componentes e agentes produzidos por essas bactérias que ativam a RSI (elicitores) são: componentes da membrana externa bacteriana (como flagelos e cadeia lateral O-antigênica de lipopolissacarídeo), sideróforos e o ácido salicílico. A ativação dos elicitores das BPCV é dependente da espécie de planta relacionada, logo, uma cepa que consegue ativar a RSI de uma espécie de planta não necessariamente ativará de outra planta (GLICK, 2020).

De acordo com Van Loon (2007), alguns dos principais mecanismos nos quais BPCV podem induzir RSI em plantas estão relacionados: ao crescimento da planta, no qual uma planta mais desenvolvida consegue resistir mais ao ataque do patógeno; redução da expressão do sintoma, diminuindo o efeito do estresse causado pelo etileno a partir da ACC-deaminase e outros microrganismos sem ter efeito na população do fitopatógeno; a alteração na população microbiana do solo, que pode ocorrer devido a mudança na estrutura da raiz da planta provocada por BPCV, e/ou mudança na composição do exsudato e/ou *quorum sensing*; e podem ativar os mecanismos de defesa da planta, como reforço da parede celular, produção de fitoalexinas antimicrobianas, síntese de proteínas PR e aumentar a resposta de defesa da planta diante de um patógeno (conhecido como *priming*).

2.5 *Azospirillum*: PRINCIPAIS MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E BIOCONTROLE

Bactérias do gênero *Azospirillum* são diazotróficas e de vida livre, possuem formato de bastonete, são gram-negativas, microaerófilas, não fermentativas e quimioorganotróficas pertencentes à classe Alfa-proteobacteria. As bactérias desse gênero possuem vários estudos que abordam sua capacidade de promover crescimento em plantas, tanto em escala laboratorial como no campo, sendo segura e que pode ser utilizada em nível comercial. Podem promover crescimento de várias culturas como trigo, arroz e milho, mas também já foram encontradas em cafeeiros, plantas frutíferas e orquídeas, estando presente em diversos habitats (MEHNAZ, 2014; CARDOSO, ANDREOTE, 2016). Essa bactéria associa-se principalmente na superfície das raízes dessas plantas e algumas cepas são capazes de colonizar a parte interna da raiz (endofíticas) (DÖBEREINER, 1995; TORTORA, 2011).

Descoberta na década de 1970, o gênero foi descrito como BPCV por sua capacidade de fixar nitrogênio e produzir fitormônios. Atualmente, são descritas 20 espécies, sendo as mais estudadas *A.brasilense* e *A. lipoferum* (BALDANI, BALDANI 2005; FIBACH-PALDI; BURDMAN; OKON, 2011). Mas, vários trabalhos descrevem outros mecanismos utilizados pela bactéria para promover o crescimento da planta, dentre eles está a solubilização de fósforo, mitigação de estresse abiótico e controle biológico (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; FUKAMI, 2018)

Inicialmente, a fixação de nitrogênio foi descrita como o principal mecanismo para explicar a capacidade da bactéria de promover o crescimento da planta. Estudos mostraram que a inoculação aumentou significativamente o teor total de nitrogênio em brotos e grãos nas plantas cultivadas, reduziu as doses necessárias de fertilização nitrogenada para muitas espécies de plantas, além de contribuir para melhorar o balanço de N das plantas (FANCELLI, 2010; FUKAMI; CEREZINI; MEHNAZ, 2014; CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; HUNGRIA, 2018). Porém, sendo de vida livre e sem capacidade de criar nódulos, é interessante entender o quanto a bactéria transfere desse nitrogênio fixado para a planta. Estudos mostram que a fixação do nitrogênio pela bactéria para a planta varia de 5 a 18% do nitrogênio adquirido pela planta (BASHAN; DE-BASHAN, 2010). Também, trabalhos sugerem que o potencial da bactéria em fixar o nitrogênio varia entre cepas e cultivares; a presença ou não de algum elemento no exsudato (como fonte de carbono) pode influenciar na transferência de N para a planta pela bactéria (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; CASSÁN et al., 2020).

Além da capacidade de fixar nitrogênio, a produção de fitormônios, principalmente de auxinas, também é um importante mecanismo descrito. Plantas inoculadas com essa bactéria tem crescimento diferenciado na raiz, como aumento no número e comprimento dos pelos radiculares, número de raízes laterais, aumento no diâmetro e comprimento das raízes laterais e raízes adventícias; e área de superfície da raiz (MEHNAZ, 2014). Com a raiz mais desenvolvida, as plantas tem mais capacidade de adquirir água e nutrientes (incluindo N), e assim, melhor crescimento. Essa capacidade é mediada pela colonização bacteriana e/ou sua capacidade de produzir fitormônios (CASSÁN et al., 2020). Além disso, uma raiz mais desenvolvida consegue fornecer mais exsudatos e possibilita maior interação com outros microrganismos benéficos (CASSÁN et al., 2020).

Outro benefício das bactérias do gênero *Azospirillum* é sua atuação contra os estresses abiótico e biótico. Na maioria dos trabalhos envolvendo biocontrole com bactérias do gênero *Azospirillum*, os resultados mostram a resistência sistêmica induzida (RSI) como principal mecanismo utilizado.

No trabalho de Viejobueno et. al. (2021), cepas de *A.brasilense* isoladas de morangueiro e petúnia (REC3, 2A1, 2A2, e 2E1) foram testadas contra o patógeno *Macrophomina phaseolina* tanto in vitro como in vivo, tendo resultado apenas in vivo devido a RSI, pois as plantas inoculadas possuíam estômatos mais fechados e maior deposição de calose e lignina.

Mehmood (2021) testaram tratamento foliar de plantas de batata com *Azospirillum lipoferum* contra *Alternaria solani* e tiveram resultados positivos. Observaram que a bactéria aumentou significativamente a quantidade de fenólicos totais, a atividade de enzimas relacionadas à defesa e os níveis de expressão do gene PR, além de que a planta tratada respondeu ao ataque do patógeno com aumento dos níveis de ácido salicílico e H₂O₂, assim como foi observado redução da morte celular.

Trabalhos de Tortora et al. (2011 e 2012) com cepa de *A. brasilense* REC3 isolada de morangueiro, que sintetiza sideróforos, mostraram que esta cepa é capaz de competir em meio de cultura contra *Colletotrichum acutatum*. Além disso, essa bactéria mostrou-se capaz de produzir ácido salicílico (AS) e ativar genes relacionados a defesa, que podem ter sido responsáveis pela modificação estrutural da parede celular com aumento de compostos fenólicos e acúmulo de calose, principalmente quando a planta foi infectada pelo fungo.

Trabalhos de Yasuda (2009) e Fujita et al (2017) utilizaram a cepa *Azospirillum* sp. B510, respectivamente, em arroz contra *X. oryzae* pv. *Oryzaecontra*, e em tomate contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in vivo, mostrando resultados positivos em ambos os casos. Ao contrário dos anteriores, não ocorreu acúmulo de AS ou expressão de genes relacionados a resistência, logo, concluíram que ocorreu *priming* e RSI.

Trabalho de Parmasi et al (2019) mostra *A. brasilense* sendo efetivo ao diminuir a severidade da doença causada pelo fungo *Ascochyta rabiei* em planta de grão-de-bico em duas cultivares diferentes, sendo uma resistente e outra suscetível a doença. O trabalho teve como objetivo avaliar se a bactéria *A. brasilense* não apenas auxilia no controle da doença, mas também se ela aumenta a resistência na expressão dos genes de resistência já presentes na planta. Em ambas cultivares a bactéria diminuiu a severidade da doença, além de ter aumento da expressão de um dos genes de resistência presente na cultivar resistente.

No trabalho de Sankari et al. (2011), foi testado o uso de exopolissacarídeo (EPS) sintetizado por *Azospirillum*, com resultados positivos ao ser utilizado em arroz tanto no crescimento como no biocontrole do patógeno *Pyricularia oryzae* pelo mecanismo de RSI.

2.6 MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE BPCV

Técnicas de inoculação de BPCV influenciam no estabelecimento e persistência do microrganismo na rizosfera, de forma que gere seus efeitos no crescimento na planta. Além do método de inoculação e a quantia utilizada de inóculo, a colonização na rizosfera também é um fator importante para a interação planta-microrganismo, no qual existem variáveis que interferem nesta resposta como por exemplo, multiplicação e distribuição do microrganismo na rizosfera, antagonismo microbiano, humidade do solo, pH, temperatura, exudatos e estágio fenológico da planta. Dentre os métodos utilizados, tem-se a inoculação pela semente, pela raiz e no solo. Além destes, também tem-se abordado recentemente a inoculação foliar (LOPES; DIAS-FILHO; GURGEL, 2021).

A inoculação pela semente é a mais recorrente no campo e ocorre de duas formas: a semente é mantida em contato com o inóculo por determinado tempo, sendo posteriormente plantado; ou o inóculo é aplicado via sulco, no momento do plantio. Neste método, o inóculo se mantém dormente no solo, até o crescimento da raiz. Dependendo das condições ambientais, é necessário realizar mais uma inoculação para manter a densidade microbiana

(MÜLLER et al 2015; FUKAMI; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016; CORREIA et al 2019; LOPES; DIAS-FILHO; GURGEL, 2021).

A inoculação pela raiz consiste em imergir as raízes no inóculo, sendo posteriormente plantadas. As principais vantagens deste método consistem na padronização do tamanho das plantas no qual serão inoculadas, assim como garante que a BPCV entre em contato diretamente pela raiz, o que melhora sua colonização. Além disso, este método pode ser eficiente para defender a planta de fitopatógenos que podem atuar na raiz no momento do plantio. (ROMEIRO, 2007; AHMED; KIBRET, 2014; GOUDA et al., 2018)

Na inoculação no solo, alguns dos métodos utilizados são: aplicação do inóculo diretamente no solo perto da raiz, incorporação no substrato ou microcápsulas (ROMEIRO, 2007; HERNÁNDEZ-MONTIEL et al., 2017; PRISA, 2020). Dentre as principais vantagens, está a aplicação do microrganismo com a raiz da planta, que já está formada no solo, e evita o contato do inóculo com aleloquímicos incompatíveis que são liberados durante a germinação de algumas espécies de plantas. Sobre as microcápsulas, estas protegem e mantêm a viabilidade do inóculo e realiza liberação dos microrganismos de forma gradual, no qual garante melhor adesão, estabilidade e colonização de raízes (HERNÁNDEZ-MONTIEL et al., 2017).

A inoculação foliar consiste em aplicar o inóculo pela folha via spray. É a menos documentada e utilizada, mas apresenta estudos que demonstram seu efeito positivo no crescimento e produtividade de plantas. Possui como principal vantagem a possibilidade de incluir o uso de herbicidas e fungicidas no campo sem interferir na viabilidade do inóculo (FUKAMI et al, 2016; PUENTE et al 2017; FUKAMI; CEREZINI; HUNGRIA, 2018; CARDOZO; DI PALMA; MARTIN, 2021).

A decisão de qual método de inoculação usar deve ser baseado no conhecimento dos estágios de crescimento da planta, tanto devido a liberação de aleloquímicos como também pelas características morfológicas, e também nas condições do solo. Por exemplo, algumas espécies liberam mais aleloquímicos durante a germinação, sendo por isso mais promissor a inoculação na raiz ou no solo. Por outro lado, no caso de raízes pivotantes, a parede celular é mais densa, o que pode interferir na adesão e colonização da BPCV, sendo mais adequado um método de inoculação em sementes (LOPES; DIAS-FILHO; GURGEL, 2021). Com relação ao solo, a alta salinidade e teor de metais pesados podem interferir no sucesso da colonização,

sendo interessante para estes casos a inoculação na raiz ou no solo (GROBELAK; NAPORA; KACPRZAK, 2015; LI; JIANG, 2017)

Logo, é importante conhecer e aplicar novas estratégias no controle de doenças. Diante de trabalhos com resultados positivo no uso das BPCV para esse fim, dentre elas no controle da antracnose com resultados positivos (PLANCHAMP; GLAUSER; MAUCH-MANI, 2015; TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011), é relevante experimentar a aplicação de espécies bacterianas não usadas rotineiramente para combater doenças causadas por fitopatógenos, como nos trabalhos de Sudhakar et al. (2000) e Dall'Asta (2018), e neste projeto, avaliar o uso da bactéria *A. brasilense* contra *C. graminicola* no milho.

3 OBJETIVOS

Avaliar a capacidade da bactéria *Azospirillum brasiliense* FP2 de controlar o desenvolvimento da doença antracnose no milho, causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola*, tanto *in vitro* como na planta com dois métodos de inoculação, observando as variações do crescimento causadas por eles.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a atividade antagonista da bactéria *A.brasilense* contra o fungo *C.graminicola* *in vitro*.
- Avaliar o efeito da bactéria *A. brasilense* no milho, a partir da inoculação na semente e na folha, para o controle da severidade da antracnose no início do estágio vegetativo do milho.
- Avaliar o efeito da bactéria *A. brasilense* no milho, a partir da inoculação na semente e na folha, e do fungo no crescimento da raiz e da parte aérea de milho no início do estágio vegetativo do milho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS E CRIAÇÃO DO INÓCULO

A cepa de *Azospirillum brasilense* FP2 foi inoculada em placas de Petri com meio de cultura NFbHPN (MACHADO et al. 1991) e incubada por 48 h a 30°C para obter a colônia pura. Após isso, a cultura pura foi posta em 30 mL do meio NFbHPN suplementado com lactato de sódio na concentração de 5 mg/L, assim como de antibióticos estreptomicina até a concentração de 80 µg/mL e ácido nalidixico a 10 µg/mL. Esta cultura cresceu em Shaker a 120 rpm até atingir OD₆₀₀ 0,8, sendo aproximadamente igual a 10⁸ células/mL. Para obter o precipitado, a cultura bacteriana foi centrifugada a 12000 g, por 2 min, e suspensa em meio NFb. Para confirmar a concentração utilizada no inóculo, foi realizada diluição seriada em placas de Petri com NFbHPN ágar com solução salina de 0,9% NaOH. As placas foram incubadas por 72 h a 30 °C, sendo as colônias formadas contadas.

O isolado de *Colletotrichum graminicola* MANE53 (Chapecó-SC) foi obtido da coleção micológica do Laboratório de Fitopatologia, UFSC. O fungo foi cultivado em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) para o experimento em casa de vegetação e FAA (Farinha de Aveia Ágar) para os ensaios *in vitro* a 25 °C, sendo incubado por 14 dias em luz fluorescente com fotoperíodo de 12 h. Para fazer o inóculo, as colônias foram raspadas com auxílio de uma espátula e água destilada autoclavada, filtradas utilizando dupla camadas de gaze. A concentração de conídios formada na suspensão foi calculada através da câmara de Neubauer, sendo ajustado para a concentração necessária para o experimento *in vitro* ou *in vivo*.

4.2 ENSAIO IN VITRO

No teste *in vitro*, para possibilitar o crescimento de ambos microrganismos no mesmo meio de cultivo, foi feito um meio alterado a partir de BDA, onde em 1 litro desse meio foi adicionado 2 mL de solução nutritiva (1 g de Na₂MoO₄.2H₂O, 1,175 g de MnSO₄.H₂O, 1,4 g de H₃BO₃, 0,04 g de CuSO₄.5H₂O e 0,12 g de ZnSO₄.7H₂O) e 5 g de ácido málico. O pH final foi ajustado para 6,8 com KOH (TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA. 2011).

Foram realizados dois ensaios diferentes, em ambos tiveram como tratamentos placas contendo apenas a bactéria, placas contendo apenas o fungo e placas contendo os dois microrganismos; com 4 repetições.

As condições de crescimento utilizadas para o crescimento de cada microrganismo foram as mesmas descritas anteriormente. Para fazer o inóculo bacteriano, foi posto solução salina (0,9%) em placas com colônias da bactéria, crescidas em meio NFbHPN por 48 h, transferindo as bactérias para a solução salina. Esta suspensão formada foi coletada e utilizada como inóculo, sendo a concentração obtida de $1,4 \cdot 10^5$ UFC/mL, confirmada por diluição seriada.

No primeiro ensaio, foi adicionado 10 μ L da suspensão bacteriana, na concentração de $1,4 \cdot 10^5$ UFC/mL, próximo a uma extremidade da placa de Petri contendo meio BDA alterado, e na outra extremidade da mesma placa, um disco de 0,8 cm com a colônia de *C.graminicola*, distanciadas em 5 cm. As placas foram mantidas em BOD a 26 ± 2 °C e avaliados 12 dias depois.

No segundo ensaio, 10 μ L de inóculo de *A. brasilense* ($1,4 \cdot 10^5$ UFC/mL) foi adicionado no centro da placa contendo BDA modificado, sendo crescida a 30 °C por 48 h. Para a inoculação do fungo via spray (aplicado 0,5 mL por placa), foi feito inóculo de *C.graminicola* da mesma forma que citado anteriormente, na concentração $1,5 \cdot 10^5$ conídios/ml. As placas contendo os dois microrganismos foram mantidas em BOD a 26 ± 2 °C e a avaliação do antagonismo realizada 7 dias após a aplicação do fungo (TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA. 2011).

4.3 PREPARO DO EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO

O experimento foi montado na casa de vegetação do Laboratório de Fitopatologia, localizado na UFSC, de 16 de Março a 10 de Abril de 2020; em delineamento completamente casualizado (DCC) com 4 repetições. Foram 6 tratamentos no total, sendo eles: tratamento com *A.brasilense* no momento do semeio (AbS); tratamento com inoculação de *A.brasilense* na folha (AbF), aos 7 dias após o semeio (DAS) no estágio V2; tratamento com *A.brasilense* no momento do semeio mais inoculação do *C.graminicola* na folha (AbS+Cg), tratamento com *A.brasilense* na folha (AbF), aos 7 DAS no estágio V2 mais *C.graminicola* na folha

(AbF+Cg), tratamento com *C.graminicola* via foliar (Cg); e controle. A aplicação de *C.graminicola* ocorreu 7 DAS.

O substrato utilizado foi obtido a partir de um Latossolo Vermelho esterilizado. Este foi autoclavado durante 1 h, duas vezes com intervalo de 72 h cada autoclavagem (WOLF; SKIPPER, 1994), sendo postos em vasos de 3,2 L. O semeio foi realizado em três covas equidistantes abertas no substrato de cada vaso. Foi semeada uma semente por cova da cultivar híbrido DOW 20A55, que foram desinfestadas com etanol por 3 minutos e solução de hipoclorito de sódio 2% com Tween 20 2,5% por 30 minutos. Aos 7 DAS, realizou-se o raleamento para 2 plantas por vaso.

A inoculação do *A.brasilense* ocorreu via semente (AbS) no momento do semeio em cova, sendo aplicado 1 mL do inóculo na concentração de 10^7 células/mL diretamente na semente. Na inoculação foliar (AbF), foi utilizado a mesma concentração e quantia de inóculo por planta, utilizando um aspersor para aplicação do inóculo aos 7 DAS, no estágio V2. Em ambos os casos, no controle, foi inoculado o meio de cultura puro.

A inoculação do fungo (Cg, AbS+Cg e AbF+Cg) foi realizada aos 7 DAS. Aplicou-se 5 mL por planta do inóculo com concentração de 1.10^5 conídios/mL, sendo mantidas em câmara úmida escura por 48 h e retornados para casa de vegetação. No controle, foi realizado inoculação com água destilada autoclavada.

Nos tratamentos AbF+Cg, a inoculação de ambos os microrganismos ocorreu no mesmo dia, aos 7 DAS. Inicialmente, foi realizado a inoculação da bactéria, e 3 h depois o fungo, ambos nas mesmas concentrações já citadas.

4.4 AVALIAÇÃO DE SEVERIDADE DA DOENÇA E CRESCIMENTO DA PLANTA

A análise da severidade da doença e controle pela inoculação da bactéria foi realizada 5 dias após a aplicação do fungo, 12 DAS, no V2. Em cada tratamento (Cg, AbS+Cg e AbF+Cg) foi escaneado duas folhas, completamente expandidas, de cada planta, totalizando 4 folhas por vaso. Assim, foi calculado a área foliar necrosada e a área total da folha com o programa Image J, sendo obtido a severidade, em porcentagem, com a divisão desses dois valores, área lesionada por área total (SASAN e BIDOCHKA, 2013). Destas amostras, e dos demais tratamentos (AbS, AbF e controle) foram avaliadas o comprimento da raiz e parte aérea, medidos a partir da base da planta até as extremidades, com uso de uma régua

milimétrica, e o crescimento da massa fresca da parte aérea e raiz, com auxílio de uma balança semi-analítica. A avaliação dos efeitos dos tratamentos no crescimento do milho foi repetida aos 19 e 26 DAS.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O *Statistical Analysis Software*® (SAS®) foi utilizado para análise estatística dos dados usando os *Procedures* ProcGLM e ProcMIXED. Inicialmente, foram verificados os pressupostos da análise de variância (homoscedasticidade por Brown-Forsythe e normalidade por Shapiro-Wilk) para resíduos do modelo.

Os outliers identificados (HENDRA; STAUM, 2010), foram removidos das próximas análises (APÊNDICE A). Foi removido um outlier de cada vez, priorizando os que apresentavam maior resíduo, e refeito os pressupostos da análise de variância para seguir com as análises.

Para o efeito do patógeno nas plantas tratadas com a bactéria (folha e semente) 5 dias após inoculação do fungo (12 DAS), foram realizadas análise de variância e a comparação de médias por Student-Newman-Keuls (SNK) utilizando código ProcGLM, para avaliar a severidade da doença, massa fresca e comprimento da raiz e da parte aérea. Para o efeito da bactéria no crescimento da planta aos 12, 19 e 26 DAS foram consideradas a análise de variância e a comparação de médias a partir dos modelos mistos, utilizando o código ProcMIXED do programa, onde foram considerados os tratamentos como efeito fixo e as épocas de avaliação como efeito aleatório. Neste teste foram avaliados apenas os parâmetros de crescimento medidos, sendo eles massa fresca e comprimento da raiz e parte aérea.

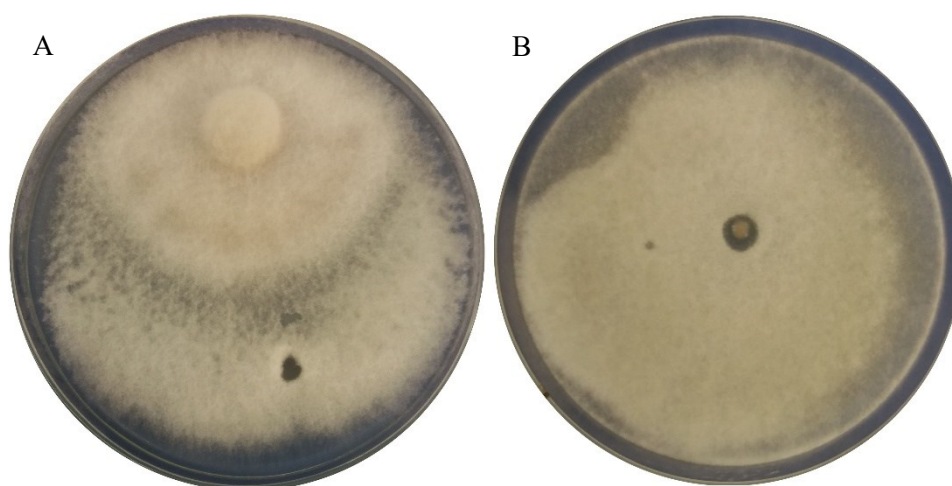
5 RESULTADOS

5.1 ENSAIO IN VITRO

Para verificar o antagonismo da bactéria contra o fungo, dois ensaios *in vitro* foram realizados, nos quais verificamos diferentes resultados (Figura 3).

Quando ambos os microrganismos foram inoculados ao mesmo tempo e crescidos a 26 °C, não houve formação de halo de inibição, porém, não houve sobreposição do fungo na colônia bacteriana crescida, como observado na Figura 3A. No segundo caso, a bactéria crescida a 30 °C por 48 h formou halo de inibição com média de 1,13 ($\pm 0,01$) mm.

Figura 2: Fotos de placas de Petri dos dois ensaios *in vitro*, sendo A do primeiro ensaio e B do segundo ensaio, com os dois microrganismos.



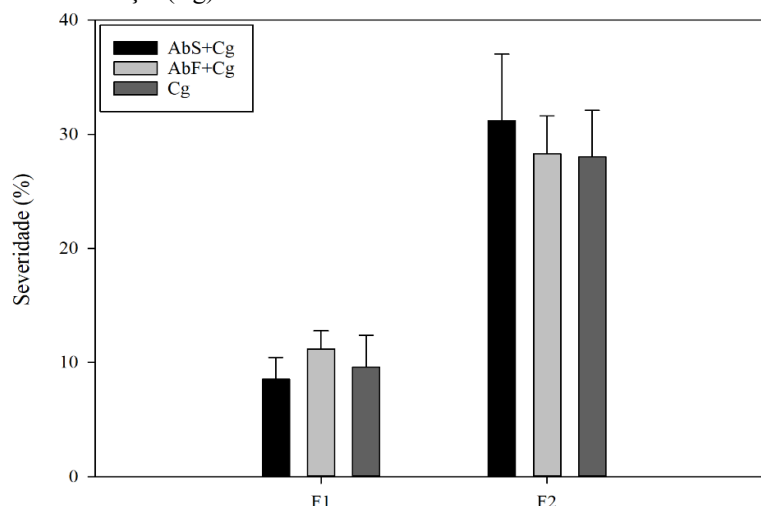
5.2 EFEITO DA CO-INOCULAÇÃO NA SEVERIDADE DA ANTRACNOSE E NO CRESCIMENTO DA PLANTA.

Inicialmente, a aplicação de *C.graminicola* foi planejada para ocorrer em 3 tempos diferentes: 7, 14 e 21 DAS (DALL'ASTA, 2018). Porém, só foi realizada inoculação do fungo no tempo 7, devido obtenção insuficiente de inóculo nos outros tempos.

A Figura 3 e Tabela 2 apresentam os resultados obtidos da severidade da doença, após 5 dias da inoculação do patógeno, aos 12 DAS. A severidade da doença variou em média, 9,8% a 29,2% para primeira (F1) e segunda folha (F2) do milho respectivamente. Não houve

controle na severidade dos sintomas foliares causado pelo patógeno com a inoculação da bactéria via semente ou foliar, na condição inicial de crescimento do milho. A primeira folha completamente expandida (F1) teve aproximadamente 9,6% de severidade sem tratamento com a bactéria, enquanto a inoculação bacteriana no momento do plantio e na folha em estágio V2 foi respectivamente de 8,5% e 11,2%, com diferenças não significativas entre os tratamentos. A severidade na segunda folha completamente expandida (F2) chegou a 28% sem tratamento com a bactéria, enquanto a inoculação bacteriana no momento do plantio foi de 31,2% e na folha 28%, ambos sem diferenças estatísticas.

Figura 3: Severidade da antracnose (*C.graminicola*) em folhas de milho (F1 e F2), aos 7 DAS, em casa de vegetação, com inoculação da bactéria (*A.brasilense*), na semente (ABS+Cg), na folha (ABf+Cg) e sem co-inoculação (Cg).



Em relação ao crescimento da planta com os microrganismos (Figura 5 e Tabela 3), observa-se que a inoculação da bactéria e do fungo isoladamente não alterou o comprimento e a massa fresca da raiz e da parte aérea aos 12 DAS, entretanto, quando combinados, esses parâmetros são alterados, afetando o crescimento da planta.

Tabela 2: Resumo da análise de variância para severidade da doença nas folhas de milho (F1 e F2), aos 12 DAS, em casa de vegetação, com inoculação da bactéria *A. brasilense* na semente (AbS+Cg), na folha (AbF+Cg) e sem inoculação da bactéria (Cg). GL: graus de liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: quadrados médios.

Varição	GL	SQ	QM	F	P
F1					
Entre grupos	2	14.5	7.2	0.39	0.69
Resíduo	9	16.9	18.7		
Total	11				
Média	9.8	CV	44,4%		
F2					
Entre grupos	2	23.8	11.9	0.15	0.86
Resíduo	8	637.3	79.7		
Total	16				
Média	29.3	CV	30,4%		

O crescimento no comprimento da raiz do controle de 33,9 cm não se diferiu do tratado pela bactéria na semente (34,44 cm) na folha (29,5 cm) e do tratado com o fungo (33,8 cm). No entanto, houve redução no comprimento das raízes nas plantas tratadas com ambos, bactéria e patógeno, tanto no momento do plantio como na folha, sendo respectivamente 26,2 cm e 26,9 cm. Neste caso, entre as plantas doentes, o comprimento da raiz de plantas tratadas com bactéria ficou abaixo do comprimento daquelas encontradas na planta controle.

No comprimento da parte aérea (Figura 4), observa-se que a presença do patógeno (35,9 cm) e a inoculação da bactéria na semente (32,2 cm) gerou efeitos negativos ao comparar com o controle (41,1 cm) e as plantas tratadas com bactéria na folha (39,2 cm). Assim como observado no comprimento da raiz, as plantas tratadas com a bactéria e o fungo tiveram menor crescimento na parte aérea na presença do patógeno (31,8 cm) em comparação ao inoculado exclusivamente com o fungo (35,9 cm).

A presença do patógeno não afetou a massa fresca de raízes (1,83 g), não sendo diferente estatisticamente do controle (2,09 g) e da planta tratada com bactéria no momento do plantio (2,57 g). No entanto, a planta tratada com a bactéria na folha gerou menor crescimento de massa fresca com a presença do patógeno (1,42 g) em relação aos outros tratamentos.

Por fim, quanto a massa fresca da parte aérea, não tem diferença estatística entre o controle (2,57 g) e o tratamento da bactéria na folha (2,22 g). Percebe-se também que não

houve diferença estatística entre os tratados com patógeno (1,68 g) e os tratamentos que receberam o patógeno e a bactéria, tanto no momento do plantio (1,40 g) como na folha (1,45 g). Importante ressaltar que a massa fresca da parte aérea foi afetada pela doença ao comparar as plantas doentes (tanto com inoculação como sem inoculação da bactéria) com o controle.

Figura 4: Crescimento do milho, aos 12 DAS, em decorrência da inoculação de *A.brasilense* e *C.graminicola*. CR, comprimento da raiz; CA, comprimento da parte aérea; MFR, massa fresca da raiz; MFA, massa fresca da parte aérea. Tratamentos com a mesma letra não se diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

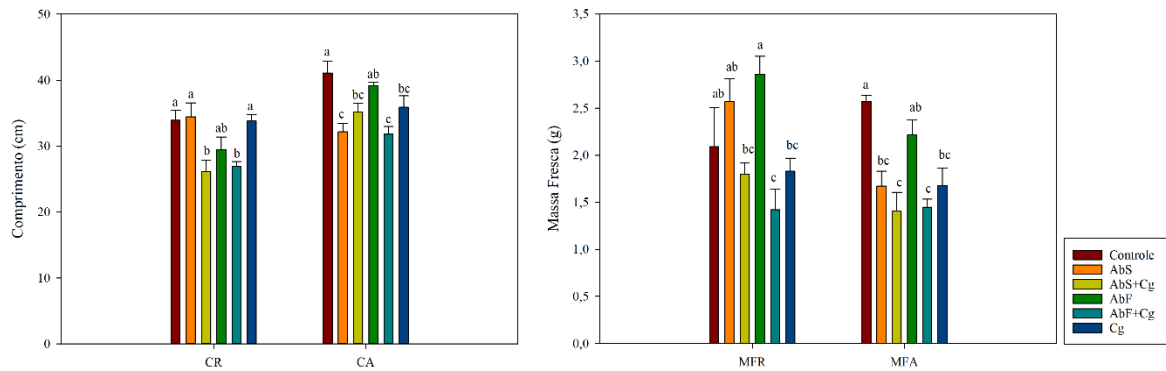


Tabela 3: Resultados estatísticos dos parâmetros avaliados no crescimento do milho em decorrência da inoculação de *A.brasilense* e *C. graminicola*.

	GL	SQ	QM	Valor F	P
Comprimento da raiz					
Entre grupos	5	258,521	51,704	5,48	0,0035*
Resíduo	17	160,354	9,432		
Total	22	418,875			
Média	31,00	CV	9,907269		
Comprimento Parte Aérea					
Entre grupos	5	234,028	46,806	7,33	0,0012*
Resíduo	15	95,781	6,385		
Total	20	329,809			
Média	35,85	CV	7,049579		
Massa Fresca Raiz					
Entre grupos	5	5,680	1,136	6,18	0,0019*
Resíduo	17	3,124	0,184		
Total	22	8,803			
Média	2,15	CV	23,26606		
Massa Fresca parte Aérea					
Entre grupos	5	3,716	0,743	8,09	0,0006*
Resíduo	16	1,47	0,092		
Total	21	5,186			
Média	1,80	CV	16,79349		

5.3 EFEITO NO CRESCIMENTO DO MILHO COM INOCULAÇÃO DE *A.brasilense* NO MOMENTO DO PLANTIO E NA FOLHA

Os resultados obtidos na análise estatística indicam efeito dos tratamentos principalmente no crescimento das raízes aos 12 (estádio V2), 16 (V3) e 26 DAS (V4) (Tabela 4).

O crescimento da parte aérea, tanto do comprimento como da massa fresca, não foi afetado significativamente pela presença da bactéria. Observou-se crescimento nos tempos 12, 19 e 26 DAS, sendo do comprimento 37,48, 50,53 e 62,59 cm respectivamente, e da massa fresca de 2,16, 4,10 e 7,41 g respectivamente.

A inoculação de *A.brasilense* na semente gerou efeito positivo no crescimento da raiz em relação à inoculação foliar. No comprimento da raiz, o crescimento não diferiu com o tempo e o tratamento AbS foi mais eficaz em relação ao AbF, com médias de 38,77 e 30,96 cm respectivamente. Para massa fresca, o crescimento variou de 2,5 a 8,8 g a partir dos 19 DAS, com diferencial no tratamento da semente que promoveu melhor crescimento em comparação com AbF e controle, com média de 10,81 g aos 26 DAS.

Tabela 4: Análise estatística da variação do crescimento do milho a partir dos métodos de inoculação nas coletas 12, 19 e 26 dias após a semeadura(DAS).

Comprimento Raiz (cm)								
Efeito	G	Valor F	P	Tratamento	12 DAS	19 DAS	26 DAS	Média
TR	2	6,37	0,0189*	Controle	33,9 (±1,515)	33,4 (±2,256)	32,2 (±1,763)	33,2 (±1,057)b
FL	2	1,51	0,2513	AbS	34,4 (±2,117)	36,0 (±4,143)	45,9 (±3,071)	38,8 (±1,858)a
TR*FL	4	2,32	0,1012	AbF	29,5 (±1,896)	33,2 (± 1,422)	30,1 (±2,536)	31,0 (±1,157)b
-	-	-	-	Média	32,6 (±1,379) A	34,2 (± 1,415) A	36,0 (±1,416) A	-
Comprimento Parte Aérea (cm)								
Efeito	G	Valor F	P	Tratamento	12 DAS	19 DAS	26 DAS	Média
TR	2	0,98	0,4134	Controle	38,6 (±2,842)	48,7 (±4,215)	63,0 (±2,738)	50,11 (±1,843)a
FL	2	78,91	<,0001*	AbS	32,2 (±1,261)	53,6 (±1,359)	61,7 (±2,793)	49,1 (±1,204)a
TR*FL	4	1,36	0,2906	AbF	39,2 (±0,483)	52,8 (±3,210)	63,0 (±2,480)	51,7 (±1,362)a
-	-	-	-	Média	36,6 (±1,489)A	51,7 (±1,553)B	62,6 (±1,439)C	-
Massa Fresca Raiz (g)								
Efeito	G	Valor F	P	Tratamento	12 DAS	19 DAS	26 DAS	Média
TR	2	9,35	0,0063*	Controle	2,4 (±0,448) Aa	2,0 (±0,466) Aa	7,7 (±0,697) Ba	4,0 (±0,308)a
FL	2	235,84	<,0001*	AbS	2,6 (±0,244) Aa	2,6 (±0,437) Aa	10,8 (±0,090) Bb	5,3 (±0,188)b
TR*FL	4	7,81	0,0013*	AbF	2,9 (±0,191) Aa	2,5 (±0,252) Aa	7,9 (±0,420)Ba	4,4 (±0,175)a
-	-	-	-	Média	2,6 (±0,216) A	2,4 (±0,235)A	8,8 (±0,243)B	-
Massa Fresca Parte Aérea (g)								
Efeito	G	Valor F	P	Tratamento	12 DAS	19 DAS	26 DAS	Média
TR	2	2,07	0,1822	Controle	2,3 (±0,239)	3,5 (±0,490)	7,3 (±0,731)	4,4 (±0,314)a
FL	2	94,35	<,0001*	AbS	1,9 (±0,280)	4,1 (±0,478)	7,9 (±0,455)	4,7 (±0,239)a
TR*FL	4	1,43	0,2727	AbF	2,2 (±0,162)	3,4 (±0,336)	6,3 (±0,634)	3,9 (±0,259)a
-	-	-	-	Média	2,2 (±0,258)A	3,7 (±0,289)B	7,2 (±0,269)C	-

* Diferença estatística entre os resultados (P<0,05). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente. Letras maiúsculas comparação entre colunas e letras minúsculas comparação entre linhas. TR: tratamento; FL: tempo; AbS: inoculação via semente; AbF: inoculação foliar; G: graus de liberdade

6 DISCUSSÃO

O uso de BPCV no Brasil tem crescido nos últimos anos, sendo uma alternativa biológica menos agressiva ao meio ambiente e que promove diminuição do uso de fertilizantes químicos. Da mesma forma, vários trabalhos mostram seu potencial no controle de pragas e doenças (YASUDA et al., 2009; JOE; SIVAKUMAR, 2010; VETTORI et al. 2010; TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011; PLANCHAMP; GLAUSER; MAUCHMANI, 2015), se tornando uma alternativa para diminuição no uso de inseticidas e fungicidas químicos. Neste trabalho, testou-se o uso da bactéria *Azospirillum brasilense* FP2 como uma alternativa no controle da antracnose.

Os resultados do trabalho *in vitro* mostraram que, nas condições administradas, a bactéria não foi capaz de inibir o crescimento do fungo. No primeiro método, a bactéria e o fungo cresceram juntos a 26 °C e não apresentou halo de inibição. No segundo método utilizado, foi observado formação de halo de inibição de aproximadamente 1 mm, neste caso, a bactéria foi crescida a 30 °C por 48h e, posteriormente a aplicação do fungo, foi crescida a 26 °C. A temperatura pode ter influenciado na capacidade da bactéria de produzir esses compostos, sendo necessário, talvez, mais tempo para a bactéria crescer nesta temperatura, ou realizar todo o experimento na temperatura determinada. Bactérias do gênero *Azospirillum* não são conhecidas pela capacidade de produzir compostos antagonistas (BASHAN; DE-BASHAN, 2002), mas, a síntese de sideróforos é mais comum no gênero e é um fator que limita o crescimento de outros microrganismos devido a competição por ferro (BASHAN; DE-BASHAN, 2010).

Os resultados da casa de vegetação mostraram que a inoculação foliar e na semente foi ineficaz no controle da severidade da antracnose aos 12 DAS na cultivar DOW 20A55, além de inibir o crescimento da planta quando associada ao fungo. Uma hipótese seria que a planta foi afetada pela presença da bactéria e do patógeno devido seu gasto energético ter sido dividido. A planta forneceu energia para a bactéria para a associação – que teve resultados posteriores já que houve crescimento na raiz em V4 na inoculação na semente, assim como a mesma foi consumida pelo patógeno. Outra hipótese seria que a energia utilizada pela planta para crescimento foi transferida para ativar seu sistema de defesa.

A planta precisa de tempo até que o estímulo fornecido pela bactéria seja suficiente para desenvolver suas defesas. Neste trabalho, a inoculação do patógeno ocorreu 7 DAI da

inoculação com a BPCV via semente e algumas horas antes para inoculação via foliar. No trabalho de Tortora et al (2012), a cepa *A.brasilense* REC3 foi capaz de ter algum controle sobre a antracnose em morango após 15 dias da inoculação da bactéria. Na cultura de grão de bico, o controle do patógeno foi efetivo aos 14 DAI (PARMASI et al, 2019).

Importante mencionar que, embora não tenha sido realizada nenhuma técnica de quantificação, a bactéria inoculada na semente promoveu crescimento radicular na planta que foi observado no tempo 26 DAS. Logo, os efeitos provenientes a bactéria, que envolvem principalmente crescimento da raiz devido efeito hormonal da inoculação (CASSÁN et al. 2014), foram observados no experimento.

Neste trabalho, a inoculação foliar não beneficiou o crescimento da planta, além de ter impacto negativo quando associado ao patógeno, no qual os parâmetros de crescimento avaliados foram afetados em 12 DAS. Fukami (2016) testou vários métodos de inoculação de *A.brasilense*, com as cepas Ab-V5 e Ab-V6, dentre estas a foliar e em sulco de cultivo, no milho e em trigo, tanto em casa de vegetação como no campo aplicando 1.0×10^5 células por planta e, teve benefícios no crescimento da planta e na produtividade com estes métodos. Cardozo (2021) trabalhou com milho, exclusivamente com inoculação foliar no campo associado com uso de herbicidas, e teve ganhos em crescimento e produtividade. Porém, outros trabalhos como de Galindo (2019), que testou em trigo uso de outros métodos de inoculação da bactéria como semente, sulco e folha, teve apenas o tratamento via semente promovendo melhor produtividade em arroz em relação ao controle; e Costa et al (2015) testou inoculação via semente e folha em estágio V4, apresentando melhores resultados com a inoculação via semente.

Seria interessante avaliar outras cultivares com diferentes níveis de resistência a antracnose, tendo em vista que esta resistência pode ter acréscimo com a presença da bactéria, como mostra no trabalho em grão-de-bico (PARMASI et al, 2019). No trabalho de ZEFFA et al (2019), eles sugerem a seleção de genótipos com maior responsividade à inoculação de *A. brasilense*, sendo que ela deve ser específica para cada condição de estresse ambiental. Embora o trabalho de ZEFFA et al (2019) tenha sido realizado para diferentes formas de estresse abiótico, é interessante ter esse tipo de seleção para estresse biótico.

Também seria interessante testar outras cepas de *A.brasilense* - a maioria dos trabalhos no qual ocorreu sucesso ao experimentar a utilização da bactéria contra algum fitopatógeno

utilizou cepas previamente selecionadas de um banco ou que já tinham trabalhos prévios com mesmo resultado.

7 CONCLUSÃO

A bactéria *A.brasilense* FP2 não tem atividade antagonista in vitro contra *C.graminicola*.

A capacidade de biocontrole da cepa *A.brasilense* FP2 de controlar a antracnose no milho no início do estágio vegetativo foi ineficaz na inoculação do fungo aos 7 DAS.

A inoculação da bactéria *A.brasilense* FP2 no momento do plantio foi eficaz para promover o crescimento da raiz na coleta 26 DAP.

Os resultados indicam que a interação entre o milho, a BPCV *A.brasilense* e o fitopatógeno *C.graminicola* foi desfavorável para a planta nos primeiros 12 dias de crescimento, sendo necessário mais estudos para concluir sobre o efeito da bactéria e do fitopatógeno no crescimento da planta..

Mais experimentos são necessários para concluir acerca da capacidade de biocontrole da bactéria *A.brasilense* contra antracnose no milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, Frederick; MORGAN, Page; SALTVEIT, Mikal. **Ethylene in plant biology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1992.

AGRIOS, George N. **Plant Pathology**. 5. ed. California: Elsevier Academic Press, 2005.

AHEMAD, Munees; KIBRET, Mulugeta. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal Of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.

ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, Campinas, v. 18, n. 7, p.779-787, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6em00268d>.

ALI, Basharat; SABRI, Anjum Nasim; HASNAIN, Shahida. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1379-1384, 14 jan. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-010-0310-1>

ALI, Shimaila; CHARLES, Trevor C.; GLICK, Bernard R.. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. **Plant Physiology And Biochemistry**, v. 80, p. 160-167, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.003>.

ALORI, Elizabeth T.; GLICK, Bernard R.; BABALOLA, Olubukola O.. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p. 1-8, 2 jun. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>.

AMBROSINI, Adriana; SOUZA, Rocheli de; PASSAGLIA, Luciane M. P.. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. **Plant And Soil**, v. 400, n. 1-2, p. 193-207, 6 nov. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-015-2727-7>.

AMORIM, Lilian; REZENDE, Jorge Alberto Marques; BERGAMIN FILHO, Armando (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronomica Ceres, 2011. 704 p.

ARKHIPOVA, T. N.; PRINSEN, E.; VESELOV, S. U.; MARTINENKO, E. V.; MELENTIEV, A. I.; KUDOYAROVA, G. R.. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. **Plant And Soil**, v. 292, n. 1-2, p. 305-315, 14 mar. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-007-9233-5>.

ASAKA, Orie; SHODA, Makoto. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4081-4085, nov. 96.

BACON, Charles W.; HINTON, Dorothy M.. Endophytic and Biological Control Potential of *Bacillus mojavensis* and Related Species. **Biological Control**, v. 23, n. 3, p. 274-284, mar. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bcon.2001.1016>.

BALDANI, José I.; BALDANI, Vera L.d.. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p.549-579, set. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0001-37652005000300014>

BARNAWAL, Deepti; BHARTI, Nidhi; MAJI, Deepamala; CHANOTIYA, Chandan Singh; KALRA, Alok. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. **Plant Physiology And Biochemistry**, v. 58, p. 227-235, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.008>.

BASHAN, Yoav; DE-BASHAN, Luz E.. Protection of Tomato Seedlings against Infection by *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* by Using the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2637-2643, jun. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.6.2637-2643.2002>.

BASHAN, Yoav; DE-BASHAN, Luz E.. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. **Advances In Agronomy**, p.77-136, 2010. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2113\(10\)08002-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2113(10)08002-8).

BENITE, Anna Maria Canavarro; MACHADO, Sérgio de Paula; MACHADO, Bianca da Cunha. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1155-1164, dez. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000700016>.

BERGSTROM, Gary C.; NICHOLSON, Ralph L.. The Biology of Corn Anthracnose: Knowledge to Exploit for Improved Management. **Plant Disease**, v. 83, n. 7, p.596-608, jul. 1999. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.1999.83.7.596>.

BETTIOL, Wagner. Biopesticide Use and Research in Brazil. **Outlooks On Pest Management**, v. 22, n. 6, p.280-283, 1 dez. 2011. Research Information Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1564/22dec10>.

BOMBARDI, Larissa Mies. **Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia**. São Paulo: Ffch - Usp, 2017. 296 p.

BOTTINI, Rubén; CASSÁN, Fabricio; PICCOLI, Patricia. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 65, n. 5, p. 497-503, 28 jul. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1696-1>.

CANNON, P.f. et al. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies In Mycology**, Utrecht, v. 73, p.181-213, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0014>.

CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira; ANDREOTE, Fernando Dini. **Microbiologia do solo**. Piracicaba: Esalq, 2016.

CARDOZO, P., DI PALMA, A., MARTIN, S. et al. Improvement of Maize Yield by Foliar Application of *Azospirillum brasilense* Az39. **Journal of Plant Growth Regulation**, abr. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10356-9>.

CASELA, Carlos Roberto; FERREIRA, Alexandre da Silva; PINTO, Nicésio Filadelfo J. de Almeida. **Circular técnica 83: Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2006.

CAVALCANTI, Leonardo Sousa et al (Ed.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. 263 p.

COMPANT, Stéphane; CLÉMENT, Christophe; SESSITSCH, Angela. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>.

CORREIA, L. V.; FELBER, P. H.; PEREIRA, L. C.; BRACCINI, A. L.; CARVALHO, D. U.; CRUZ, M. A. da; MATERA, T. C.; PEREIRA, R. C.; SANTOS, R. F.; MARTELI, D. C.. Inoculation of Wheat With *Azospirillum* spp.: a comparison between foliar and in-furrow applications. **Journal Of Agricultural Science**, v. 12, n. 1, p. 194, 15 dez. 2019. Canadian Center of Science and Education. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v12n1p194>.

COSTA, R.V. da; COTA, L.V.; SILVA, D.D. da; PARREIRA, D.F.; CASELA, C.R.; LANDAU, E.C.; FIGUEIREDO, J.e.F.. Races of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to maize in Brazil. **Crop Protection**, v. 56, p. 44-49, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.005>

COSTA, Raoni Ribeiro Guedes Fonseca; QUIRINO, Gerciene da Silva Ferreira; NAVES, Daniela Cristina de Freitas; SANTOS, Charles Barbosa; ROCHA, Ana Flávia de Souza. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 3, p. 304-311, set. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632015v4534593>.

DALL'ASTA, Pâmela; VELHO, Aline Cristina; PEREIRA, Tomás Pellizzaro; STADNIK, Marciel João; ARISI, Ana Carolina Maisonnave. *Herbaspirillum seropedicae* promotes maize growth but fails to control the maize leaf anthracnose. **Physiology And Molecular Biology Of Plants**, v. 25, n. 1, p. 167-176, 27 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12298-018-0616-2>.

DEAN, Ralph; VAN KAN, Jan A. L.; PRETORIUS, Zacharias A.; HAMMOND-KOSACK, Kim E.; PIETRO, Antonio di; SPANU, Pietro D.; RUDD, Jason J.; DICKMAN, Marty; KAHMANN, Regine; ELLIS, Jeff. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 4 abr. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M. Endophytic Occurrence of Diazotrophic Bacteria in Non-Leguminous Crops. In: (Ed.). **Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics Physiology Ecology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1995. p.3-14.

DODD, I.C.; ZINOVKINA, N.y.; SAFRONOVA, V.I.; BELIMOV, A.A.. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals Of Applied Biology**, v. 157, n. 3, p. 361-379, 18 out. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00439.x>.

DOMENICO, Prisa. Optimised fertilisation with zeolites containing Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in *Ranunculus asiaticus*. **Gsc Biological And Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 096-102, 30 jan. 2020. GSC Online Press. <http://dx.doi.org/10.30574/gscbps.2020.10.1.0011>

FENDRIHAN, Sergiu et al. *Azospirillum* STRAINS AS BIOFERTILIZERS AND BIOCONTROL AGENTS -A PRACTICAL REVIEW. **Journal Of Advances In Agriculture**, v. 7, n. 3, p.1096-1108, 14 set. 2017. CIRWOLRD. <http://dx.doi.org/10.24297/jaa.v7i3.6324>.

FIBACH-PALDI, Sharon; BURDMAN, Saul; OKON, Yaacov. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **Fems Microbiology Letters**, v. 326, n. 2, p.99-108, 3 out. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x>.

FRUGIER, Florian; KOSUTA, Sonja; MURRAY, Jeremy D.; CRESPI, Martin; SZCZYGLOWSKI, Krzysztof. Cytokinin: secret agent of symbiosis. **Trends In Plant Science**, v. 13, n. 3, p. 115-120, mar. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2008.01.003>.

FUJITA, Moeka; KUSAJIMA, Miyuki; OKUMURA, Yasuko; NAKAJIMA, Masami; MINAMISAWA, Kiwamu; NAKASHITA, Hideo. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in tomato. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, v. 81, n. 8, p. 1657-1662, 3 ago. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2017.1329621>.

FUKAMI, Josiane; CEREZINI, Paula; HUNGRIA, Mariangela. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **Amb Express**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 4 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>.

FUKAMI, Josiane; NOGUEIRA, Marco Antonio; ARAUJO, Ricardo Silva; HUNGRIA, Mariangela. Accessing inoculation methods of maize and wheat with

Azospirillum brasilense. **Amb Express**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 13 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>.

GALINDO, Fernando Shintate; RODRIGUES, Willian Lima; BIAGINI, Antônio Leonardo Campos; FERNANDES, Guilherme Carlos; BARATELLA, Eduardo Bianchi; SILVA JUNIOR, Castro Alves da; BUZETTI, Salatiér; TEIXEIRA FILHO, Marcelo Carvalho Minhoto. Assessing Forms of Application of *Azospirillum brasilense* Associated with Silicon Use on Wheat. **Agronomy**, v. 9, n. 11, p. 678, 25 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy9110678>.

GALVÃO, João Carlos Cardoso et al. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, v. 61, n. , p.819-828, dez. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201461000007>.

GAMALERO, Elisa; GLICK, Bernard R.. Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. In: MAHESHWARI, Dinesh K. (ed.). **Bacteria in Agrobiolgy**: plant nutrient management. Heidelberg: Springer, 2011. Cap. 2. p. 17-46.

GARIBALDI, J. A.; NEILANDS, J. B.. Formation of Iron-binding Compounds by Micro-organisms. **Nature**, v. 177, n. 4507, p. 526-527, mar. 1956. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/177526a0>.

GIRON, David; FRAGO, Enric; GLEVAREC, Gaëlle; PIETERSE, Corné M. J.; DICKE, Marcel. Cytokinins as key regulators in plant–microbe–insect interactions: connecting plant growth and defence. **Functional Ecology**, v. 27, n. 3, p. 599-609, 12 fev. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2435.12042>.

GLICK, Bernard R.. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30-39, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>.

GLICK, Bernard R.. Biocontrol of Bacteria and Fungi. In: GLICK, Bernard R.. **Beneficial Plant-Bacterial Interactions**. 2. ed. Cham: Springer, 2020. Cap. 6. p. 181-230.

GLICK, Bernard R.. Plant Growth-Promoting Bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1-15, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>.

GOSWAMI, Dweipayan; THAKKER, Janki N.; DHANDHUKIA, Pinakin C.. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1-19, 19 jan. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>.

GOUDA, Sushanto; KERRY, Rout George; DAS, Gitishree; PARAMITHIOTIS, Spiros; SHIN, Han-Seung; PATRA, Jayanta Kumar. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, v. 206, p. 131-140, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>.

GROBELAK, A.; NAPORA, A.; KACPRZAK, M.. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. **Ecological Engineering**, v. 84, p. 22-28, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.07.019>.

GUIMARÃES, V. F. et al. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal: da FBN à regulação hormonal, possibilitando novas aplicações. In: ZAMBOM, M. A. et al (Org.). **CIÊNCIAS AGRÁRIAS: ética do cuidado, legislação e tecnologia na agropecuária**. Marechal Cândido Rondon: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2017. Cap. 11. p. 191-212.

HEATH, M. C. Hypersensitive response-related death. **Plant Molecular Biology**, v. 44, n. 3, p. 321-334, 2000.

HENDRA, Richard; STAUM, Paulette W.. A SAS® Application to Identify and Evaluate Outliers. Applications Development. NESUG, 2010. <https://www.lexjansen.com/nesug/nesug10/ad/ad07.pdf>

HERNÁNDEZ-MONTIEL, Luis G; CONTRERAS, César J Chiquito; AMADOR, Bernardo Murillo; HERNÁNDEZ, Librado Vidal; AGUILAR, Evanjelina e Quiñones; CONTRERAS, Roberto G Chiquito. Efficiency of two inoculation methods of *Pseudomonas putida* on growth and yield of tomato plants. **Journal Of Soil Science And Plant Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 1003-1012, dez. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.4067/s0718-95162017000400012>.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Ibama, 2018. Disponível em: <<https://bit.ly/3ahQ2Dc>>

ILLMER, P.; SCHINNER, F.. Solubilization of inorganic calcium phosphates— Solubilization mechanisms. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 257-263, mar. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)00190-c](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(94)00190-c).

JOE, M. Melvin; SIVAKUMAR, P. K.. Seed priming with co-flocs of *Azospirillum* and *Pseudomonas* for effective management of rice blast. **Archives Of Phytopathology And Plant Protection**, v. 43, n. 16, p.1551-1563, nov. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03235400802583784>

JONES, Jonathan D. G.; DANGL, Jeffery L.. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, nov. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05286>.

KIMATI, H. et al (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronomica Ceres, 2005. 663 p.

KOUL, Opendar; DHALIWAL, G.S.; CUPERUS, G.W. (ed.). **Integrated Pest Management: Potential, Constraints and Challenges**. 1. ed. Cambridge: CABI Publishing, 2004. 342 p. v. 1. ISBN 0-85199-686-8.

LI, H. Q.; JIANG, X. W.. Inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) improves salt tolerance of maize seedling. **Russian Journal Of Plant Physiology**, v. 64, n. 2, p. 235-241, mar. 2017. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s1021443717020078>.

LOPES, Monyck Jeane dos Santos; DIAS-FILHO, Moacyr Bernardino; GURGEL, Ely Simone Cajueiro. Successful Plant Growth-Promoting Microbes: inoculation methods and abiotic factors. **Frontiers In Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 1-13, 25 fev. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fsufs.2021.606454>

MAGALHÃES, Paulo César et al. Circular Técnica 22: **Fisiologia do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 23 p.

MARIANO, Rosa de Lima Ramos et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p.89-111, 2004.

MEHMOOD, Tahir; LI, Guihua; ANJUM, Tehmina; AKRAM, Waheed. *Azospirillum lipoferum* strain AL-3 reduces early blight disease of potato and enhance yield. **Crop Protection**, v. 139, p. 105349, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105349>.

MEHNAZ, Samina. *Azospirillum*: A Biofertilizer for Every Crop. **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**, p.297-314, 4 out. 2014. Springer India. http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8_15.

MICHEREFF, Sami J.; BARROS, Reginaldo. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2001. 368 p.

MIRANDA, Ary Carvalho de et al. Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p.7-14, mar. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232007000100002>.

MORAIS, Tâmara Prado de; BRITO, Césio Humberto de; BRANDÃO, Afonso Maria; REZENDE, Wender Santos. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 2, p. 290-298, 2016. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20160034>.

MÜLLER, Tânia Maria; SANDINI, Itacir Eloi; RODRIGUES, João Domingos; NOVAKOWISKI, Jaqueline Huzar; BASI, Simone; KAMINSKI, Tatyanna Hyczy. Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of nitrogen fertilizer increases corn yield. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 210-215, 20 out. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131283>.

MÜNCH, Steffen; LINGNER, Ulrike; FLOSS, Daniela S.; LUDWIG, Nancy; SAUER, Norbert; DEISING, Holger B.. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal Of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 41-51, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.008>.

MUTHAMILARASAN, Mehanathan; PRASAD, Manoj. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. **Journal Of Biosciences**, v. 38, n. 2, p. 433-449, 9 fev. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12038-013-9302-2>.

O'CONNELL, Richard J et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9, p.1060-1065, 12 ago. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2372>.

OLANREWAJU, Oluwaseyi Samuel; GLICK, Bernard R.; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 1-16, 6 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>.

PAES, Maria Cristina Dias. **Circular Técnica 75: Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6 p.

PARMASI, Zahra; TAHMASEBI, Zahra; ZARE, Mohammad Javad; NOUROLLAHI, Khoshnood; KANOUNI, Homayoun. Biocontrol of *Ascochyta* blight by *Azospirillum* sp. depending on the degree of resistance of chickpea genotypes. **Journal Of Phytopathology**, v. 167, n. 10, p. 601-607, 3 set. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12850>.

PARREIRA, Douglas Ferreira et al. A antracnose do milho. **Ciências Agrárias e Biológicas**, Sete Lagoas, v. 08, n. 01, p.11-27, jan. 2014.

PEIX, A.; MATEOS, P.F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E.. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 33, n. 14, p. 1927-1935, nov. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0038-0717\(01\)00119-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0038-0717(01)00119-5).

PIETERSE, Corné M.J.; ZAMIOUDIS, Christos; BERENDSEN, Roeland L.; WELLER, David M.; VAN WEES, Saskia C.M.; BAKKER, Peter A.H.M.. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. **Annual Review Of Phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 347-375, 4 ago. 2014. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>.

PLANCHAMP, Chantal; GLAUSER, Gaetan; MAUCH-MANI, Brigitte. Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. **Frontiers In Plant Science**, v. 5, p.1- 10, 13 jan. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00719>.

PUENTE, Mariana L.; GUALPA, José L.; LOPEZ, Gastón A.; MOLINA, Romina M.; CARLETTI, Susana M.; CASSÁN, Fabricio D.. The benefits of foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean are explained by an auxin signaling model. **Symbiosis**, v. 76, n. 1, p. 41-49, 12 dez. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13199-017-0536-x>.

RENGEL, Z; BATTEN, G.D; CROWLEY, D.E. Agronomic approaches for improving the micronutrient density in edible portions of field crops. **Field Crops Research**, v. 60, n. 1-2, p. 27-40, jan. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4290\(98\)00131-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4290(98)00131-2).

RISSATO, Sandra Regina et al. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.739-743, out. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000500012>.

RODRÍGUEZ, Hilda; FRAGA, Reynaldo. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, out. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0734-9750\(99\)00014-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0734-9750(99)00014-2).

ROMEIRO, Reginaldo da Silva. **Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos**. Viçosa: Editora Ufv, 2007. 172 p

SAHA, Ratul; SAHA, Nabaneeta; DONOFRIO, Robert S.; BESTERVELT, Lorelle L.. Microbial siderophores: a mini review. **Journal Of Basic Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 303-317, 26 jun. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201100552>.

SAHARAN, Baljeet Singh; NEHRA, Veronica. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. **Life Sciences And Medicine Research**, Kurukshetra, v. 2011, n. 21, p.1-30, 30 abr. 2011.

SALAMONE, Ines E. de Garcia; HYNES, Russell K.; NELSON, Louise M.. Role of Cytokinins in Plant Growth Promotion by Rhizosphere Bacteria. **Pgpr: Biocontrol and Biofertilization**, p. 173-195, 2005. Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_6.

SANTOYO, Gustavo; MORENO-HAGELSIEB, Gabriel; OROZCO-MOSQUEDA, Ma. del Carmen; GLICK, Bernard R.. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92-99, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>.

SANTOYO, Gustavo; MORENO-HAGELSIEB, Gabriel; OROZCO-MOSQUEDA, Ma. del Carmen; GLICK, Bernard R.. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92-99, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>.

SHEN, Xuemei; HU, Hongbo; PENG, Huasong; WANG, Wei; ZHANG, Xuehong. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in Pseudomonas. **Bmc Genomics**, v. 14, n. 1, p. 271, 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-271>.

SIDDIQUI, Zaki A. (ed.). **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Dordrecht: Springer, 2006.

SINGH, Govind Gupta Shailendra. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal Of Microbial & Biochemical Technology**, v. 07, n. 02, p.96-102, 2015. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>.

SOARES, D. F.; FARIA, A. M.; ROSA, A. H. Análise de risco de contaminação de águas subterrâneas por resíduos de agrotóxicos no município de Campo Novo do Parecis (MT), Brasil. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 2, p. 277- 284, 2017.

SOUZA, Aguinaldo Eduardo de et al. ESTUDO DA PRODUÇÃO DO MILHO NO BRASIL. **South American Development Society Journal**, v. 4, n. 11, p.182-194, 24 ago. 2018. South American Development Society Journal. <http://dx.doi.org/10.24325/issn.2446-5763.v4i11p182-194>.

SOUZA, Aguinaldo Eduardo de et al. ESTUDO DA PRODUÇÃO DO MILHO NO BRASIL. **South American Development Society Journal**, v. 4, n. 11, p.182-194, 24 ago. 2018. South American Development Society Journal. <http://dx.doi.org/10.24325/issn.2446-5763.v4i11p182-194>.

SOUZA, Gustavo dos Santos et al. Presença de agrotóxicos na atmosfera e risco à saúde humana: uma discussão para a Vigilância em Saúde Ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p.3269-3280, out. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172210.18342017>.

SPAEPEN, Stijn; VANDERLEYDEN, Jos; REMANS, Roseline. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **Fems Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, jul. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>.

SPOLAOR, Leandro Teodoski et al. Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p.33-40, 8 jan. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.330>.

SUDHAKAR, P. Evaluation of some nitrogen fixing bacteria for control of foliar diseases of mulberry (*Morus alba*). **Indian Journal of Sericulture**, v. 39: p. 9–11, 2000.

SUKNO, Serenella A.; GARCÍA, Verónica M.; SHAW, Brian D.; THON, Michael R.. Root Infection and Systemic Colonization of Maize by *Colletotrichum graminicola*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 823-832, 7 dez. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01165-07>.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.

TEIXEIRA, Paulo José Pl; COLAIANNI, Nicholas R; FITZPATRICK, Connor R; DANGL, Jeffery L. Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune

system. **Current Opinion In Microbiology**, v. 49, p. 7-17, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2019.08.003>.

TOKLIKISHVILI, N.; DANDURISHVILI, N.; VAINSTEIN, A.; TEDIASHVILI, M.; GIORGOBIANI, N.; LURIE, S.; SZEGEDI, E.; GLICK, B. R.; CHERNIN, L.. Inhibitory effect of ACC deaminase-producing bacteria on crown gall formation in tomato plants infected by *Agrobacterium tumefaciens* or *A. vitis*. **Plant Pathology**, v. 59, n. 6, p. 1023-1030, 8 jul. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02326.x>.

TORTORA, María L.; DÍAZ-RICCI, Juan C.; PEDRAZA, Raúl O.. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives Of Microbiology**, v. 193, n. 4, p. 275-286, 14 jan. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-010-0672-7>.

TORTORA, María L.; DÍAZ-RICCI, Juan C.; PEDRAZA, Raúl O.. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant And Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 279-290, 3 ago. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-011-0916-6>.

UMA, Battepati; RANI, T. Swaroopa; PODILE, Appa Rao. Warriors at the gate that never sleep: non-host resistance in plants. **Journal Of Plant Physiology**, v. 168, n. 18, p. 2141-2152, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2011.09.005>.

VAN LOON, L. C.. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal Of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 243-254, 5 jun. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-007-9165-1>.

VEJAN, Pravin et al. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. **Molecules**, v. 21, n. 5, p.573-590, 29 abr. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21050573>.

VETTORI, L. et al. Biocontrol activity of *Azospirillum brasilense* Sp245 against *Rhizoctonia solani* by in vitro/in vivo tests, DGGE analysis. **Journal Of Biotechnology**, v. 150, p.503-503, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.786>.

VIEJOBUEÑO, Josefina; ALBORNOZ, Patricia Liliana; CAMACHO, María; SANTOS, Berta de Los; MARTÍNEZ-ZAMORA, Martín Gustavo; SALAZAR, Sergio Miguel. Protection of Strawberry Plants against Charcoal Rot Disease (*Macrophomina phaseolina*) Induced by *Azospirillum brasilense*. **Agronomy**, v. 11, n. 2, p. 195, 20 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy11020195>.

WERNER, Tomáš; MOTYKA, Václav; LAUCOU, Valérie; SMETS, Rafaël; VAN ONCKELEN, Harry; SCHMÜLLING, Thomas. Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. **The Plant Cell**, v. 15, n. 11, p. 2532-2550, 10 out. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.014928>.

WOLF, Duane C.; SKIPPER, Horace D.. Soil Sterilization. In: WEAVER, R. W. et al (ed.). *Methods of Soil Analysis: part 2 microbiological and biochemical properties*. Madison: Soil Science Society Of America, 1994. Cap. 3. p. 41-51.
<https://doi.org/10.2136/sssabookser5.2.c3>

YASUDA, Michiko; ISAWA, Tsuyoshi; SHINOZAKI, Satoshi; MINAMISAWA, Kiwamu; NAKASHITA, Hideo. Effects of Colonization of a Bacterial Endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on Disease Resistance in Rice. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, v. 73, n. 12, p. 2595-2599, 23 dez. 2009. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.90402>.

ZAIDI, Almas; AHMAD, Ees; KHAN, Mohammad Saghir; SAIF, Saima; RIZVI, Asfa. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 231-239, set. 2015. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.020>.

ZEFFA, Douglas Mariani; PERINI, Luiz Júnior; SILVA, Mayara Barbosa; SOUSA, Nicholas Vieira de; SCAPIM, Carlos Alberto; OLIVEIRA, André Luiz Martinez de; AMARAL JÚNIOR, Antônio Teixeira do; GONÇALVES, Leandro Simões Azeredo. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **Plos One**, v. 14, n. 4, p. 1-19, 18 abr. 2019. Public Library of Science (PLoS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0215332>.

APÊNDICE A - Resultados estatísticos e outliers removidos

Tabela A.1: Outliers removidos para análise estatística na avaliação do efeito de inoculação da bactéria *A.brasilense* e fitopatógeno *C.graminicola* no crescimento do milho

Tratamento	N	MÉDIA
CR (cm)		
Controle	4	33,9 ± 1,5
AbS	4	34,4 ± 2,1
AbS + Cg	3*	26,2 ± 1,7
AbF	4	29,5 ± 1,9
AbF + Cg	4	26,9 ± 0,7
Cg	4	33,8 ± 1,0
CA (cm)		
Controle	3*	41,1 ± 1,9
AbS	3*	32,2 ± 1,3
AbS + Cg	3*	35,2 ± 1,3
AbF	4	39,2 ± 0,5
AbF + Cg	4	31,8 ± 1,2
Cg	4	35,9 ± 1,7
MFR (g)		
Controle	3*	2,09 ± 0,41
AbS	4	2,57 ± 0,24
AbS + Cg	4	1,80 ± 0,11
AbF	4	2,86 ± 0,19
AbF + Cg	4	1,42 ± 0,22
Cg	4	1,83 ± 0,14
MFA (g)		
Controle	3*	2,57 ± 0,06
AbS	3*	1,67 ± 0,16
AbS + Cg	4	1,40 ± 0,20
AbF	4	2,22 ± 0,16
AbF + Cg	4	1,45 ± 0,08
Cg	4	1,68 ± 0,19

CR: Comprimento da raiz; CA: Comprimento da parte aérea, MFR: Massa fresca Raiz; MFA: Massa fresca parte aérea; AbS: Aplicação da bactéria via semente; AbF: Aplicação da bactéria na folha; Cg: Aplicação do fungo
*N=3 apresenta outlier removido na análise de variância e comparação de médias.

Tabela A.2: Outliers removidos para análise estatística na avaliação dos métodos de inoculação da bactéria *A. brasilense* no crescimento do milho.

TEMPO	TRATAMENTO	N	MÉDIA
CR			
12 DAS	CONTROLE	4	33,9 ± 1,5
12 DAS	ABS	4	34,4 ± 2,1
12 DAS	ABF	4	29,5 ± 1,9
19 DAS	CONTROLE	3*	33,4 ± 2,3
19 DAS	ABS	4	36,0 ± 4,1
19 DAS	ABF	4	33,3 ± 1,4
26 DAS	CONTROLE	3*	32,2 ± 1,8
26 DAS	ABS	4	45,9 ± 3,1
26 DAS	ABF	4	30,1 ± 2,5
CA			
12 DAS	CONTROLE	4	38,6 ± 2,8
12 DAS	ABS	3*	32,2 ± 1,3
12 DAS	ABF	4	39,2 ± 0,5
19 DAS	CONTROLE	3*	48,8 ± 4,2
19 DAS	ABS	4	53,6 ± 1,4
19 DAS	ABF	4	52,8 ± 3,2
26 DAS	CONTROLE	4	63,0 ± 2,7
26 DAS	ABS	4	61,7 ± 2,8
26 DAS	ABF	4	63,1 ± 2,5
MFR			
12 DAS	CONTROLE	4	2,43 ± 0,45
12 DAS	ABS	4	2,57 ± 0,24
12 DAS	ABF	4	2,86 ± 0,19
19 DAS	CONTROLE	3*	1,99 ± 0,45
19 DAS	ABS	4	2,65 ± 0,44
19 DAS	ABF	4	2,50 ± 0,25
26 DAS	CONTROLE	3*	7,71 ± 0,70
26 DAS	ABS	3*	10,81 ± 0,09
26 DAS	ABF	4	7,90 ± 0,42
MFA			
12 DAS	CONTROLE	4	2,34 ± 0,24
12 DAS	ABS	4	1,93 ± 0,28
12 DAS	ABF	4	2,22 ± 0,16
19 DAS	CONTROLE	3*	3,54 ± 0,49
19 DAS	ABS	4	4,12 ± 0,48
19 DAS	ABF	3*	3,36 ± 0,34
26 DAS	CONTROLE	4	7,35 ± 0,73
26 DAS	ABS	3*	7,95 ± 0,45
26 DAS	ABF	4	6,29 ± 0,63

CR: Comprimento da raiz; CA: Comprimento da parte aérea, MFR: Massa fresca Raiz; MFA: Massa fresca parte aérea; AbS: Aplicação da bactéria via semente; AbF: Aplicação da bactéria na folha; Cg: Aplicação do fungo na folha; DAS: dias após o semeio

* N=3 apresenta outlier removido na análise de variância e comparação de médias.