

**SELEÇÃO DE *Bacillus spp* PROMOTORES DE CRESCIMENTO
DE MILHO**

Renato Tadeu Guerreiro

SELEÇÃO DE *Bacillus spp* PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE MILHO

Renato Tadeu Guerreiro

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de Concentração: Produção Vegetal.
Orientador: Prof. Dr. Fábio Fernando de Araújo

631.42
G934s

Guerreiro, Renato Tadeu

Seleção de *Bacillus spp* promotores de crescimento de milho / Renato Tadeu Guerreiro – Presidente Prudente: [s.n.], 2008.
55 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2008.
Bibliografia

1. Rizobactérias, auxinas, fenologia. 2. nutrição vegetal. I. Título.

Renato Tadeu Guerreiro

SELEÇÃO DE *Bacillus spp* PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE MILHO

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia

Presidente Prudente, 14 de outubro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Fernando de Araújo
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Dr. Alexandre José Cattelan
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – CNPSo
Londrina - PR

Prof^a.Dr.^a Ceci Castilho Custódio
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Essa dissertação é dedicada à minha família.

Agradecimentos

à minha família, pelo apoio e incentivo,
ao Prof. Dr. Fábio Fernando de Araújo pela orientação segura,
à comissão julgadora, pela análise do trabalho, críticas e sugestões,
ao Fabio Henrique Mazocato, pela discussão de idéias, apoio na elaboração dos trabalhos
no decorrer do curso,
à Prof.^a Me. Iza Luchini, pelo indiscutível apoio fundamental nas coletas e trabalhos
teóricos,
à Márcia Guaberto técnica de laboratório da UNOESTE, que gentilmente ajudou na parte
prática dos experimentos sempre com bom humor,
à Prof.^a Dr.^a Maria Urbana da Silva, pelo incentivo e apoio na execução do curso.

“Quando alguém evolui, evolui tudo que está a sua volta”.

Paulo Coelho

RESUMO GERAL

Seleção de *Bacillus spp* promotores de crescimento de milho

O objetivo do trabalho foi selecionar isolados bacterianos do gênero *Bacillus* em amostras de solo da região oeste paulista e avaliar sua inoculação em milho cultivado em duas condições de solo (natural e esterilizado), utilizando-se parâmetros nutricionais e de crescimento da planta em 14 isolados. Os isolados bacterianos, caracterizados como pertencentes ao gênero *Bacillus*, foram selecionados previamente quanto ao antagonismo a fungos fitopatogênicos e produção de hormônio vegetal (auxinas) em laboratório. Além disto, foram também caracterizados quanto ao potencial de solubilização de fosfatos insolúveis em meio de cultivo. As plantas de milho foram cultivadas em vasos com 5kg de solo em ambiente de casa de vegetação durante 50 dias. As avaliações efetuadas durante a condução do experimento foram: altura de plantas aos 29 e 50 dias após o plantio; número de folhas desdobradas e biomassa seca produzida aos 50 dias após o plantio. Nenhum dos isolados de *Bacillus spp.* avaliados conseguiu solubilizar fosfatos insolúveis em condições de laboratório. O cultivo do milho em solo estéril proporcionou maior número de folhas desdobradas na planta aos 50 dias de idade. A maioria dos isolados bacterianos avaliados proporcionou benefícios ao crescimento do milho, sendo que o isolado NGR-1 teve o melhor desempenho na maioria das variáveis avaliadas durante o crescimento do milho. Seis isolados de *Bacillus spp.* (BRG-2, CAS-2, NGR-1, PNP-2, PRP-2 e TAC-2) destacaram-se como promotores de crescimento do milho na avaliação de produção de biomassa, pela planta, aos 50 dias de idade em solo natural. A promoção de crescimento do milho proporcionada pelas bactérias pode ser devido a vários fatores, contudo os parâmetros de seleção utilizados para os isolados podem ser considerados satisfatórios. A maior produção de auxinas pelas bactérias, detectadas em laboratório, não foi um parâmetro fundamental para influenciar o desempenho dos melhores isolados bacterianos avaliados no crescimento do milho em casa de vegetação. O milho, quando inoculado, com a maioria dos isolados bacterianos, apresentou maior acúmulo de nutrientes na parte aérea.

Palavras-chaves- Rizobactérias, Auxinas, Fenologia, *Zea mays*, Nutrição vegetal, Solubilização de P.

ABSTRACT GERAL

Selection of corn growth promoter *Bacillus*

:

The objectives of this study was to select bacterial isolates of the genus *Bacillus* in samples of soil from the west region of Sao Paulo state, Brazil, and assess their effect when inoculated in two corns grown in the soil conditions (natural and sterilized soil), utilizing nutritional parameters and of growth of plant in 14 isolates. The bacterial isolates were characterized at *Bacillus* genus and then selected as fungus antagonists and as producers of plant hormone (auxin) in the laboratory. Besides they were also characterized as the potential for insoluble phosphate solubilization. The maize plants were grown in pots of 5 Kg of soil in a greenhouse environment for 50 days. The assessments made during the conduct of the trial were: height of plants to 29 and 50 days after planting; number of leaves and dry biomass produced deployed to 50 days after planting. None of the isolated not showed phosphate solubilization in vitro. The cultivation of maize in sterile soil provided the greatest number of plant leaves deployed in the 50 days of age. Most of the evaluated isolated bacteria provided some benefit for the growth of maize, since the isolated NGR-1 showed the best performance for the three variables during the maize growth. Six single bacterial (BRG-2, CAS-2, NGR-1, PNP-2, PRP-2, and TAC-2) highlighted themselves as promoters of growth of maize evaluated by the production of biomass for the plant to the 50 days of age in natural soil. The promotion of the maize growth offered by the bacteria may be due to several factors, however the parameters of selection used for the individual can be considered satisfactory. The production of AIA by the bacteria wasn't a parameter for the best performance of bacterial isolates for inoculation of maize. Inoculated plants had a greater increase in the accumulation of nutrients in the aerial part.

Keywords - Rhizobacteria, Auxin, Plant nutrition, Phenology, *Zea mays*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	10
1.1 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas.....	10
1.2 Gênero <i>Bacillus</i>	12
1.3 Reguladores de Crescimento Vegetal.....	14
1.4 Cultura do Milho.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
2 ARTIGO I: CRESCIMENTO DE MILHO INOCULADO COM <i>Bacillus</i> <i>spp</i> E CULTIVADO EM SOLO AUTOCLAVADO E NATURAL.....	24
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	24
2.1 Introdução.....	25
2.2 Material e Métodos.....	27
2.3 Resultados e Discussão.....	29
2.4 Conclusões.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
3 ARTIGO II: EFEITO DE DIFERENTES ISOLADOS DE <i>Bacillus spp</i> NA NUTRIÇÃO E CRESCIMENTO EM MILHO.....	42
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	42
3.1 Introdução.....	43
3.2 Material e Métodos.....	45
3.3 Resultados e Discussão.....	47
3.4 Conclusões.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

As rizobactérias são constituintes da microflora rizosférica e podem ser classificadas como deletérias, benéficas ou neutras, conforme seus efeitos sobre o desenvolvimento das plantas. São capazes de estimular as plantas, com a produção de substâncias promotoras de crescimento (BAREA et al., 1983); por diversos mecanismos, os quais ainda não estão totalmente esclarecidos. Entre os mais variados meios de ação para promover o crescimento de plantas estão a produção de hormônios de crescimento, como auxinas (ASGHAR et al., 2002).

O estímulo ao crescimento das plantas proporcionado pelas rizobactérias está relacionado também a outros fatores, como a diminuição na incidência e inibição de crescimento de fitopatógenos ou outros microrganismos deletérios (SIMEONI et al., 1987 apud MELLO, 1998). A promoção do crescimento das plantas pela diminuição da incidência de doenças podem se dar pela inibição direta do crescimento do patógeno (FREITAS; PIZZINATTO, 1997; RAAIJMAKERS et al., 1997; OWEN; ZDOR, 2001) e pela indução de resistência sistêmica (FRIDLENDER et al., 1993; NANDAKUMAR et al., 2001), entre outras maneiras.

Algumas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas podem ser eficientes agentes de controle biológico, através da inibição de microrganismos patogênicos da rizosfera, pela produção de β -1,3-glucanase (FRIDLENDER et al., 1993), antibióticos (RAAIJMAKERS et al., 1997), ácido cianídrico (OWEN; ZDOR, 2001) e sideróforos (PIDELLO, 2003). Sideróforos são substâncias que tornam o Fe^{3+} não disponível aos agentes patogênicos, inibindo-lhes o crescimento (FREITAS, 1989), os quais são moléculas de baixo peso molecular, quelantes de ferro, sintetizadas pelas bactérias em condições específicas de crescimento (NEILANDS et al., 1984).

Um dos mecanismos fundamentais de ação de rizobactérias no controle de fitopatógenos dá-se pela produção de compostos antibióticos, que atuam na supressão desses parasitas na rizosfera (ARAUJO et al., 2005). Os antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular que, em baixas concentrações,

são deletérios ao crescimento ou a outras atividades metabólicas de microorganismos (MCKEEN et al., 1986).

Entre os melhores exemplos de utilização de antagonistas microbianos para biocontrole estão *Agrobacterium radiobacter*, para o controle da galha causada por *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis* para controle de tombamento de plântulas e *Pseudomonas fluorescens*, para controle de *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *Pythium* e *Rhizoctonia solani*. Estes dois últimos antagonistas também promovem o crescimento e a produtividade das plantas por produzirem hormônios de crescimento vegetal (ANTER et al, 1995).

O controle biológico tem sido comprovado por vários métodos, tanto diretos como indiretos (BURR et al., 1978). Uma técnica indireta seria a aplicação de suplementação de matéria orgânica, que aumenta a ação de antagonistas, outra estratégia indireta refere-se à proteção cruzada, que envolve a indução do mecanismo de defesa da planta contra um determinado patógeno pela inoculação com uma linhagem não-virulenta. Um método direto refere-se à introdução de antagonistas ao solo, à semente, aos órgãos de propagação vegetativa ou à parte aérea (SUSLOW; SCHROTH, 1982).

Mesmo sendo relatado inúmeros casos positivos sobre o desempenho das rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, quanto ao aumento na produtividade das culturas, crescimento de plantas e supressão de doenças, a utilização desses microrganismos nem sempre tem fornecido bons resultados, sendo que um dos obstáculos para sua utilização comercial é que os isolados introduzidos podem ter dificuldade de se estabelecer e sobreviver em condições de campo (ATKINSON; WATSON, 2000). Deste modo, pela análise do número de bactérias na rizosfera de plantas é possível conhecer alguns dos fatores que exercem influência sobre seu estabelecimento em um ambiente e avaliar sua capacidade de colonizar a rizosfera. Assim como exemplo, Chanway et al. (2000) detectaram, pela enumeração periódica de rizobactérias promotoras do crescimento previamente marcadas com resistência a antibióticos e inoculadas em plântulas de abeto (*Abies sp*), que tanto isolados de *Bacillus spp.* quanto de *Pseudomonas spp.* do grupo fluorescente permaneceram na rizosfera por até 71 meses após a inoculação. Analisaram também que havia interação entre o isolado e o local, mas não analisaram quais dos fatores ambientais poderiam interferir nessa interação.

Freitas et al. (2003) sugeriram que aspectos nutricionais do substrato em que se desenvolviam plantas de alface deveriam influenciar a capacidade de promoção do crescimento por bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas*, justamente pela variação do efeito dos isolados bacterianos nos diversos substratos utilizados no estudo. Resultado semelhante foi encontrado por Freitas e Aguilar-Vildoso (2004), que também concluíram que *Pseudomonas fluorescentes* têm seu desenvolvimento influenciado pelo substrato e pelo ambiente em que se desenvolvem, particularmente pela rizosfera.

1.2 Gênero *Bacillus*

As bactérias deste gênero se destacam devido à sua capacidade de formar esporos, os quais são tolerantes ao calor e ao frio, bem como a condições extremas de pH, a pesticidas, fertilizantes e ao tempo de estocagem (KLOEPPER, 1997). A grande maioria das espécies do gênero *Bacillus* é saprófita, estando amplamente distribuídas no ar, solo e água (BOER; DIDERICHSEN, 1991).

As características principais do gênero são: bacilos gram positivos, células com a forma de bastonetes retos, aos pares ou cadeias com extremidades arredondadas ou em ângulo reto; são móveis por meio de flagelos peritríquios; Possuem endósporos ovais ou algumas vezes, redondos ou cilíndricos, sendo muito resistentes às condições adversas, tais como calor e baixos níveis de umidade; são aeróbios ou aeróbios facultativos e a maioria das espécies encontradas em laboratório são saprófitas (MELO, 1998).

Há mais de 191 espécies e 4 subespécies descritas no gênero *Bacillus* das quais muitas possuem características semelhantes ao *Bacillus anthracis*. Entretanto, a maioria dos bacilos é saprófitos e não patogênicos para os animais (MELO, 1998). No âmbito da agricultura existem diversos produtos tendo, como ingrediente ativo, espécies do gênero *Bacillus*, como exemplo, *Bacillus thuringiensis* (DIPEL, Abbot Co., USA), *Bacillus sphaericus* (BIOBAC, ICI, Alemanha) e *Bacillus subtilis* (KODIAK, Gustafson Inc., USA). Estes produtos têm sido utilizados com fins de controle biológico, em vários países do mundo. Com relação ao controle biológico de doenças principalmente de fungos fitopatogênicos no solo e no filoplano vários

trabalhos têm destacado o *Bacillus subtilis* como eficiente antagonista (MCKEEN et al., 1986; BETTIOL; KIMATI, 1990; 1993; ARAÚJO et al., 2005; DOMENECH et al., 2006).

A maioria dos trabalhos publicados com *B. subtilis* está relacionado ao controle biológico de fitopatógenos na rizosfera o qual tem sido atribuído com frequência à produção de antibióticos, conforme já descrito anteriormente. Contudo esta espécie bacteriana também classificada como rizobactéria promotora de crescimento de plantas pode suprimir as doenças por outros modos de ação como: competição por espaço, nutrientes e indução de resistência sistêmica em plantas (KLOEPPER, 1999). Além disto, espécies do gênero *Bacillus*, apresentam potencial de controle biológico de nematóides fitopatogênicos (ARAÚJO et al., 2002). Neipp e Becker (1999), avaliando a atividade biocontroladora de isolados de rizobactérias sobre *Heterodera schachtii*, encontraram estirpes de bactérias, incluindo *Bacillus megaterium*, que reduziam a infecção de nematóides em beterraba.

Ganhos na nutrição de plantas inoculadas com *Bacillus* têm sido também destacados como benefício advindo da presença deste grupo de microrganismos na rizosfera. Rodriguez e Fraga (1999) citam que estirpes do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* estão entre as bactérias com maior potencial de solubilização de fósforo. A solubilização de fosfatos insolúveis mediado por microrganismos está associado ao desprendimento de ácidos orgânicos que são freqüentemente combinados com outros metabólitos, sendo constatado *in vitro* que o potencial de solubilização de P por microrganismos está diretamente relacionado à produção de sideróforos, fitohormônios e enzimas líticas (VASSILEV et al., 2006). Com relação ao aumento da disponibilidade de nutrientes no solo pela ação de *Bacillus subtilis* foi comprovado maior absorção de nutrientes, como fósforo e nitrogênio, em plantas inoculadas com a rizobactéria nas sementes (ARAÚJO, 2008). Rodriguez e Fraga (1999) citam que estirpes do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* estão entre as bactérias com maior potencial de solubilização de fósforo no solo. Richardson (2000) relatou que a maioria dos solos brasileiros é pobre em fósforo disponível as plantas e que o fertilizante fosfatado representa um alto custo para o agricultor, desta forma é interessante que se usufrua dos microrganismos do solo utilizados como inoculantes para mobilizar o fósforo em solos pobres. Além da solubilização do fósforo outros mecanismos estão também

relacionados com o metabolismo microbiano no solo, como a produção de enzimas (nitrogenase, quitinases e glucanases) (CATTELAN, et al., 1999).

1.3 Reguladores de Crescimento Vegetal

Os reguladores de crescimento vegetal também são conhecidos por hormônios vegetais. Os hormônios vegetais são compostos orgânicos endógenos, sintetizado naturalmente pelos vegetais. Estando em baixas concentrações modifica, bloqueiam ou promovem processos morfológicos e fisiológicos da planta (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os hormônios vegetais são agrupados em cinco classes principais: auxinas (ácido indol acético, AIB, ANA,) giberelinas (GAs em várias formas), citocininas (Zeatina, Cinetina, 6-BA), etileno e ácido abscísico (ABA) (RAVEN et al, 1996). Os hormônios são produzidos em um sítio da planta e translocado para outros sítios para alterar o crescimento e desenvolvimento. O hormônio natural e outros materiais são essencialmente "mensageiros químicos", influenciando em muitas partes no desenvolvimento da planta (HALLMANN et. al. 1988).

Os hormônios vegetais constantemente aparecem em concentrações internas inferiores a 1 μM enquanto que carboidratos, aminoácidos e outros metabólitos estão geralmente presentes em concentrações da ordem de 1 a 50 μM . Determinada concentração de auxina, capaz de estimular o crescimento do caule de uma planta, pode também bloquear o crescimento de suas raízes, dispondo os diferentes órgãos vegetais concentrações variadas de auxina para sua máxima alongação (RAVEN et al, 1996).

As auxinas são reguladores de crescimento vegetais produzidos principalmente, nas regiões apicais e que, transportados para outros locais da planta, participam do seu crescimento e diferenciação (RAVEN et al, 1996). As auxinas são inativadas por enzimas do tipo oxidases (AIA-oxidase e peroxidases), pelo processo de foto-oxidação, além de combinação com ácido aspártico. Diversos microrganismos são capazes de produzir ácido indolacético (AIA), incluindo bactérias epifíticas e colonizadoras de tecidos vegetais (PATTEN; GLICK, 1996).

As giberelinas são reguladores vegetais que têm em comum o esqueleto (isoprenóide) em sua fórmula estrutural ela pode funcionar como regulador

da divisão e alongamento das células (TAKAHASHI et al., 1988). Há vários tipos de giberelinas e suas diferenças consistem na localização das ligações duplas e dos grupos hidroxila. Constatou-se que as giberelinas são produzidas por fungos e também pelos vegetais sendo que nestes participam da regulação do crescimento de órgãos vegetais. O transporte das giberelinas nas plantas é de natureza não polar, ocorrendo na maioria dos tecidos, incluindo floema e xilema (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As citocininas são reguladores vegetais que participam ativamente dos processos de divisão e diferenciação celular, e na técnica de cultura de tecidos (TAIZ; ZEIGER, 2004). A primeira citocinina extraída de vegetal foi observada em grãos de milho e denominada zeatina. Outras citocininas extraídas de vegetais já foram identificadas como zeatina ribosídeo e isopentenil adenosina. As citocininas demonstram ser compostos originários do t-RNA. O uso exógeno de reguladores vegetais como a citocinina, está relacionado com a manutenção da coloração verde da casca do limão 'Tahiti' por um período de tempo maior e no retardo da senescência (FIORAVANÇO et al., 1995).

De acordo com Chitarra e Chitarra (1990), já foi evidenciados o papel das auxinas, giberelinas e citocininas no amadurecimento dos frutos, as quais têm sido estudadas como retardadores da senescência, enquanto que o etileno e ácido abscísico são tidos como promotores do amadurecimento. As giberelinas afetam a mudança de cor, uma vez que retardam a perda de clorofila, acúmulo de carotenóides e o amaciamento da casca.

A fisiologia vegetal ocasionada por certo fitohormônio depende da associação de três fatores primários: concentração do hormônio no sítio de atuação, sensibilidade das células ou tecidos e presença de outros hormônios vegetais. Da associação destes fatores complexos é que resulta a resposta fisiológica a um fitohormônio. Deste modo, veremos a grande versatilidade destas substâncias no controle dos mais diversificados processos de crescimento, diferenciação e desenvolvimento ao longo da ontogênese dos vegetais (HALL et al., 1996).

A concentração de um fitohormônio numa determinada célula ou tecido tem um papel importante na regulação hormonal e depende de sua biossíntese, dos mecanismos de degradação, transporte e de processos de inativação reversível (HALLMANN et. al. 1988). A sensibilidade de uma célula a certo fitohormônio deve estar ligada à quantidade de receptores específicos, às mudanças de afinidade dos

receptores ou às mudanças na cadeia subsequente de eventos bioquímicos e biofísicos. A sensibilidade está ligada então ao genótipo, podendo mudar com o processo, tecido, idade, estágio do desenvolvimento, condições fisiológicas do vegetal e na presença ou ausência de outros hormônios (TAIZ; ZEIGER, 2004).

1.4 Cultura do Milho

O milho (*Zea mays*) é um cereal cultivado mundialmente, sendo os Estados Unidos seu maior produtor. O milho pertence ao grupo das angiospermas, vegetais produtores de sementes e frutos. A planta do milho pode chegar a uma altura de 2,5 metros, embora haja variedades bem mais baixas (DESHPANDE; KULKARNI, 1991). Entretanto, segundo Fornasier Filho (1992), sua eficiência de produção ainda é baixa, considerando o potencial do material genético disponível comercialmente. O caule do milho é do tipo colmo e os nós estão geralmente a 50 centímetros de distância um do outro. A fixação da raiz do tipo cabeleleira (monocotiledônea) é relativamente fraca. A espiga é cilíndrica, e costuma nascer na metade da altura da planta. Os grãos são pequenos, e estão dispostos em fileiras regulares presas no sabugo, que formam a espiga. Eles têm dimensões, peso e textura variáveis. Cada espiga contém de duzentos a quatrocentos grãos. Dependendo da espécie, os grãos têm cores variadas, podendo ser amarelos, brancos, vermelhos, azuis ou marrons, (EMBRAPA, 1982).

Com um grande potencial produtivo, a cultura é bastante responsiva à tecnologia. Seu cultivo geralmente é mecanizado, beneficiando-se muito de técnicas modernas de plantio e colheita. A produção brasileira é pouco destinada ao consumo humano e, mesmo assim, de maneira indireta na composição de outros produtos. Um dos fatores para isto é à falta de informação sobre o milho e à ausência de uma maior divulgação de suas qualidades nutricionais, bem como aos hábitos alimentares da população brasileira, que privilegia outros grãos. Além das fibras, o grão de milho é constituído de carboidratos, proteínas e vitaminas do complexo B (SANTINI, 2002).

Para uma boa produção de milho é necessário, inicialmente, uma boa escolha da semente (MYCOCK; BERJAK, 1995). A produtividade de uma lavoura de

milho é o resultado do potencial genético da semente e das condições edafoclimáticas do local de plantio, além do manejo da lavoura. Assim, a escolha correta da semente pode ser a razão do sucesso ou insucesso da lavoura. Um dos primeiros aspectos a serem considerados é a adaptação da cultivar a região. A maioria das empresas que comercializam sementes de milho divide o Brasil em quatro grandes macro-regiões homogêneas de cultivo do milho, que se diferenciam por fatores como altitude, latitude e clima. A escolha de cada cultivar deve atender a necessidades específicas, pois não existe um cultivar superior que consiga atender a todas as situações (SANTINI, 2002).

Aspectos relacionados às características da cultivar e do sistema de produção deverão ser levados em consideração, para que a lavoura se torne mais competitiva. O produtor deverá ter em mente os seguintes aspectos: A adaptação à região, produtividade e estabilidade, ciclo, tolerância às principais doenças comuns na região (CARAMORI et al., 1999).

Independentemente da tecnologia e das técnicas recomendadas, a condição climática em que a cultura permanece no campo pode ser considerada como um dos principais fatores responsáveis pelo aumento ou redução da produção. As maiores exigências de umidade (ou chuva) da planta de milho ocorrem nas épocas de germinação, florescimento e enchimento de grãos (FORNASIERI FILHO, 1992). A falta de água na ocasião do pendoamento pode provocar uma perda de produção ao redor de 50-60% ,ao passo que, depois da polinização, (até 15-20 dias) pode-se observar queda aproximada de 30%.

As doenças na cultura podem ocorrer de forma epidêmica, atingindo até a totalidade das plantas na lavoura. Segundo levantamento feito pela Embrapa Milho e Sorgo (1982), até o momento já se detectou os seguintes percentuais de redução na produção; causada por doenças foliares; enfezamentos - 100 %, ferrugem - 80%, *Phaeosphaeria* - 63 %, mosaico-comum - 50 % e raiado fino - 30% .

Em áreas de plantio direto, os problemas poderão ser agravados, principalmente com helmintosporiose e podridões do colmo e espigas. O problema com doenças é sério (DESHPAND; KULKARNI, 1991) especialmente onde a cultura permanece no campo todo o ano, como em áreas irrigadas ou onde o plantio de safrinha é significativo. Nessas situações, é fundamental a escolha de cultivares tolerantes às principais doenças e rotação de culturas, para evitar redução na produtividade. Fornasieri Filho (1992) relata que os benefícios da colheita

antecipada podem ser perdidos se, nas fases posteriores, como a despalha, debulha, limpeza e classificação, não se levar em conta os aspectos como o alto teor de água das sementes, maquinários específicos e processo adequado de secagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTER, E. A.; ABD ELGAWAD, M. M.; ALI, A. H. Effects of fenamiphos and biocontrol agents on cotton growing in nematode-infested soil. **Anzeiger fuer Schaedlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz**, v. 68, p. 12-4, 1995.

ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostra e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 2, p. 456-462, 2008.

ARAUJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1639-1645, 2005.

ARAUJO, F. F.; SILVA, J. F. V.; ARAUJO, A. S. F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 197-202, 2002.

ASGHAR, H. N. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biol. Fert. Soils**, v. 35, p. 231-237, 2002.

ATKINSON, D. C.; WATSON, A. The beneficial rhizosphere: A dynamic entity. **Appl. Soil Ecol.**, v. 15, p. 99-104, 2000.

BAREA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. **Advances in Agronomy**, v. 36, p. 1-54, 1983.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal de bruzone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, p. 1165-1174, 1990.

BOER, A. S.; DIDERICHSEN, B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1-4, 1991.

BURR, T. J.; SCHROTH, M. N.; SUSLOW, T. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Phytopathology**, v. 68, p. 1377-1383, 1978.

CARAMORI, P. H.; WREGE, M. S.; GONÇALVES, S. L. Zoneamento da cultura do milho "safrinha" e épocas de semeadura no Estado do Paraná. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO SAFRINHA, 5, 1999, Barretos. **Resumos...** Campinas: Instituto Agrônômico, 1999. p. 15-19.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 63, p. 1670-1680, 1999.

CHANWAY, C. P. et al. Entophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **For. Ecol. Manag.**, v. 133, p. 81-88, 2000.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320 p.

DESHPANDE, V. K.; KULKARNI, G. N. Effect of time of harvesting on seed quality attributes in maize (*Zea mays*). **Mysore Journal of Agricultural Science**, Bangalore. v. 25, n. 2, p. 162-164. 1991.

DOMENECH, J. et al. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne disease in pepper and tomato. **BioControl**, v. 51, p. 245-258, 2006.

EMBRAPA. **Recomendações técnicas para a cultura de milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 1982. 53 p. (Circular Técnica, 6).

FIORAVANÇO, J. C.; MANICA, I.; PAIVA, M. C. Uso de citocinina e recobrimentos em limão 'Tahiti' armazenado em temperatura controlada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 81-87, 1995.

FORNASIERI FILHO, D. A. **cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. p. 273.

FREITAS, S. S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 13, p. 31-34, 1989.

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

FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; DONZELI, V. P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 27, p. 61-70, 2003.

FREITAS, S. S.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 28, p. 987-994, 2004.

FRIDLENDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a b-1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biol. Biochem.**, v. 25, p. 1211-1221, 1993.

HALL, J. A. et al. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. **Israel Journal Plant Science**, v. 44, p. 37-42, 1996.

HALLMANN, J. et al. Similarities and differences in the mode-of-action of two rhizosphere bacteria antagonistic to *Globodera pallida* on potato. Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens. **IOBC Bulletin**, v. 21, n. 9, p. 41-43. 1988.

KLOEPPER, J. W. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, Rockhampton, v. 28, n. 1, p. 21-26, 1999.

KLOEPPER, J. W. Current status and future trends in biological research and development in the U.S. **Anais do International Symposium on clean agriculture, Japan**, v. 1, p. 49-52, 1997.

MELO, I. S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 17-67.

MCKEEN, C. D.; REILLY, C. C.; PUSEY, P. L. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, v. 76, p. 136-139, 1986.

MYCOCK, D. J.; BERJAK, P. The implications of seed associated mycoflora during storage. In: JAIME, K.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York-Basel: Hong Kong, 1995. p. 747-766.

NANDAKUMAR, R. et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biol. Biochem**, v. 33, p. 603-612, 2001.

NEILANDS, J. B. Siderophores of bacteria and fungi. **Microbiol. Sci.**, v. 1, p. 9-14, 1984.

OWEN, A.; ZDOR, R. Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemental glycine. **Soil Biol. Biochem.**, v. 33, n. 801-809, 2001.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 207-220, 1996.

PIDELLO, A. The effect of *Pseudomonas fluorescens* strains varying in pyoverdine production on the soil redox status. **Plant Soil**, v. 253, p. 373-379, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.; EICHHORN, S. **Biologia vegetal**. 5.ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 1996.

RAAIJMAKERS, J. M.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 881-887, 1997.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Canberra, v. 28, n. 9, p. 897-906, 2000.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, Ontario, v. 17, p. 319-339, 1999.

SANTINI, G. **A reestruturação da Indústria de sementes no Brasil :o novo ambiente concorrencial dos segmentos de milho híbrido e soja**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia de Produção , Universidade Federal de São Carlos.

SUSLOW, T. V.; SCHROTH, M. N. Rhizobacteria of sugarbeet: effects of seed application and root colonization on yield. **Phytopathology**, v. 72, p. 199-206, 1982.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Citocininas: reguladores da divisão celular. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. (Eds.). **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 517-540.

TAKAHASHI, N.; YAMAGUCHI, I.; YAMANE, H. Gibberellins. In: TAKAHASHI, N. (Ed.). **Chemistry of plant hormones**. Boca Raton: CRC Press, 1988. cap. 3, p. 57-151.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous p-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potential and future trends. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 71, p. 137-134, 2006.

2 ARTIGO I: BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *BACILLUS* SPP. PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE MILHO CULTIVADO EM SOLO AUTOCLAVADO E NATURAL

RESUMO

O objetivo do trabalho foi selecionar isolados bacterianos do gênero *Bacillus* em amostras de solo da região oeste paulista e avaliar sua inoculação em milho cultivado em duas condições de solo (natural e esterilizado). Os isolados bacterianos, caracterizados como pertencentes ao gênero *Bacillus*, foram selecionados previamente quanto ao antagonismo a fungos fitopatogênicos e produção de hormônio vegetal (auxinas) em laboratório. As plantas de milho foram cultivadas em vasos com 5kg de solo em ambiente de casa de vegetação durante 50 dias. As avaliações efetuadas durante a condução do experimento foram: altura de plantas aos 29 e 50 dias após o plantio; número de folhas desdobradas e biomassa seca produzida aos 50 dias após o plantio. O cultivo do milho em solo estéril proporcionou maior número de folhas desdobradas na planta aos 50 dias de idade. Seis isolados de *Bacillus* spp. (BRG-2, CAS-2, NGR-1, PNP-2, PRP-2 e TAC-2) destacaram-se como promotores de crescimento do milho na avaliação de produção de biomassa, pela planta, aos 50 dias de idade em solo natural. A maior produção de auxinas pelas bactérias, detectadas em laboratório, não foi um parâmetro fundamental para influenciar o desempenho dos melhores isolados bacterianos avaliados no crescimento do milho em casa de vegetação.

Palavras-chaves- Rizobactérias, auxinas, fenologia, *Zea mays*

ABSTRACT

The objective was to select bacterial isolates of the genus *Bacillus* in samples of soil from the west region of Sao Paulo state, Brazil and assess their effect when inoculated in corn growing in soil (natural and sterilized soil). The bacterial isolates were characterized at *Bacillus* genus and then selected as fungus

antagonists and as plant hormone (auxin) producers in the laboratory. The maize plants were grown in a greenhouse environment for 50 days. The assessments made during the trial conduction were: plants height at 29 and 50 days after sowing; number of leaves and dry biomass produced after 50 days of sowing. The cultivation of maize in sterile soil provided the greatest number of plant leaves deployed at 50 days. Six single bacterial (BRG-2, CAS-2, NGR-1, PNP-2, PRP-2 and TAC-2) highlighted themselves as promoters of maize growth by the 50 days biomass production in natural soil. The production of AIA by bacteria was not a parameter for the best performance of bacterial isolates for inoculation of maize.

Keywords- Rhizobacteria, auxin, phenology, *Zea mays*

2.1 Introdução

A cultura do milho ocupou, em 2006, uma área em torno de 12,9 milhões de hectares, sendo responsável por uma produção de cerca de 41,3 milhões de toneladas de grãos e apresentando um rendimento médio de 3.198 kg ha⁻¹ (3.298 kg ha⁻¹ na safra e 2.907 kg ha⁻¹ na safrinha) (EMBRAPA, 2006). Mesmo considerando o rendimento dos estados da região Centro-Sul, que foi de 3.893 kg ha⁻¹, muito inferior ao que poderia ser obtido, levando-se em consideração o potencial produtivo da cultura, sendo demonstrado que a cultura do milho aumenta sua rentabilidade e sua vantagem comparativa com outras culturas quando sua produtividade é aumentada (EMBRAPA, 2006). Várias causas contribuem para esse cenário, destacando-se o uso de variedades com potencial produtivo limitado, disponibilidade de água e de nutrientes no solo deficiente, utilização inadequada de época e densidade de semeadura e controle precário de insetos e plantas daninhas (SILVA et al., 2003).

O efeito de rizobactérias, dentre as quais podemos destacar o gênero *Bacillus*, sobre o desenvolvimento de plantas são amplos, incluindo os efeitos benéficos na emergência e promoção de crescimento das plantas (SCHISLER, 2004). Foi observado que *B. subtilis* promoveu crescimento e disponibilização de nutrientes para o milho em experimento de casa de vegetação (ARAUJO, 2008).

Araujo e Hungria (1999) concluíram que *Bacillus subtilis* (AP-3) ou seus metabólitos proporcionaram incrementos na nodulação e rendimento da soja no campo. Foi constatado também que esta mesma estirpe também produz fitohormônios e antibiótico (ARAUJO et al., 2005). Holl et al. (1988) observaram que a promoção de crescimento de plantas, por rizobactérias, também tem sido relacionada à produção de hormônios. Na cultura do milho a inoculação das sementes com *Azospirillum* aumentou significativamente a produtividade de grãos, confirmando o efeito positivo das rizobactérias em plantas (CAVALLET et al., 2000).

Os microrganismos produtores exercem um importante papel no controle de seu próprio ambiente, afetando o metabolismo da planta. A maioria dos trabalhos da literatura sobre a influência das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, atribui esse fenômeno a um efeito indireto associado ao controle biológico de patógenos secundários (KLOEPPER; SCHROTH, 1981). No entanto, em alguns trabalhos, observou-se que a promoção de crescimento de plantas, por RPCPs, também tem sido relacionada à produção de giberelinas (HOLL et al., 1988), auxinas (BORONIN et al. 1993) e ácidos lácticos e succínico (YOSHIKAWA, 1993).

A comunidade microbiana pode variar em função da espécie vegetal e tipo do solo, pois estes influenciarão compostos orgânicos exsudados em quantidade e qualidade, os quais, por sua vez selecionarão ou favorecerão grupos nutricionais de organismos específicos na rizosfera (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Plantas cultivadas em condições estéreis podem absorver nutrientes em menor quantidade do que na presença de microrganismos, sendo que o efeito microbiano sobre a absorção de nutrientes pode ser bastante elevado, encontrado aumento até de 200% (BARBER; MARTIN 1976). Esse efeito positivo ocorre devido a processos microbianos como FBN, micorrizas e solubilização de minerais que disponibilizam nutrientes em maior quantidade para as plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e avaliar isolados do gênero *Bacillus*, oriundos de amostras de solos de diferentes localidades da região oeste paulista, sobre o crescimento do milho cultivado em solo natural e autoclavado

2.2 Material e Métodos

- Local de desenvolvimento dos trabalhos.

Os trabalhos de isolamento e testes bioquímicos com as bactérias foram conduzidos no laboratório de microbiologia e fitopatologia e o experimento com plantas foi conduzido na casa de vegetação da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da UNOESTE, Presidente Prudente, SP.

- Isolamento de *Bacillus* spp.

Amostras de solo (coletadas com cerca de 15cm a 20cm de profundidade em área agrícola de vinte municípios da região oeste paulista) foram conduzidas ao laboratório de microbiologia de solos da FCA/UNOESTE. Após homogeneização foram retiradas alíquotas de 10 g de solo de cada amostra, as quais após procedimento de diluições seriadas em água destilada estéril, foram submetidas a um choque térmico (70°C/10 min) visando selecionar os microrganismos resistentes a este tratamento, onde se enquadra o gênero *Bacillus* (BUCHANAN; GIBBONS, 1975). Posteriormente, foi efetuado o plaqueamento em meio AN (ágar nutritivo) e a incubação por 48 horas, em estufa a 28°C. As bactérias formadoras de colônias foram, então, isoladas e caracterizadas como pertencente ao gênero *Bacillus*, de acordo com a metodologia descrita por Li e Alexander (1988), ou seja, pela produção de endósporos resistentes ao calor, células gram positivas em forma de bastão e pela hidrólise do amido. Através deste procedimento foram isolados e caracterizados 40 isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, representativas de cada localidade amostrada. Os isolados bacterianos foram então avaliados quanto ao potencial de antagonismo a fungos fitopatogênicos e produção de hormônio vegetal (auxinas).

- Antagonismo a fungos fitopatogênicos

Para avaliar o potencial inibitório do crescimento de fungos foi utilizado o método de pareamento em placas de Petri contendo BDA [batata (250g L-1):

dextrose (10g L⁻¹): Agar (15g L⁻¹)] segundo metodologia descrita por Araújo et al (2005)]. Foram utilizadas as seguintes espécies de fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium sp* pertencentes à coleção do laboratório de fitopatologia (UNOESTE). Os fungos foram multiplicados em meio de cultura agar batata, durante sete dias e após isto, discos com diâmetro de 5mm contendo o micélio do fungo foram introduzidos em quatro pontos equidistantes na superfície do meio de cultura na placa de Petri, 24 horas antes da inoculação do isolado de *Bacillus* no centro da placa. As placas foram incubadas em estufa à 28°C, por sete dias. Após este período, foi medido o diâmetro do halo de inibição formado entre a bactéria e o fungo fitopatogênico.

- Ensaio para avaliação de produção do hormônio AIA (Ácido Indol Acético)

As concentrações de AIA secretadas pelas bactérias no meio de cultura, foram estimadas cultivando-as em meio líquido TSB (Trypticase Soy Agar) suplementado com 10 g L⁻¹ de dextrose, 5g L⁻¹ de extrato de levedura e 5 mm de L-triptófano (1000 ug mL⁻¹). Os isolados foram mantidos a 28° C, no escuro sob agitação constante, durante 24 horas. Após este período, foram centrifugados a 10000 x g durante 10 minutos, para a obtenção do sobrenadante. A quantidade de AIA por ml de cultura foi estimada através da mistura de 5 mL de reagente de Salkowski (EHMANN, 1977) com 1 ml do sobrenadante da cultura, seguido da leitura da absorbância em 500 nm, após 30 minutos em espectrofotômetro. A concentração de AIA no meio de cultura foi determinada pela comparação com uma curva padrão.

- Experimento de casa de vegetação

Quatorze isolados com maiores potenciais de inibição de fungos e produção de hormônios foram selecionados nos ensaios de laboratório, sendo então utilizados no experimento de casa de vegetação com o cultivo do milho. O experimento foi realizado em solo natural e autoclavado (5 kg) acondicionado em vasos plásticos. O solo foi coletado da área experimental da Unoeste, P. Prudente, SP, sendo classificado como ARGISSOLO VERMELHO DISTROFÉRICO (EMBRAPA, 2007). Os atributos químicos do solo foram obtidos de acordo com

análise química (VAN RAIJ et al., 2001) com os seguintes valores: pH (CaCl_2 1 mol L^{-1}) 6,0; 6 g dm^{-3} de M.O.; 38 mg dm^{-3} de P_{resina} ; 3,6 mmol_c dm^{-3} de K; 24 mmol_c dm^{-3} de Ca; 8 mmol_c dm^{-3} de Mg; 36 mmol_c dm^{-3} de SB; 51 mmol_c dm^{-3} de CTC; 70% de saturação por bases (V). Parte do solo coletado foi autoclavado (127° C 30 min⁻¹) em porções de 20 kg antes de ser acondicionado nos vasos plásticos. O delineamento experimental utilizado foi um fatorial com 15 tratamentos (isolados bacterianos e testemunha), duas condições de solo (natural e autoclavado) e quatro repetições perfazendo um total de 120 parcelas. Foram semeadas três sementes de milho (Híbrido duplo RG) em cada vaso e em seguida as bactérias, previamente multiplicadas em caldo nutritivo durante cinco dias em laboratório, foram inoculadas sobre as sementes pela adição de 0,1 ml de caldo nutritivo contendo cada isolado na concentração de $1,0 \cdot 10^8$ células mL^{-1} .

Após a emergência, foi realizado desbaste deixando-se apenas uma planta por vaso. Os parâmetros avaliados durante a condução do experimento foram efetivados pela medição da altura de plantas aos 29 dias e 50 dias e o número de folhas de milho totalmente desdobradas aos 50 dias após o plantio. As plantas foram coletadas 50 dias após o plantio. As raízes foram lavadas em água corrente para remoção do solo aderido e em seguida separou-se o sistema radicular da parte aérea das plantas. Após, o material foi colocado para secar em estufa com aeração forçada até obtenção de massa constante, sendo então pesado para obtenção da relação raiz/parte aérea e biomassa seca total.

Para análise de variância dos dados obtidos, sem transformação, utilizou-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003) utilizando-se o teste F. As médias dos tratamentos foram comparadas através do teste Scott-Knott com 5% de significância.

2.3 Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra o desempenho de quarenta isolados bacterianos, originários de solos de municípios do oeste de São Paulo, quanto ao antagonismo a fungos fitopatogênicos e produção de hormônio (AIA) *in vitro*. Foi constatado que apenas 25% dos isolados apresentaram antagonismo aos fungos avaliados.

Quatorze isolados (destacados em negrito na Tabela 1) foram selecionados para avaliação em experimento em casa de vegetação por apresentarem potencial antagonico a fungos ou de produção de AIA em maior concentração.

O desempenho dos isolados selecionados nas variáveis de crescimento do milho, avaliados no experimento de casa de vegetação, bem como as interações com a condição do solo (natural e autoclavado) está apresentado no quadro resumo da análise de variância (Tabela 2). Observa-se que os isolados apresentaram efeito significativo sobre as variáveis: altura de plantas aos 29 dias e número de folhas desdobradas. Na avaliação da interação dos isolados com a condição do solo observou-se efeito significativo nas variáveis: número de folhas e biomassa seca do milho. A condição do solo foi determinante para efeito significativo em nível de 1% de probabilidade na maioria das variáveis avaliadas. A variável relação raiz/parte aérea não foi influenciada por nenhuma fonte de variação

TABELA 1 - Antagonismo a fungos fitopatogênicos, produção de ácido indol acético (AIA) em isolados bacterianos de amostras de solos de municípios do oeste paulista

Isolados	Local	Antagonismo		AIA $\mu\text{g ml}^{-1}$
		<i>Colletotrichum</i>	<i>Fusarium</i>	
IND-1	Indiana	-	-	1,51
IND-2	Indiana	+	-	5,82
PPT-1	Pres. Prudente	-	-	1,49
PPT-1	Pres. Prudente	-	-	4,75
CAI-1	Caiabú	-	-	3,34
CAI-2	Caiabú	-	-	9,27
RFJ-1	Regente Feijó	+	+	3,31
RFJ-2	Regente Feijó	+	-	7,58
ANH-1	Anhumas	-	-	0,75
ANH-2	Anhumas	-	-	4,80
PBN-1	Pres. Bernardes	+	-	1,55
PBN-2	Pres. Bernardes	-	-	8,79
TAC-1	Taciba	-	+	1,38
TAC-2	Taciba	+	+	3,28
MTN-1	Martinópolis	-	-	4,90
MTN-2	Martinópolis	-	-	7,14
SCP-1	Sete Copas	-	-	8,28
SCP-2	Sete Copas	-	-	5,62
PRP-1	Pirapozinho	-	-	3,90
PRP-2	Pirapozinho	-	-	10,0
ARA-1	Araçatuba	-	-	3,34
ARA-2	Araçatuba	-	-	3,65
PDR-1	Pedranópolis	-	-	4,68
PDR-2	Pedranópolis	-	-	10,1
RSN-1	Rosana	-	-	4,48
RSN-2	Rosana	-	-	9,24
PIA-1	Piacatu	+	-	2,96
PIA-2	Piacatu	-	-	4,65
BRG-1	Birigui	-	-	4,82
BRG-2	Birigui	-	+	7,28
ALT-1	Alto Alegre	-	-	7,17
ALT-2	Alto Alegre	-	-	6,51
PNP-1	Penapólis	-	-	4,58
PNP-2	Penapólis	-	-	21,3
CAS-1	Castilho	-	-	4,82
CAS-2	Castilho	-	+	7,68
NGR-1	Nova Granada	-	+	4,96
NGR-2	Nova Granada	-	-	6,68
RUB-1	Rubiácea	-	-	5,00
RUB-2	Rubiácea	-	-	15,4

TABELA 2 - Análise de variância com valores do teste F para altura de plantas aos 29 (A29) e 50 (A50) dias após o plantio, número de folhas (NDF), Biomassa seca total (BST) e relação raiz/parte aérea (R/PA) de milho em função da inoculação de estirpes de bactérias em solo natural e autoclavado

Fontes de variação	A 29	A50	NDF	BST	R/PA
Isolados	1,82*	1,41 ^{ns}	2,53**	1,52 ^{ns}	0,92 ^{ns}
Solo	10,13**	9,07**	280,52**	16,05**	1,04 ^{ns}
Isolados x Solo	1,52 ^{ns}	1,20 ^{ns}	3,90**	1,98*	1,75 ^{ns}
C.V. (%)	14,0	7,7	7,9	22,3	15,9

^{ns}, **, não significativo e significativo a 1% (P<0,01) e 5% (P< 0,05) de probabilidade pelo teste F.

Na avaliação dos isolados dentro da variável altura de plantas aos 29 dias, destacaram-se os isolados CAS-2, NGR-1, PNP-2, RFJ-1, RUB-2 e TAC-2 como de melhor desempenho na promoção do crescimento do milho (Tabela 3). Observa-se, na média dos tratamentos conduzidos, que a condição solo natural foi mais propícia ao crescimento do milho. Contudo, aos 50 dias após o plantio, a média de altura de plantas, dos tratamentos conduzidos em solo autoclavado, foi superior ao solo natural (Tabela 4).

TABELA 3 - Altura de plantas de milho aos 29 dias após o plantio em função da inoculação de bactérias em solo natural e autoclavado

Tratamento	Solo natural	Solo autoclavado	Média
	------(cm planta ⁻¹)-----		
CONTROLE	43,2 b ¹	50,0	46,6 b
BRG-2	50,7 b	44,0	47,4 b
CAS-2	54,7 a	49,5	52,1 a
IND-2	47,0 b	45,2	46,1 b
NGR-1	59,5 a	44,2	51,9 a
PBN-2	50,7 a	45,7	48,2 b
PDR-2	42,0 b	47,7	44,8 b
PIA-1	47,0 b	49,7	48,4 b
PNP-2	58,0 a	50,2	54,1 a
PRP-2	52,7 a	44,2	48,5 b
RFJ-1	52,0 a	51,7	51,9 a
RFJ-2	49,2 b	46,7	48,0 b
RSN-2	51,5 a	39,7	45,6 b
RUB-2	57,2 a	51,5	54,4 a
TAC-2	57,0 a	51,7	54,4 a
Média	51,5 A	47,4 B	

1 Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$)

TABELA 4 - Altura de plantas de milho aos 50 dias após o plantio em função da inoculação de bactérias em solo natural e autoclavado

Tratamento	Solo natural	Solo autoclavado	Média
	------(cm planta ⁻¹)-----		
CONTROLE	110,0 ¹	113,0	111,5
BRG-2	112,8	119,3	116,0
CAS-2	122,3	115,8	119,0
IND-2	113,8	123,3	118,5
NGR-1	124,5	112,8	118,6
PBN-2	115,5	123,8	119,6
PDR-2	112,0	123,5	117,8
PIA-1	108,3	114,3	111,2
PNP-2	123,8	124,0	123,9
PRP-2	118,8	130,0	124,3
RFJ-1	113,0	128,8	120,9
RFJ-2	114,5	125,5	120,0
RSN-2	118,3	121,5	119,9
RUB-2	111,3	115,5	113,4
TAC-2	117,8	121,5	119,6
Média	115,8 B	120,8 A	

1 Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$)

O número de folhas de milho totalmente desdobradas, aos 50 dias do plantio, revelou que o milho cultivado em solo autoclavado apresentou os maiores valores dentro desta variável. Os isolados bacterianos avaliados em milho cultivado na condição de solo natural não interferiram neste parâmetro de crescimento (Tabela 5)

TABELA 5 - Número de folhas de milho totalmente desdobradas aos 50 dias após o plantio em função da inoculação de bactérias em solo natural e autoclavado

Tratamento	Solo natural	Solo autoclavado	Média
	------(nº de folhas planta ⁻¹)-----		
CONTROLE	7,25	9,25 a ¹	8,25 a
BRG-2	7,25	8,75 b	8,00 b
CAS-2	7,50	7,25 c	7,38 b
IND-2	7,50	9,50 a	8,50 a
NGR-1	7,00	8,25 b	7,63 b
PBN-2	7,75	9,25 a	8,50 a
PDR-2	7,75	9,75 a	8,75 a
PIA-1	6,75	9,00 a	7,88 b
PNP-2	7,75	8,75 b	8,25 a
PRP-2	7,25	9,75 a	8,50 a
RFJ-1	7,00	10,00 a	8,50 a
RFJ-2	7,00	9,50 a	8,25 a
RSN-2	7,00	9,75 a	8,38 a
RUB-2	6,75	9,25 a	8,00 a
TAC-2	6,50	10,00 a	8,25 a
Média	7,20 B	9,20 A	

1 Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$)

Na avaliação de biomassa seca, produzida pelo milho aos 50 dias após o plantio, observou-se que os isolados BRG-2, CAS-2, NGR-1, PNP-2, PRP-2 e TAC-2 proporcionaram incrementos no desenvolvimento do milho cultivado no solo natural. O cultivo do milho, no solo autoclavado, obteve média de biomassa seca superior ao cultivo no solo natural.

TABELA 6 - Biomassa seca total de milho aos 50 dias após o plantio em função da inoculação de bactérias em solo natural e autoclavado

Tratamento	Solo natural	Solo autoclavado	Média
	------(g planta ⁻¹)-----		
CONTROLE	10,00 b ¹	13,30	11,65
BRG-2	12,55 a	15,06	13,80
CAS-2	13,99 a	14,03	14,02
IND-2	9,36 b	12,98	11,17
NGR-1	15,29 a	14,22	14,78
PBN-2	9,06 b	14,68	11,87
PDR-2	9,61 b	14,77	12,19
PIA-1	10,45 b	15,02	12,74
PNP-2	13,40 a	14,75	14,07
PRP-2	13,63 a	14,89	14,26
RFJ-1	10,10 b	16,25	13,18
RFJ-2	10,18 b	14,07	12,12
RSN-2	10,60 b	14,34	12,47
RUB-2	10,24 b	13,64	11,94
TAC-2	13,27 a	14,71	14,00
Média	11,66 b	13,74 a	

1 Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$)

Foi observado que a autoclavagem do solo proporcionou algum distúrbio no crescimento do milho cultivado nesta condição. Isto foi confirmado pelo maior número de folhas desdobradas encontradas na avaliação efetuada aos 50 dias após o plantio. Este aumento do número de folhas indica que estas plantas estão em estágio fenológico mais adiantados que as plantas cultivadas em solo natural. Num experimento clássico, Barber e Martin (1976) demonstraram que em plantas cultivadas em solo estéril tinha maior porcentagem de fotossintetizados liberados na rizosfera quando os microrganismos estavam presentes. A inoculação da maioria dos isolados bacterianos não influenciou significativamente o crescimento das plantas cultivadas em solo estéril. Apenas o isolado CAS-2 reduziu expressivamente o número de folhas desdobradas aos 50 dias após o plantio.

Weaver (1972) descreve que os órgãos vegetais de uma planta são alterados morfológicamente pela aplicação de fitoreguladores de modo que o crescimento das plantas possa ser promovido ou inibido. Sabe-se que as auxinas estão envolvidas com o crescimento radicular podendo reduzir seu comprimento e massa radicular pela aplicação de doses elevadas do hormônio (RADWAN, et al., 2004). Os isolados bacterianos avaliados neste trabalho não alteraram significativamente a relação raiz / parte aérea do milho (Tabela 2). Contudo seis isolados incrementaram a produção de biomassa das plantas quando cultivadas em solo natural. Thakuria et al. (2004) relataram que é difícil indicar os mecanismos necessários à maior habilidade da bactéria em promover o crescimento da planta. Discutem, porém, que um mecanismo de promoção de crescimento pode ser aumentado, em condições de campo, na presença de comunidade microbiana complexa. É importante também enfatizar que a promoção de crescimento encontrado pela inoculação das bactérias não alterou o número de folhas desdobradas no milho indicando que a planta estava no mesmo estágio fenológico da testemunha.

A maioria dos isolados que promoveram crescimento do milho não estão entre os maiores produtores de AIA em laboratório (Tabela 1). Cerigioli (2005) trabalhando com inoculação de isolados bacterianos endofíticos em milho afirmou que embora os isolados sejam capazes de sintetizar altas concentrações de AIA, a maioria não promoveu o crescimento das plantas de milho. Patten e Glick (1996) sugerem que a entrada adicional de AIA microbiano pode modificar a auxina endógena para nível ótimo ou acima do ótimo, resultando na indução ou inibição do crescimento da planta. A resposta da auxina pode ser dependente do estágio de desenvolvimento da raiz da planta, o qual influi na composição e quantidade dos exudatos (PILET et al. 1979).

Os isolados bacterianos TAC-2 e NGR-1 destacaram como promotores de crescimento do milho apesar de não produzirem grandes quantidades de AIA em laboratório (Tabela 1). Estes isolados apresentaram-se como antagonistas de fitopatógenos e demonstram que a seleção de isolados bacterianos do solo deve ser utilizando-se diferentes características intrínsecas das bactérias. Alguns dos trabalhos da literatura sobre a influência das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (ARSHAD; FRANKENBERGER, 1998), atribui esse

fenômeno a um efeito indireto associado ao controle biológico de patógenos secundários (KLOEPPER; SCHROTH, 1981).

Além dos fatores citados, o estudo da interação das rizobactérias com as plantas é relativamente recente, não se tendo conhecimento de todas as relações desenvolvidas entre as partes, ficando evidente a necessidade de outros estudos para ratificar a utilização destas bactérias no aumento da produtividade agrícola.

2.4 Conclusões

- O cultivo do milho em solo estéril proporcionou maior número de folhas desdobradas na planta, aos 50 dias de idade;
- Os isolados bacterianos BRG-2, CAS-2, NGR-1, PNP-2, PRP-2 e TAC-2, destacaram-se como promotores de crescimento do milho avaliados pela produção de biomassa pela planta, aos 50 dias de idade;
- A produção de AIA pelas bactérias *in vitro* não foi um parâmetro fundamental para o desempenho dos melhores isolados bacterianos na inoculação do milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/B. elkanii. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1633-1643, 1999.
- ARAUJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1639 - 1645, 2005.
- ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciênc. agrotec.**, v. 32, n. 2, p. 456-462. Abr. 2008.
- ARSHAD, M; FRANKENBERGER- JR, W. T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere : microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, v. 62, p. 45-151, 1998.
- BARBER, D. A.; MARTIN, J. K. The release of organic substances by cereal roots in the soil. **New Phytologist**, Cambridge, v. 76, p. 69-80, 1976.
- BORONIN, A. M. et al. Biological control of soilborne plant pathogens by PGPR *Pseudomonas* isolated in Russia. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 6., 1993, Montreal – Canada. **Anais...** Montreal – Canada: Int. Soc. Path., 1993. p.276,
- BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8.ed. Baltimore: The Willians & Wilkens, 1975. 1268 p.
- CAVALLET, L. E. et al. Produtividade de milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, João Pessoa, v. 4, p. 129-132, 2000.
- CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de bactéria endofíticas de raízes de milho e potencial para promoção de crescimento**. 2005, 132 p. Tese (Doutorado em Ciências biológicas) São Carlos: Universidade Federal de São Carlos.

EHMANN, A. The van urk – salkowski reagent- a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. **Journal of Chromatography**, v 132, p. 267-276, 1977.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA, 2007.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema de produção**. Brasília: EMBRAPA, 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_2ed>. Acesso: março 2008.

HOLL, F. B. et al. Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p. 19-24, 1988.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** - Versão 4.3. Lavras: DEX/UFLA -MG, 2003.

KLOEPPER, J. W.; SCHORTH, M. N. Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology**, v. 71, p. 642-644, 1981.

LI, D.; ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant Soil**, v. 108, p. 211-219, 1988.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação Biológica do Nitrogênio. In: **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: UFLA, 2006. Cap. 9, p. 501-529.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. *Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 207-230, 1996.

PILET, P. E.; ELLIOTT, M. C.; MOLONEY, M. M. **Endogenous and exogenous auxin in the control of root growth**. **Planta**, Berlin, v. 146, n. 4, p. 405-408, 1979.

RADWAN, M. et al, **The changing role of the geo-data infrastructure; from a data delivery network to a virtual enterprise supporting complex services**, Istanbul: ISPRS Congress, 2004.

SCHISLER, D. A. et al. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. **Phytopathology**, St Paul, v. 94, p. 1267-1271, 2004.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; VIEIRA, R. F. Degradação do paclobutrazol em solos tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1223-1227, 2003.

THAKURIA, D. et al. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. **Current Science**, v. 86, p. 978-985, 2004.

VAN RAIJ, B. et al. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: IAC, 2001. 284 p.

WEAVER, R. J. **Plant growth substances in agriculture**. San Francisco: W. H. Freeman, 1972. 594 p.

YOSHIKAWA, M. Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizosphere *Pseudomonas putida*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 1150-1154, 1993.

3 ARTIGO II: EFEITO DE DIFERENTES ISOLADOS DE *BACILLUS SPP* NA NUTRIÇÃO E CRESCIMENTO EM MILHO

RESUMO

O objetivo do trabalho foi o de avaliar 14 isolados bacterianos do gênero *Bacillus*, inoculados em milho, utilizando-se parâmetros nutricionais e de crescimento da planta. Os isolados bacterianos foram selecionados e caracterizados previamente quanto à produção de antibióticos e hormônio vegetal (auxina) em laboratório. Além disto foram também caracterizados quanto ao potencial de solubilização de fosfatos insolúveis em meio de cultivo. O milho foi cultivado em vasos com solo em casa de vegetação durante 50 dias. As avaliações efetuadas durante a condução do experimento foram: altura de plantas, número de folhas desdobradas, biomassa seca e acúmulo de nutrientes na parte aérea aos 50 dias após o plantio. Nenhum dos isolados de *Bacillus spp.* avaliados conseguiu solubilizar fosfatos insolúveis em condições de laboratório; a maioria dos isolados bacterianos avaliados proporcionou benefícios ao crescimento do milho, sendo que o isolado NGR-1 teve o melhor desempenho na maioria das variáveis avaliadas durante o crescimento do milho. A promoção de crescimento do milho proporcionada pelas bactérias pode ser devido a vários fatores, contudo os parâmetros de seleção utilizados para os isolados podem ser considerados satisfatórios. O milho, quando inoculado, com a maioria dos isolados bacterianos, apresentou maior acúmulo de nutrientes na parte aérea.

Palavras-chaves- Rizobactérias, auxinas, nutrição vegetal, solubilização de P

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate isolated bacteria of the genus *Bacillus*, from soil of the west region of São Paulo State, Brazil, inoculated in maize. The isolated bacteria were selected as the phytopathogens antagonism. P

solubilization and production of plant hormone (auxin) in the laboratory. The maize plants were grown in a greenhouse for 50 days. The assessments made during the trial were: plant height, number of leaves and dry biomass produced at 50 days after sowing. None of the isolated showed *in vitro* solubilization of P. Most of the evaluated isolated bacteria provided some benefit for the growth of maize, since the isolated NGR-1 showed the best performance for the three variables during the maize growth. The promotion of the maize growth offered by the bacteria may be due to several factors, however the parameters of selection used for the individual can be considered satisfactory. Inoculated plants had a greater increase in the accumulation of nutrients in the aerial part.

Keywords- Rhizobacteria, auxin, plant nutrition

3.1 Introdução

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) são bactérias que habitam o solo e com frequência são isoladas da rizosfera de diversas plantas cultivadas (ARAÚJO, 2008.). Dentre os gêneros mais estudados destacam-se os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Rhizobium*. Os efeitos destes microrganismos sobre o desenvolvimento das plantas são amplos, incluindo os efeitos benéficos na germinação de sementes, emergência de plântulas, comprimento de ramos e tamanho e produção de grãos e frutos (PAN et al., 1999). Assim, como exemplos dos efeitos de RPCPs na produtividade, pode-se citar aumentos de 33% na produção de ervilha e de até 150% em plantas de rabanete com inoculação de *Pseudomonas* spp. (PARKE et al., 1991; KLOEPFER; SCHORTH, 1981). Araújo e Hungria (1999) concluíram que *Bacillus subtilis* (AP-3) ou seus metabólitos proporcionaram incrementos na nodulação e rendimento da soja no campo. Foi constatado que esta mesma estirpe também produz fitohormônios e antibióticos durante seu desenvolvimento (ARAÚJO et al., 2005). Os mecanismos de ação responsáveis pela produção de crescimento em plantas podem estar ligados inicialmente à inibição do patógenos, ou seja, beneficiando o crescimento vegetal de forma indireta (BORONIN et al., 1993). Muitas vezes é difícil

reconhecer os mecanismos e relacioná-los à promoção direta de crescimento, visto que mais de um mecanismo pode estar envolvido.

Os microrganismos produtores de crescimento em plantas exercem um importante papel no controle de seu próprio ambiente, afetando o metabolismo da planta. Alguns dos trabalhos da literatura sobre a influência das RPCPs, no crescimento das plantas, atribui esse fenômeno a um efeito indireto associado ao controle biológico de patógenos secundários (KLOEPPER; SCHROTH, 1981). No entanto, em alguns trabalhos, observou-se que a promoção de crescimento de plantas, por RPCPs, também tem sido relacionada à produção de giberilinas (HOLL *et al.*, 1988), auxinas (BORONIN *et al.* 1993) e ácidos lácticos e succínico (YOSHIKAWA, 1993). Também foi observado produção de substâncias tipo AIA (ácido indol acético) “*in vitro*” e na rizosfera das plantas de trigo (FREITAS; GERMIDA, 1992). *Pseudomonas* spp. (fluorescentes) produziram AIA em resposta aos exsudatos de raiz de milho (PAN *et al.*, 1999). *Bacillus subtilis* produziu AIA e AIB em resposta aos exsudatos de raiz de soja (ARAÚJO *et al.*, 2005).

As RPCPs são agentes potenciais para controle biológico de fitopatógenos, estas espécies de bactérias podem suprimir as doenças por vários modos de ação como: antagonismo, competição por espaço e nutrientes e indução de resistência sistêmica (KLOEPPER, 1999). A incorporação no solo de substâncias orgânicas e inorgânicas também tem colaborado para o manejo de patógenos de solo (COOK; BAKER, 1983). A preparação biológica com a formulação de RPCPs com outros resíduos orgânicos tem apresentado resultados satisfatórios no crescimento de plantas e proteção contra doenças (REDDY *et al.*, 1999).

Araújo (2008) relatou que *Bacillus subtilis* proporcionou aumento de crescimento e nutrição vegetal de diferentes plantas, destacando deste modo a importância da inoculação da rizobactéria na semente. Rodriguez e Fraga (1999) citam que estirpes do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* estão entre as bactérias com maior potencial de solubilização de fósforo. Richardson (2000) relatou que a maioria dos solos brasileiros são pobres em fósforo disponível às plantas e que o fertilizante fosfatado representa um alto custo para o agricultor, desta forma é interessante que se utilize dos microrganismos do solo como inoculante para mobilizar o fósforo em solos pobres. Além da solubilização do fósforo outros mecanismos estão também relacionados com o metabolismo microbiano no solo,

como a produção de enzimas (nitrogenase, quitinases e glucanases) (CATTELAN, et al., 1999).

Devido à necessidade de novas tecnologias que visem restabelecer condições de promoção do crescimento de plantas com viabilidade para utilização comercial, o presente trabalho tem como objetivo avaliar isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, sobre a nutrição e crescimento do milho cultivado em casa de vegetação.

3.2 Material e Métodos

Os trabalhos foram conduzidos durante os meses de setembro a dezembro de 2007 no laboratório de microbiologia e fitopatologia e na casa de vegetação do curso de Agronomia, UNOESTE, Presidente Prudente, SP. Os isolados de *Bacillus* spp. utilizados foram originalmente selecionados de área agrícola de quatorze municípios da região oeste paulista, estando armazenados no banco de estirpes do Laboratório de microbiologia da UNOESTE. Os isolados bacterianos foram também submetidos a ensaio de solubilização de fosfato em placa com meio de cultura contendo fosfato de cálcio precipitado seguindo metodologia descrita em Carneiro et al. (2004). Na Tabela 1 é apresentada a descrição dos isolados utilizados no experimento com sua respectiva caracterização quanto à inibição de fungos fitopatogênicos, atividade de solubilização de P e produção de hormônio (AIA).

TABELA 1 - Antagonismo a fungos fitopatogênicos, produção de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fósforo em isolados bacterianos de amostras de solos de municípios do oeste paulista

Isolados	Local	Antagonismo		AIA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Atividade da fosfatase
		<i>Colletotrichum</i>	<i>Fusarium</i>		
IND-2	Indiana	+	-	5,82	-
RFJ-1	Regente Feijó	+	+	3,31	-
RFJ-2	Regente Feijó	+	-	7,58	-
PBN-2	P. Bernardes	-	-	8,79	-
TAC-2	Taciba	+	+	3,28	-
PRP-2	Pirapó	-	-	10,0	-
PDR-2	Pedranópolis	-	-	10,1	-
RSN-2	Rosana	-	-	9,24	-
PIA-1	Piacatu	+	-	2,96	-
BRG-2	Birigui	-	+	7,28	-
PNP-2	Penapólis	-	-	21,3	-
CAS-2	Castilho	-	+	7,68	-
NGR-1	Nova Granada	-	+	4,96	-
RUB-2	Rubiácea	-	-	15,4	-

O experimento foi conduzido em solo (5 kg) acondicionado em vasos plásticos. O solo foi coletado da área experimental da Unoeste, P. Prudente, SP, sendo classificado como ARGISSOLO VERMELHO DISTROFÉRICO (EMBRAPA, 1999). Os atributos químicos do solo foram obtidos de acordo com análise química (Van Raij, 2001) com os seguintes valores: pH (CaCl_2 1 mol L^{-1}) 6,0; 6 g dm^{-3} de M.O.; 38 mg dm^{-3} de P_{resina} ; 3,6 mmol_c dm^{-3} de K; 24 mmol_c dm^{-3} de Ca; 8 mmol_c dm^{-3} de Mg; 36 mmol_c dm^{-3} de SB; 51 mmol_c dm^{-3} de CTC; 70% de saturação por bases (V).

Foram semeadas três sementes de milho (Híbrido duplo RG) em cada vaso e em seguida as bactérias, multiplicadas previamente em laboratório durante cinco dias utilizando-se caldo nutritivo, foram inoculadas sobre as sementes pela adição de 0,1 mL de caldo nutritivo contendo cada isolado bacteriano na concentração de $1,0 \cdot 10^8$ células mL^{-1} . Após a emergência foi realizado desbaste

deixando-se apenas uma planta por vaso. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 15 tratamentos (isolados bacterianos e testemunha), e quatro repetições perfazendo um total de 60 parcelas.

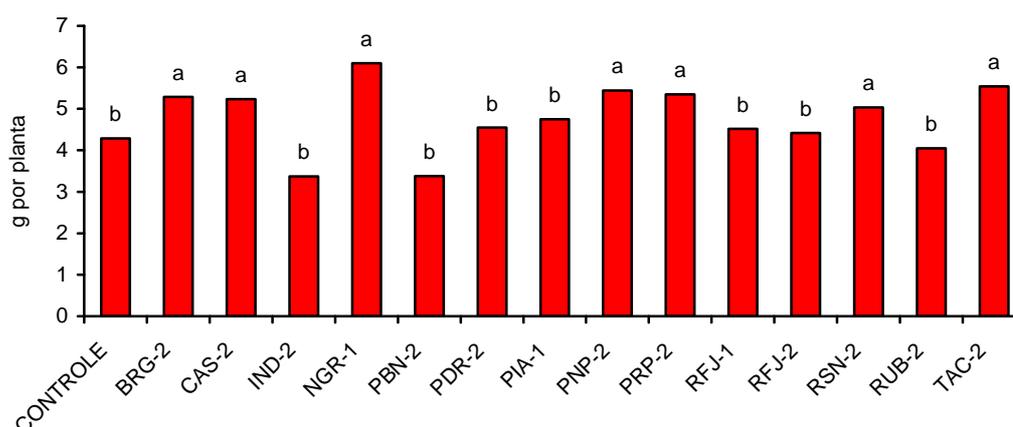
Os parâmetros avaliados durante a condução do experimento foram a altura de plantas aos 29 e 50 dias e o número de folhas totalmente desdobradas aos 50 dias após o plantio. As plantas foram coletadas 50 dias após o plantio. As raízes foram lavadas em água corrente para remoção do solo aderido e, em seguida, separou-se o sistema radicular da parte aérea das plantas. Após isto o material foi colocado para secar em estufa com aeração forçada até obtenção de massa constante, sendo então pesado para obtenção da biomassa seca da parte aérea e raiz. Após pesagem da parte aérea o material foi moído em moinho de facas de onde foi retirada amostra para avaliação nutricional do tecido foliar segundo metodologia de Malavolta et al. (1997).

Para análise de variância dos dados obtidos sem transformação utilizou-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003) utilizando-se o teste F. As médias dos tratamentos foram comparadas através do teste Scott-Knott com 5% de significância.

3.3 Resultados e Discussão

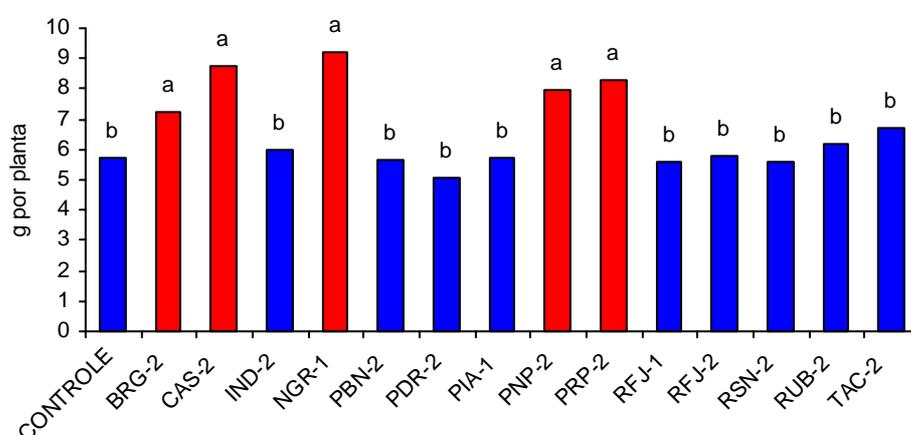
Os resultados encontrados revelaram que 50% dos isolados avaliados estimularam o milho a produzir mais massa radicular (Figura 1). Desses isolados apenas BRG-2, CAS-2, NGR-1, PNP-2 e PRP-2 proporcionaram incrementos na massa seca da parte aérea do milho (Figura 2). Por outro lado, a maioria dos tratamentos com a inoculação dos isolados bacterianos em milho proporcionou aumentos na altura das plantas aos 50 dias após o plantio (Figura 3). O isolado NGR-1 apresentou o melhor desempenho nas três variáveis avaliadas durante o crescimento do milho. O desempenho dos isolados bacterianos avaliados neste trabalho demonstra que os parâmetros de seleção de bactérias são pertinentes e

podem ser aplicados em estudos de bioprospecção de bactérias promotoras de crescimento de plantas em solos. Sendo importante também destacar que outros parâmetros bioquímicos podem ser utilizados visando aprimorar esta seleção, como por exemplo a produção de giberelinas, enzimas entre outros.



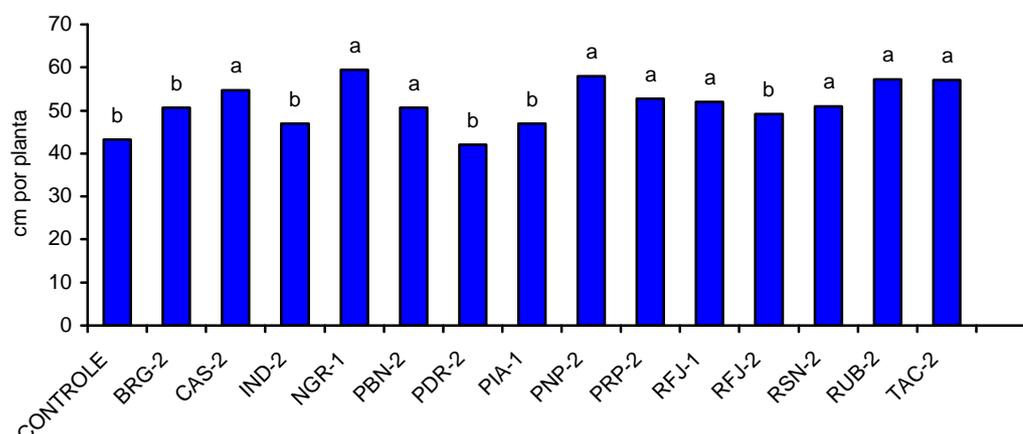
Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$).

FIGURA 1 - Massa seca de raiz de milho aos 50 dias em função da inoculação de isolados bacterianos nas sementes



Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$).

FIGURA 2 - Massa seca da parte aérea de milho aos 50 dias em função da inoculação de isolados bacterianos nas sementes



Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$).

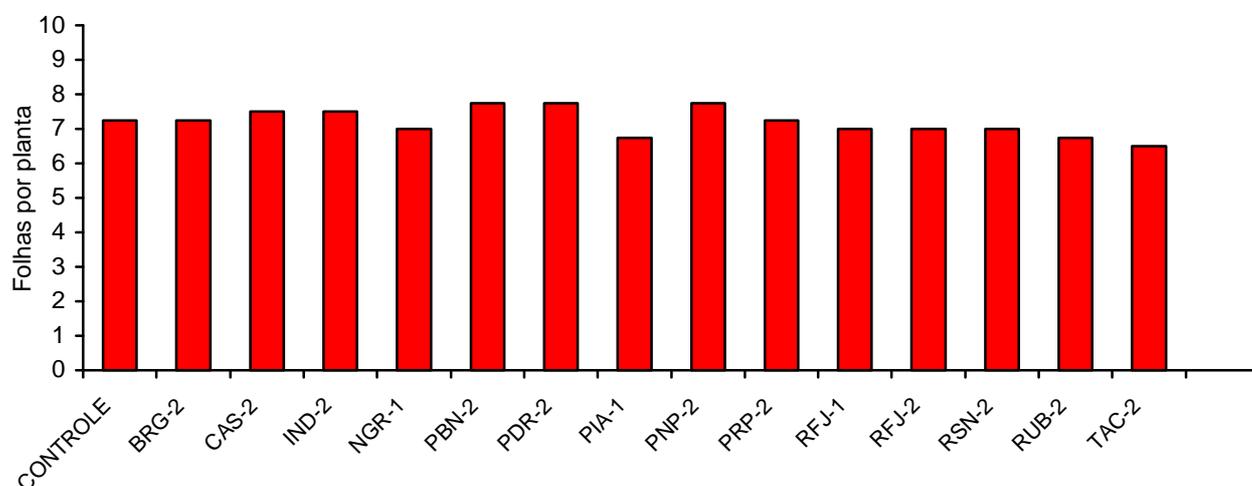
FIGURA 3 - Altura de plantas de milho aos 50 dias em função da inoculação de isolados bacterianos em sementes

A produção de auxina (AIA) pelas bactérias avaliadas pode ser responsável por alterações encontradas no crescimento do milho (Figura 1, 2 e 3). O crescimento não alterou o estágio fenológico da cultura pois a avaliação do número de folhas de milho totalmente desdobradas, aos 50 dias após o plantio, não apresentou diferenças entre os tratamentos conduzidos (Figura 4). Sabe-se que as auxinas são um grupo de substâncias reguladoras de crescimento responsáveis pelo crescimento celular, o alongamento dos caules e raízes, o desenvolvimento dos frutos, controlam o gravitropismo, promovem a dominância apical e retardam a abscisão (TAIZ; ZEIGER, 2004). Entre as auxinas, o ácido indolacético é o mais estudado e é o mais produzido pelas bactérias. Essa substância afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pêlos radiculares (BARBIERI et al., 1986). Neste trabalho isolados de *Bacillus spp.* que não produziram quantidades elevadas de AIA conseguiram incrementar o crescimento do milho, o

que pode ser devido a outros mecanismos de promoção de crescimento de plantas não avaliados.

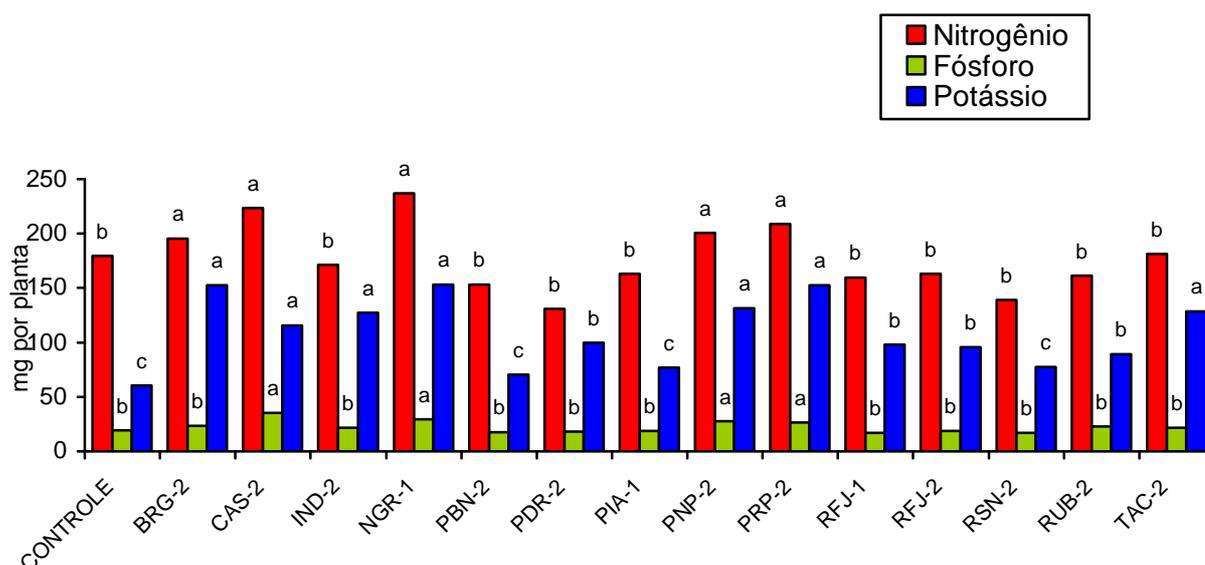
Além da produção de hormônios uma característica comum na maioria dos isolados que se destacaram na promoção do crescimento em milho, foi o antagonismo a fungos fitopatogênicos. Sobre este fato, Kloepper e Schroth, (1981) atribuíram o fenômeno da promoção de crescimento a um efeito indireto associado ao controle biológico de patógenos secundários. A inoculação de milho com um isolado de *Bacillus subtilis*, produtor de antibióticos e hormônios promoveu o crescimento de plantas em casa de vegetação (ARAÚJO, 2008).

A inoculação dos isolados bacterianos avaliados em milho não provocou efeito negativo no crescimento radicular. A presença de concentrações elevadas de AIA (250uM) produzida pela rizobactéria *Azospirillum* sp. na rizosfera reduziu o desenvolvimento radicular do arroz (RADWAN et al., 2004).



Os tratamentos não diferenciam estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$).

FIGURA 4 - Número de folhas desdobradas em milho aos 50 dias em função da inoculação de isolados bacterianos em sementes



Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$).

FIGURA 5 - Acúmulo de nutrientes (N, P e K) na parte aérea de milho aos 50 dias em função da inoculação de isolados bacterianos nas sementes

O acúmulo de nutrientes no tecido foliar do milho demonstra que os tratamentos com melhor desempenho de promoção de crescimento também proporcionaram absorção de nutrientes em maior quantidade, correspondente à produção da biomassa pela planta (Figura 5). Este resultado mostra que as plantas inoculadas com as bactérias promotoras de crescimento conseguiram suprimento adequado de nutrientes pela raiz. O aumento no acúmulo de nutrientes na parte aérea do milho já foi demonstrado por Araújo (2008) em experimento com inoculação da rizobactéria *B. subtilis*.

O incremento no acúmulo de nitrogênio e potássio no tecido foliar, na maioria dos tratamentos com inoculação de bactérias, inclusive por isolados que não se destacaram como promotores de crescimento de milho demonstra que existe alguma influência microbiana na disponibilização deste nutriente para a planta. Foi relatado que no ambiente da rizosfera um dos fatores, que aumenta a mobilização de nutrientes vegetais está relacionado com a presença do hormônio vegetal citocinina (DOURADO NETO et al., 2004). Estudos realizados já comprovaram que rizobactérias também produzem este hormônio na rizosfera (CACCIARI et al., 1989). Este aumento na absorção de nutrientes, como o potássio, sugere mais um efeito

benéfico proporcionado pelas rizobactérias às plantas, devendo ser analisado em futuros trabalhos com seleção de rizobactérias para inoculação em sementes.

3.4 Conclusões

- A maioria dos isolados de *Bacillus spp.* avaliados proporcionou algum benefício ao crescimento do milho, sendo que o isolado NGR-1 apresentou o melhor desempenho, na maioria das variáveis avaliadas;
- Os isolados bacterianos como produtores de hormônio vegetal (AIA) não influenciou diretamente o crescimento do milho;
- O milho, quando inoculado, com a maioria dos isolados bacterianos, apresentou maior acúmulo de nutrientes na parte aérea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/B. elkanii. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1633-1643, 1999.
- ARAUJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1639- 1645, 2005.
- ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciênc. agrotec.**, v. 32, n. 2, p. 456-462. Abr. 2008,
- BARBIERI, P. et al. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 36, p. 87-90, 1986.
- BORONIN, A. M. et al. Biological control of soilborne plant pathogens by PGPR *Pseudomonas* isolated in Russia. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 6., 1993, Montreal – Canada. **Anais...** Montreal – Canada: Int. Soc. Path., 1993. p.276,
- CACCIARI, I. et al. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, v. 115, p. 151-153, 1989.
- CARNEIRO, R. G. et AL. Indicadores biológicos associados ao ciclo do fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39 n. 37 Jul. 1994.
- CATTELAN, A. J. et al. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 63, p. 1670-1680, 1999.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St Paul: American Phytopathological Society, 1983. 539 p.

DOURADO NETO, et al. Aplicação e influência do fitorregulador no crescimento das plantas de milho. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 11, n. 1, p. 93-102, 2004.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA, 2007.

HOLL, F. B. et al. Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p. 19-24, 1988.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** - Versão 4.3. Lavras: DEX/UFLA -MG, 2003.

FREITAS, J. R.; GERMIDE, J. J. Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonades under growth chamber conditions. **Soil Biology and biochemistry** v. 24, p. 1127-1135, 1992.

KLOEPPER, J. W. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 28, n. 1, p. 21-26, 1999.

KLOEPPER, J. W.; SCHORTH, M. N. Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology**, v. 71, p. 642-644, 1981.

MALAVOLTA, E. et al. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba: Associação Brasileira para pesquisa de potassa e do fosfato, 1997. 201 p.

PAN, B. et al. Plant-growth promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. **European Journal of Agronomy**, v. 11, p. 179-186, 1999.

PARKE, J. L. et al. Biological control of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. **Plant Disease**, v. 75, p. 987-992, 1991.

RADWAN, M. et al, **The changing role of the geo-data infrastructure; from a data delivery network to a virtual enterprise supporting complex services**, Istanbul: ISPRS Congress, 2004.

REDDY, M. S. et al. Growth promotion and induced systemic resistance (ISR) mediated by biological preparation. **Phytopathology**, v. 89, p. 65, 1999.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 897-906, 2000.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 559 p.

VAN RAIJ, B. et al. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: IAC, 2001. 284p

YOSHIKAWA, M. Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizosphere *Pseudomonas putida*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 1150-1154, 1993.