

**Tecnologia biológica para controle de
Fusarium verticillioides e aumento da
absorção de N no milho empregando
*Paenibacillus polymyxa***



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

12
CONSUMO E
PRODUÇÃO
RESPONSÁVEIS



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

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
236**

**Tecnologia biológica para controle de
Fusarium verticillioides e aumento da
absorção de N no milho empregando
*Paenibacillus polymyxa***

Talles Henrique Pereira Alves
Gisele de Fátima Dias Diniz
José Edson Fontes Figueiredo
Antônio Marcos Coelho
Ivanildo Evódio Marriel
Christiane Abreu de Oliveira-Paiva

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2021*

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo
Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Maria Marta Pastina

Secretário-Executivo
Elena Charlotte Landau

Membros
Cláudia Teixeira Guimarães, Mônica Matoso Campanha, Roberto dos Santos Trindade e Maria Cristina Dias Paes.

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Mônica Aparecida de Castro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Mônica Aparecida de Castro

Fotos da capa
Talles Henrique Pereira Alves

1ª edição
Publicação digital (2021)

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Tecnologia biológica para controle de *Fusarium verticillioides* e aumento da absorção de N no milho empregando *Paenibacillus polymyxa* / Talles Henrique Pereira Alves... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2021.

33 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 236).

1. *Zea mays*. 2. Doença de planta. 3. Fixação de nitrogênio. 4. Bactéria. I. Alves, Talles Henrique Pereira. II. Diniz, Gisele de Fátima Dias. III. Figueiredo, José Edson Fontes. IV. Coelho, Antônio Marcos. V. Marriel, Ivanildo Evódio. VI. Oliveira-Paiva, Christiane Abreu de. VII. Série.

CDD (21. ed.) 633.15

Sumário

| | |
|------------------------------|----|
| Resumo | 05 |
| Abstract | 07 |
| Introdução..... | 08 |
| Material e Métodos | 10 |
| Resultados e Discussão | 13 |
| Conclusões..... | 27 |
| Referências | 28 |

Tecnologia biológica para controle de *Fusarium verticillioides* e aumento da absorção de N no milho empregando *Paenibacillus polymyxa*

Talles Henrique Pereira Alves¹

Gisele de Fátima Dias Diniz²

José Edson Fontes Figueiredo³

Antônio Marcos Coelho⁴

Ivanildo Evódio Marriel⁵

Christiane Abreu de Oliveira-Paiva⁶

Resumo – O milho é um dos cereais mais produzidos no globo, e é usado tanto para o consumo in natura como insumo básico para diversos setores do agronegócio. O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para obter altas produtividades nessa cultura. No Brasil, com solos pobres em nutrientes, a importação de adubos nitrogenados chega a representar 75%. Portanto, a elaboração e utilização de tecnologias biológicas, que promovem a fixação e absorção de N, podem significar uma redução na dependência do mercado externo e aumento da produção nacional. Vários microrganismos apresentam atividades antagônicas a patógenos que causam perdas econômicas nas culturas. Este estudo teve como objetivos avaliar, in vitro, a atividade antagonista de seis isolados de *Paenibacillus polymyxa* para o controle de *Fusarium verticillioides* e capacidade de formação de AIA pelos isolados. Em casa de vegetação, foram avaliados os efeitos de AIA na absorção de N e o crescimento de plantas do milho. Nos testes in vitro, as estirpes de *P. polymyxa* não apresentaram elevadas produções de AIA, porém mostraram um grande potencial como agente de biocontrole de *F. verticillioides*. Em casa de vegetação, as sementes foram plantadas em vasos de 15 kg de solo com três níveis

1 Talles Henrique Pereira Alves, estudante da Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, MG;

2 Gisele de Fátima Dias Diniz, estudante da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG,

3 José Edson Fontes Figueiredo, biólogo, doutor em Bioquímica e Imunologia, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG;

4 Antônio Marcos Coelho, engenheiro-agrônomo, doutor em Solos e Agricultura de Precisão, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

5 Ivanildo Evódio Marriel,engenheiro-agrônomo, doutor em Solos e Nutrição de Plantas, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

6 Christiane Abreu de Oliveira-Paiva, engenheira-agrônoma, doutora em Interação Planta-Microrganismos, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

de adubação nitrogenada (0, 90 e 180 kg.ha⁻¹ de N) e oito tipos de inoculação, sendo seis cepas de bactérias *P. polymyxa*, um controle sem inoculação, além de um controle positivo (A1) contendo *Azospirillum sp.* Os parâmetros analisados foram: Diâmetro Basal do Colmo (DBC), Altura de Plantas (AP), Peso de Planta por vaso (PP), Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Peso Seco das Raízes (PSR). Foram medidos o comprimento (CEsp) e o diâmetro (DEsp) das espigas, e o Peso de Mil Grãos (PMG). Em casa de vegetação, o milho respondeu significativamente aos níveis de adubação e, dentro de cada nível, as estirpes LIS01 em 0 kg.ha⁻¹ de N, LIS07 e LIS08 em 90 kg.ha⁻¹ de N destacaram-se em relação ao controle. Com 180 kg.ha⁻¹ de N houve destaque apenas no PMG para as estirpes LIS04 e LIS06.

Termos para indexação:fixação biológica de nitrogênio, promoção de crescimento, *Paenibacillus*, podridão do colmo, *Zea mays*.

Biological technology for *Fusarium verticillioides* control and increasing N absorption in corn using *Paenibacillus polymyxa*

Abstract – Maize is one of the most produced cereals globally, being used for fresh consumption and as a primary input for agribusiness sectors. Nitrogen (N) is an essential nutrient to obtain high yields in this crop. In Brazil, with soils deficient in nutrients, the importation of nitrogen fertilizers reaches up to 75%. Therefore, the development and use of biological technologies to promote the fixation and absorption of N can mean a reduction in dependence on the foreign market and an increase in national production. However, several microorganisms have antagonistic activities to pathogens that cause economic losses in crops. This study aimed to evaluate in vitro antagonistic activity of six isolates of *Paenibacillus polymyxa* against *Fusarium verticillioides* and their ability to produce AIA. Using in vitro tests, strains of *P. polymyxa* did not show high AIA production but showed great potential as a biocontrol agent for *F. verticillioides*. In greenhouse experiment, the seeds were planted in pots of 15 kg of soil with three nitrogen levels (0, 90, and 180 kg.ha⁻¹ of N), and eight types of inoculation: six strains of *P. polymyxa*, the control without inoculation, and the positive control (A1) consisting of *Azospirillum* sp. The parameters analyzed were Basal Stem Diameter (BSD); Plant Height (PH); Plant Weight per pot (PWP); Dry Matter of the Aerial Part (DMAP); Dry Root Weight (DRW); the length (LE), and diameter (DE), and the weight of a thousand grains (WTG). In the greenhouse, corn responded significantly to fertilization levels and, within each N level, strains LIS01 in 0 kg.ha⁻¹ of N, LIS07, and LIS08 in 90 kg.ha⁻¹ of N stood out concerning control. The treatment of 180 kg.ha⁻¹ of N highlighted the WTG of strains LIS04 and LIS06.

Index terms: biological nitrogen fixation, growth promotion, *Paenibacillus*, stem rot, *Zea mays*.

Introdução

O milho é um dos cereais mais produzidos globalmente, sendo usado para o consumo in natura ou como insumo básico para diversos setores do agronegócio. O milho é uma cultura exigente em aporte de nitrogênio (N) e a deficiência desse nutriente é um dos fatores mais limitantes para a produção de grãos. Isso decorre do fato de que grande parte do N absorvido pela planta é exportada para os grãos (Garcia, 2005; Ciampitti et al., 2010). Portanto, para que atinja altas produtividades, essa cultura demanda grande quantidade de fertilizante nitrogenado, que tem um custo elevado e, se manejado incorretamente, acarreta perdas por processos de lixiviação, volatilização e erosão (Saikia; Jain, 2007; Duete et al., 2008). A deficiência desse nutriente causa amarelecimento das folhas mais velhas, seguido de clorose; em casos mais graves, há perda foliar e deformações na espiga e, conseqüentemente, perda de produtividade (Subedi; Ma, 2009). Por isso, pesquisas envolvendo o processo da fixação natural de N são relevantes para atingir objetivos de alta produtividade.

Entre as possibilidades para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados e aumento na produtividade, estão os Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP) que, além de aumentarem a fixação de nitrogênio e a solubilização de nutrientes, conferem outros benefícios à planta, tal como a produção de fito-hormônios (Santner; Estelle, 2009). Além disso, MPCP são capazes de produzir compostos antifúngicos e enzimas hidrolíticas que atuam inibindo fitopatógenos (Mabood et al., 2014).

Dentre os fito-hormônios produzidos pelos MPCP, destaca-se o ácido indol-3-acético (AIA), uma auxina que estimula a síntese celular, resultando no alongamento de células e na expansão de raízes laterais e pêlos radiculares, aumentando a absorção de nutrientes (Taiz; Zeiger, 2004; Silveira 2008). AIA pode ser sintetizado por bactérias associadas às plantas, a partir do triptofano que está presente nos exsudatos radiculares em diferentes concentrações, dependendo do genótipo da planta (Woodward; Bartel, 2005).

Alguns MPCP apresentam potencial para controlar patógenos de plantas, portanto, constituem em alternativa promissora para reduzir a dependência no uso de agroquímicos. Além disso, MPCP representam uma opção segura ao meio ambiente e de baixo custo, quando comparados com métodos

convencionais (Silva et al., 2003). No milho, o fungo *Fusarium verticillioides* está associado a doenças que geram grandes perdas econômicas em todo o mundo (Desjardins, 2006) e representa um dos principais patógenos que ataca toda a planta, provocando apodrecimento de raiz, colmo e espiga, além de produzir toxinas que se acumulam nos grãos (Ribeiro et al., 2005; Nerbass et al., 2008; Madrigal et al., 2017).

Entre os MPCPs com alto potencial de utilização no biocontrole, destaca-se *Paenibacillus polymyxa*, que é amplamente estudada como modelo de rizobactéria promotora de crescimento de plantas (PGPR), por possuir grande variedade de hospedeiros, capacidade de formar endósporos e de produzir diversos tipos de antibióticos (Timmusk et al., 2005; Xie et al., 2016; Langendries; Goormachtig, 2021). Além disso, ao gênero *Paenibacillus* é atribuído propriedades como a capacidade de disponibilizar nutrientes, produzir compostos fenólicos, indólicos e fito-hormônios (Gardener, 2004; Aswathy et al., 2013; Xin et al., 2017). Portanto, essa espécie pode atuar simultaneamente como antagonista de patógenos radiculares, como bactérias, fungos, nematoides, e como biofertilizante (Bloemberg; Lugtenberg, 2001).

O presente estudo teve como objetivos avaliar a ação antifúngica de isolados de *P. polymyxa* sobre *F. verticillioides*, a eficiência na promoção de crescimento de plantas por cauda da formação de AIA e do aumento de absorção de N em plantas de milho. Representa uma contribuição para atingir a meta ODS 12, que visa garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e implementar práticas agrícolas resilientes, que aumentem a produtividade e a produção, que ajudem a manter os ecossistemas, que fortaleçam a capacidade de adaptação às mudanças climáticas, às condições meteorológicas extremas, secas, inundações e outros desastres, e que melhorem progressivamente a qualidade da terra e do solo; além de contribuir para reduzir significativamente a liberação de produtos químicos para o ar, água e solo, para minimizar seus impactos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente.

Material e Métodos

Microrganismos

Nesse estudo foram utilizados seis isolados de *Paenibacillus polymyxa*, isolados de sementes de sorgo provenientes da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-MS). Os isolados foram previamente identificados pelo sequenciamento parcial do gene do 16S rRNA (Tabela 1) e reativados por meio da transferência de alíquotas das culturas congeladas a -20 °C e glicerol 20% para o meio TSA (Agar Triptona de Soja: 15g/L de triptona, 5g/L de digestão papaica de soja, 5g/L de cloreto de sódio e 15g/L de Agar, pH 7,3) com incubação a 28 °C por 48 horas.

Tabela 1. Identificação molecular por sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S de seis isolados bacterianos de sementes de sorgo depositados na Coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF).

| Isolado | Identificação | Similaridade de nucleotídeos | Código de referência GenBank/NCBI |
|---------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| LIS01 | <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 98,48% | NR_117725.2 |
| LIS02 | <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 98,71% | NR_114810.1 |
| LIS04 | <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 99,75% | NR_117725.2 |
| LIS06 | <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 99,32% | NR_114810.1 |
| LIS07 | <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 97,80% | NR_117725.2 |
| LIS08 | <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 98,98% | NR_117724.2 |

Produção de Ácido Indol-3-acético (AIA)

Os isolados de *P. polymyxa* foram testados para a produção de AIA de acordo com a metodologia descrita por Sarwar e Kremer (1995). Para inoculação foram adicionados 25 µL de cultura em meio líquido, padronizado a 10⁸ UFC.mL⁻¹ em 5 mL de meio TSB (caldo soja tripticaseína) + DL-triptofano na concentração de 1,0 g.L⁻¹. A incubação foi realizada e mantida a 100 rpm a 30 °C por cinco dias. Em seguida, foram adicionados 100 µL do reagente Salkowski em cada amostra, conforme protocolo descrito por Gordon e Weber (1951), seguido de incubação por 20 minutos em temperatura ambiente, no escuro. A absorbância foi medida a 530 nm.

Teste de antagonismo contra *F. verticillioides*

Foram utilizados dois isolados do patógeno *F. verticillioides* do milho com grande capacidade de produzir fumonisinas (CML2743) e grande agressividade para plantas de milho (CML2778).

Para o teste de confronto direto, um disco de 5 mm da borda da cultura pura do patógeno foi transferido para o centro de uma placa de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA). Em quatro pontos equidistantes, entre si e do centro da placa, foram adicionados 10 μ L de suspensão bacteriana na concentração aproximada de 10⁸ UFC.mL⁻¹. A medição do raio da colônia do fitopatógeno foi realizada na presença e ausência dos microrganismos antagonistas, cerca de sete dias após a incubação a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz.

Experimento em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas-MG (19°28'S e 44°15'W) para avaliar os efeitos da inoculação de cepas de *P. polymyxa* na produção de biomassa da parte aérea (matéria seca), raiz (peso seco), espigas e grãos, usando o híbrido de milho P3862h da Pioneer. O experimento consistiu em um fatorial 3x8 disposto em delineamento casualizado, com três repetições. Os fatores foram os três níveis de N (0, 90 e 180 kg há⁻¹ de N) e oito tipos de inoculação: seis cepas de bactérias *P. polymyxa* (LIS01, LIS02, LIS04, LIS06, LIS07, LIS08), um controle sem inoculação (Controle), além de um controle positivo (A1) contendo *Azospirillum spp.* As sementes foram plantadas em vasos com capacidade de 15 kg de solo do tipo Latossolo Vermelho distrófico típico por vaso, com as seguintes características químicas e físicas, antes da aplicação de insumos: pH H₂O = 5,2; Al = 0,4 cmol_c dm⁻³; Ca = 2,5 cmol_c dm⁻³; Mg = 0,2 cmol_c dm⁻³; SB (soma de bases) = 11,8 cmol_c dm⁻³; P = 2,2 mg dm⁻³; K = 303 mg dm⁻³; V (saturação de bases) = 23,2% e teor de argila = 74,0 dag kg⁻¹. Aproximadamente 20 dias antes do plantio o solo foi corrigido usando calcário dolomítico e gesso agrícola, conforme cálculo da necessidade de calagem. A adubação com N foi dividida em três aplicações de ureia; no plantio, 15 e 30 dias pós-emergência, conforme a dose (0, 90 e 180 kg.ha⁻¹ de N). Cinco sementes de milho, revestidas com o inóculo bacteriano, foram se-

meadas em cada vaso, e posteriormente foi realizado o desbaste para duas plantas (Figura 1).



Fotos Talles Henrique Pereira Alves

Figura 1. Plantio de cinco sementes no vaso (A) e desbaste para duas plantas após emergência (B).

Os inóculos foram preparados a partir de culturas puras de cada microrganismo. Células de culturas incubadas por 96 horas em meio LB foram colhidas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 min, ressuspensas em solução de NaCl a 0,85% (p/v) e as densidades ópticas foram ajustadas a 1,0 absorvância a 540 nm, correspondente a 10^8 células/mL. Posteriormente, foi adicionado Bioma Fix às suspensões, na dose de 1,0 g para cada 20 mL de inoculante.

Após 60 dias foram realizadas medidas de diâmetro basal do colmo (DBC) utilizando paquímetro digital e também medidas de altura de plantas (AP). A colheita foi realizada aos 90 dias após o plantio e todas as plantas foram pesadas para obter o peso de planta por vaso (PP). As raízes e a parte aérea foram separadas e secas em estufa de circulação de ar forçado na temperatura de 65 °C até peso constante, a fim de obter matéria seca da parte aérea (MSPA) e peso seco das raízes (PSR). Foram medidos o comprimento (CEsp) e o diâmetro (DEsp) das espigas utilizando paquímetro digital, além

do peso de mil grãos (PMG). O material vegetal seco foi moído para análises posteriores de macro e micronutrientes nos tecidos.

Resultados e Discussão

Produção de Ácido Indol-3-acético (AIA)

Os seis isolados de *P. polymyxa* avaliados apresentaram habilidade de sintetizar AIA ($> 1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de forma moderada e alta (Figura 1). De acordo com a concentração de AIA obtida, tem-se: $< 1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (baixa produção); $1-10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (média produção); $11-50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (alta produção) e $> 51 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (elevada produção) (Kavamura et al., 2013). Os isolados de *P. polymyxa* LIS01 ($12,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e LIS02 ($8,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram maior produção de AIA, não havendo diferença significativa entre eles (Figura 2).

A capacidade de produção de AIA por *P. polymyxa* foi testada por Xu e Kim (2014), que obtiveram valores variando de 8,7 a 22,1 $\mu\text{g/mL}$ de produção desse fito-hormônio com a adição de L-triptofano. A menor produção de AIA pelos isolados testados em nosso estudo pode ter sido influenciada pelo reagente precursor da reação utilizado (DL-triptofano) ou outros fatores ambientais e genéticos. Em função disso, novos estudos precisam ser feitos para esclarecer as causas dessa variação na habilidade de produção de AIA em *P. polymyxa*. Estudo realizado por Xie et al. (2016), usando análise comparativa de 36 genomas de *P. polymyxa*, demonstrou o grande potencial para o emprego dessa espécie na agricultura, pela presença de genes relevantes para a promoção do crescimento de plantas como produção de AIA, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de antibióticos e enzimas líticas e descontaminação ambiental. Em outro estudo realizado in vitro, Din et al. (2020) demonstraram o elevado potencial de *P. polymyxa* para promover o crescimento de plantas de milho (*Zea mays*) pela capacidade de solubilizar fosfato e pelo antagonismo contra fitopatógenos. Os estudos mencionados destacam-se entre mais de 2.500 publicações demonstrando a importância de *P. polymyxa* para o rendimento de cultivares na agricultura e justificam a necessidade de incrementar a busca de novos isolados de *P. polymyxa* visando o seu emprego como inoculantes nos solos de Cerrado brasileiro.

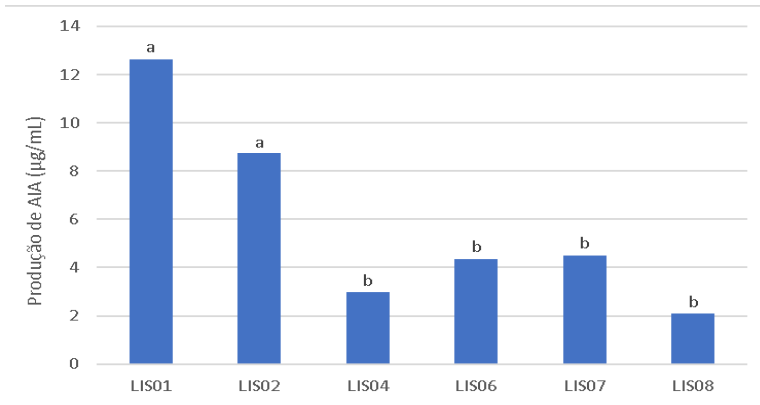


Figura 2. Produção de ácido indol-3-acético (AIA) pelos sete isolados de *P. polymyxa*. Os valores representam as médias obtidas para as três repetições. As letras diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Teste de antagonismo contra *F. verticillioides*

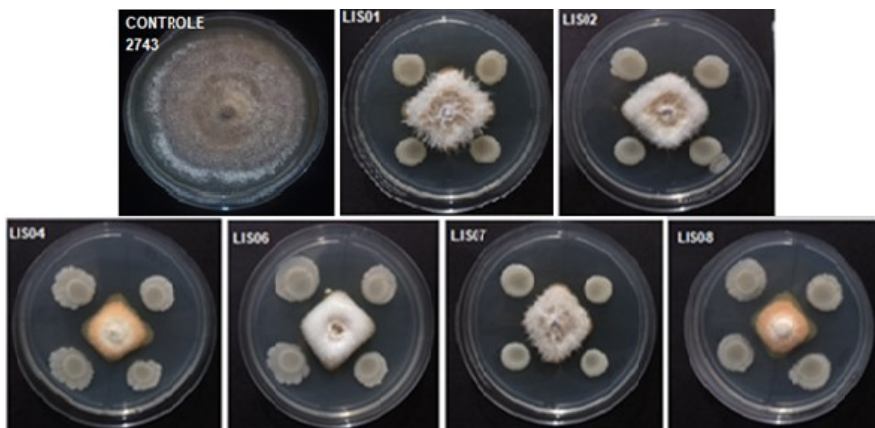
As estirpes que apresentaram maior antagonismo em confronto direto com *F. verticillioides* (CML2743) foram LIS08 e LIS04, ambas com média de inibição igual a 67,5%. O restante dos isolados apresentou capacidade de inibição que variou entre 57,5% e 61,2%. Para *F. verticillioides* (CML2778), as estirpes LIS06 e LIS01 foram as que apresentaram maior antagonismo, com 65% de inibição; as demais estirpes também inibiram o crescimento do fungo, com valores variando de 60% a 63,5% (Tabela 2).

Neste trabalho, todos os isolados de *P. polymyxa* que produziram AIA nos testes *in vitro* também apresentaram grande capacidade de inibição do fitopatógeno *F. verticillioides*, o que indica que essa espécie pode atuar na promoção de crescimento vegetal tanto de forma direta quanto indireta. Resultados semelhantes foram observados por Din et al. (2020), que demonstraram o elevado potencial de *P. polymyxa* para promover o crescimento de plantas de milho (*Zea mays*) tanto pela capacidade de solubilizar fosfato quanto pelo antagonismo contra fitopatógenos.

Tabela 2. Média do raio da colônia e porcentagem de inibição do crescimento de *Fusarium verticillioides* CML2743 e CML2778 em teste de confronto direto com sete isolados de *Paenibacillus polymyxa* em relação ao controle contendo somente *Fusarium*.

| Tratamento | CML2743 | | CML2778 | |
|------------|---------|---------|---------|---------|
| | Média | PI* (%) | Média | PI* (%) |
| Controle | 4,00a | - | 4,00a | - |
| LIS01 | 1,70b | 57,50 | 1,42d | 65,0 |
| LIS02 | 1,67b | 58,25 | 1,50c | 62,5 |
| LIS06 | 1,60c | 60,00 | 1,40d | 65,0 |
| LIS07 | 1,55c | 61,25 | 1,62b | 60,0 |
| LIS04 | 1,32d | 67,50 | 1,50c | 62,5 |
| LIS08 | 1,30d | 67,50 | 1,47c | 63,5 |

* Porcentagem de inibição obtida pelo teste de confronto direto entre os sete isolados de *P. polymyxa* e *F. verticillioides*. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



Fotos: Gisele de Fátima Dias Diniz

Figura 3. Teste in vitro com *Fusarium verticillioides* CML2743, que apresenta grande capacidade de produção de fumonisinas, em confronto direto com estirpes de *Paenibacillus polymyxa*.

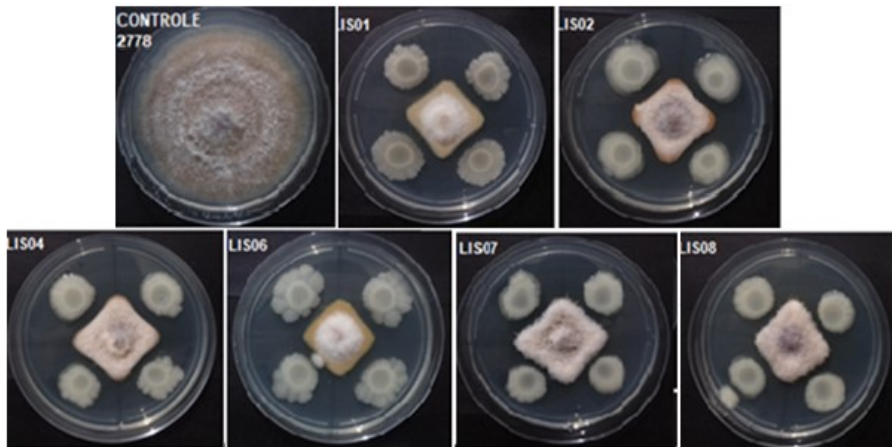


Figura 4. Teste in vitro com *Fusarium verticillioides* CML2778, mais agressivo para colonizar a cultura do milho, em confronto direto com estirpes de *Paenibacillus polymyxa*.

Vários estudos demonstraram que bactérias antagonistas produzem substâncias com atividade antifúngica, tais como peptídeos e proteínas, e outras substâncias com atividade antimicrobiana (Li et al., 2020). Do mesmo modo, tem sido demonstrada a existência de múltiplos mecanismos relacionados com a atividade antifúngica dessas bactérias, incluindo a competição por nutrientes, produção de enzimas extracelulares e compostos voláteis que inibem o crescimento micelial de fungos (Lal; Tabacchioni, 2009; Hong et al., 2016). Linhagens de *Paenibacillus polymyxa* inoculadas no solo produzem fito-hormônios e substâncias voláteis que agem no biocontrole de patógenos e promovem o crescimento de plantas (Fiddaman; Rossall, 1993; Li et al., 2020; Langendries; Goormachtig, 2021).

Herrera et al. (2016) observaram que cepas de *Paenibacillus* spp., isoladas de sementes de trigo, foram capazes de inibir o crescimento de *F. graminearum* em sementes de trigo in vitro, por causa da formação de grande quantidade de biofilme. Estas bactérias também podem limitar a liberação de exsudatos radiculares, evitando o crescimento de patógenos (Haggag, 2010). Naing et al. (2015) avaliaram in vitro uma estirpe de *Paenibacillus ehimen-*

sis, e ela produziu compostos orgânicos extracelulares que inibiram *F. oxysporum*, demonstrando alta capacidade de antibiose, promovido pelo gênero *Paenibacillus*. Soni et al. (2021), usando a abordagem de análise genômica de um isolado de *P. polymyxa*, demonstraram os atributos genéticos que conferem motilidade, capacidade de colonização de raízes, atividade antagonista, solubilização de fosfato, e produção de enzimas hidrolíticas, sideróforos e compostos orgânicos voláteis.

Testes usando PCR para amplificar a região conservada de *Paenibacillus* contendo gene *fusA* revelaram que o isolado analisado (HK4) possuía a capacidade de produzir fusaricidina, que apresenta atividade inibitória contra espécies fúngicas do gênero *Fusarium*. O uso da técnica de LC-ESI-MS/MS (*Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric*) com extrato cru de HK4 confirmou a presença de fusaricidina e que essa substância era o principal metabólito produzido pela linhagem HK4 responsável pela atividade antifúngica.

Parâmetros de planta como indicadores do nível de nitrogênio na cultura do milho

Neste experimento, a estirpe de *Azospirillum spp.* foi usada como controle positivo, por seu conhecido potencial na disponibilização de nitrogênio para as plantas.

Em geral, diante das diferentes dosagens de nitrogênio, foi verificado, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, que houve aumento significativo e progressivo na maioria das variáveis avaliadas. Para AP, PP e DEsp, a média das análises nos níveis de 90 e 180 kg.ha⁻¹ não diferiram significativamente entre si, porém apresentaram valores maiores comparados ao nível de 0 kg.ha⁻¹ (Tabela 3). Estes resultados eram esperados, por causa da importância da adubação nitrogenada nesta cultura, envolvendo os parâmetros de crescimento em função de doses crescentes, como já observados em diversos trabalhos da literatura.

Tabela 3. Descobramento da interação para médias em função das diferentes dosagens de nitrogênio para valores de diâmetro basal do colmo (DBC), altura de planta (AP), peso de planta (PP), peso de planta aérea (MSPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), peso seco de raiz (PSR), comprimento de espiga (CEsp), diâmetro de espiga (DEsp) e peso de 1.000 grãos (PMG)¹.

| Níveis de nitrogênio | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------|----------|----------|---------|---------|----------|---------|----------|---|
| Adubação (kg.ha ⁻¹) | DBC | AP | PP | MSPA | PSR | CEsp | DEsp | PMG | |
| | Mm | cm | g | % | g | mm | mm | g | g |
| 0 | 8,87 a | 74,00 a | 335,83 a | 24,75 a | 19,45 a | 86,12 a | 27,37 a | 157,78 a | |
| 90 | 11,59 b | 100,14 b | 460,00 b | 28,91 b | 33,19 b | 116,49 b | 33,89 b | 167,28 b | |
| 180 | 12,33 c | 101,47 b | 471,67 b | 31,05 c | 39,26 c | 126,46 c | 34,47 b | 178,10 c | |

¹Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Diâmetro basal do colmo - 60 dias (DBC)

Em comparação com o controle não inoculado, o DBC, quando não foi feita a adubação com N ($0 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$), as estirpes LIS01 e LIS02 aumentaram em 28,4% e 17,3%, respectivamente, e quando comparado ao controle A1 aumentaram em 19,6% e 9,2%, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os tratamentos quando utilizadas as doses de $90 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ e $180 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de N em comparação com os controles (Tabela 4).

Tabela 4. Média do diâmetro basal do colmo (DBC) aos 60 dias em razão das diferentes fontes de inoculação e níveis de adubação nitrogenada em plantas de milho. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

| Inoculação ² | 60 dias DBC (mm) ¹ | | |
|-------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| | 0 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ N | 90 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ N | 180 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ N |
| Controle | 8,09 a | 11,22 a | 12,82 a |
| LIS01 | 10,39 b | 11,99 a | 12,26 a |
| LIS02 | 9,49 b | 11,98 a | 12,11 a |
| LIS04 | 8,69 a | 11,82 a | 11,85 a |
| LIS06 | 8,46 a | 11,45 a | 12,15 a |
| LIS07 | 8,98 a | 10,93 a | 13,49 a |
| LIS08 | 8,21 a | 10,88 a | 11,94 a |
| A1 | 8,69 a | 12,52 a | 12,06 a |

¹Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

² O tratamento controle consiste na planta de milho não inoculada com cepas de *P. polymyxa* e LIS01 a LIS07, numeração das cepas avaliadas de *P. polymyxa* e A1 inoculadas com *Azospirillum spp.*

Altura de planta - 60 dias (AP)

Com $0 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de N e os inóculos LIS04, LIS02, LIS01, LIS06 e A1, as plantas apresentaram tamanho de 78,83 cm; 78,67 cm; 78,50 cm, 74,67 cm e 78,00 cm, respectivamente. Nos níveis de 90 e $180 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de N, não houve acréscimo de altura significativo nos tratamentos com inóculos em relação ao controle.

Para a altura de plantas (AP), com 0 kg.ha⁻¹ de N, os inóculos LIS04, LIS02, LIS01 e LIS06 apresentaram acréscimo de 11,0%, 10,8%, 10,6% e 5,2%, respectivamente, em relação ao controle sem inoculação. Já comparando ao controle positivo A1, no nível de 180 kg.ha⁻¹ de N, os inóculos LIS08, LIS01 e LIS07 apresentaram aumento significativo de 13,4%, 10,3% e 7,7% respectivamente. Para o nível de 90 kg.ha⁻¹ de N, não houve acréscimos de altura significativos nos tratamentos com inóculos em relação aos controles (Tabela 5).

Tabela 5. Média de altura de planta (AP) aos 60 dias em razão das diferentes fontes de inoculação e níveis de adubação nitrogenada em planta de milho. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

| Inoculação ² | 60 dias AP (cm) ¹ | | |
|-------------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 0 kg.ha ⁻¹ N | 90 kg.ha ⁻¹ N | 180 kg.ha ⁻¹ N |
| Controle | 71,00 a | 103,50 b | 102,17 b |
| LIS01 | 78,50 b | 103,67 b | 107,17 b |
| LIS02 | 78,67 b | 105,00 b | 95,50 a |
| LIS04 | 78,83 b | 95,67 a | 99,33 a |
| LIS06 | 74,67 b | 88,83 a | 95,67 a |
| LIS07 | 65,67 a | 105,50 b | 104,67 b |
| LIS08 | 66,67 a | 96,33 a | 110,17 b |
| A1 | 78,00 b | 102,67 b | 97,17 a |

¹Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

² O tratamento controle consistiu na planta de milho não inoculada com cepas de *P. polymyxa* e LIS01 a LIS07, numeração das cepas avaliadas de *P. polymyxa* e A1 inoculadas com *Azospirillum spp.*

Peso de planta (PP)

Considerando o nível de N, com 0 kg.ha⁻¹, todos os inóculos conferiram acréscimo de peso às plantas, sendo os maiores pesos registrados com os inóculos LIS01 e LIS07. Com 90 kg.ha⁻¹ apenas quatro tratamentos tiveram valores superiores ao controle, sendo eles: LIS04, LIS08, LIS01 e A1 (Tabela 6). No nível de 180 kg.ha⁻¹, nenhum tratamento obteve valores superiores ao controle sem inoculação (Tabela 6).

Considerando os níveis de N, com 0 kg.ha⁻¹ de N os inóculos LIS01, LIS07, LIS06, LIS08 e LIS02 conferiram acréscimo, em comparação ao controle negativo, de peso às plantas de 67,1%, 45,2%, 42,5%, 42,5% e 38,4%, respectivamente, porém em relação ao controle positivo A1 esses inóculos não apresentaram acréscimo significativo. Com 90 kg.ha⁻¹ de N apenas dois tratamentos tiveram valores superiores aos controles, sendo eles: LIS04 e LIS08, com acréscimos em relação ao controle negativo de 23,3% e 14,3%, e 18,8%, e 10,5% em relação ao controle positivo A1, respectivamente. No nível de 180 kg.ha⁻¹ de N, nenhum tratamento obteve valores superiores ao controle sem inoculação e, em alguns casos, houve uma redução do peso nos tratamentos, mas, em relação ao controle positivo A1, os tratamentos LIS01, LIS07 e LIS04 apresentaram acréscimos de 16,8%, 13,7% e 9,2%, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Média de peso de plantas de milho (PP) em razão das diferentes fontes de inoculação e níveis de adubação nitrogenada. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

| Inoculação ² | PP (g) ¹ | | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 0 kg.ha ⁻¹ N | 90 kg.ha ⁻¹ N | 180 kg.ha ⁻¹ N |
| Controle | 243,33 a | 443,33 a | 510,00 b |
| LIS01 | 406,67 b | 470,00 a | 510,00 b |
| LIS02 | 336,67 b | 443,33 a | 446,67 a |
| LIS04 | 303,33 a | 546,67 b | 476,67 b |
| LIS06 | 346,67 b | 393,33 a | 463,33 a |
| LIS07 | 353,33 b | 416,67 a | 496,67 b |
| LIS08 | 346,67 b | 506,67 b | 433,33 a |
| A1 | 350,00 b | 460,00 a | 436,67 a |

¹Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

² O tratamento controle consistiu na planta de milho não inoculada com cepas de *P. polymyxa* e LIS01 a LIS07, numeração das cepas avaliadas de *P. polymyxa* e A1 inoculadas com *Azospirillum spp.*

Matéria seca da parte aérea (MSPA)

A variação estatística da MSPA em função do inóculo ocorreu somente com 180 kg.ha⁻¹ de N, sendo que o aumento foi com a inoculação de LIS08 (34,32%), LIS02 (32,15%) e A1 (31,96%) que se diferiram significativamente

quando comparados ao controle negativo (Tabela 7), sendo iguais ao controle positivo A1.

O tratamento com biofertilizante (*P. polymyxa* + fosfato) gerou um aumento significativo da matéria seca do feijão-caupi, da ordem de 52%, comparado com o solo não inoculado (Silva et al., 2015). Segundo os autores, o incremento da matéria seca pode estar associado diretamente com a produção de hormônios de crescimento (giberelinas e auxinas), aumento da disponibilidade de ferro e, indiretamente, com os efeitos antagonísticos, a produção de antibióticos e a competição por nutrientes, conforme foi demonstrado por Lal e Tabacchioni (2009). Outros fatores descritos em outros estudos podem certamente ter contribuído para o aumento da matéria seca, relatado por Silva et al. (2015), tais como a fixação de N e a solubilização de fosfato, além da estimulação na absorção de macronutrientes (Ca, P, K e Mg) promovida pela inoculação de *P. polymyxa* (Silva et al., 2006).

Tabela 7. Média de matéria seca da parte aérea (MSPA) em razão das diferentes fontes de inoculação e níveis de adubação nitrogenada em planta de milho. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

| Inoculação ² | MSPA (%) ¹ | | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 0 kg.ha ⁻¹ N | 90 kg.ha ⁻¹ N | 180 kg.ha ⁻¹ N |
| Controle | 25,76 b | 28,74 a | 29,48 a |
| LIS01 | 24,21 a | 30,20 a | 30,08 a |
| LIS02 | 25,75 b | 27,91 a | 32,15 b |
| LIS04 | 26,65 b | 26,82 a | 29,68 a |
| LIS06 | 22,79 a | 30,61 a | 29,91 a |
| LIS07 | 22,88 a | 28,41 a | 30,83 a |
| LIS08 | 24,60 a | 28,99 a | 34,32 b |
| A1 | 25,43 b | 29,64 a | 31,96 b |

¹Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

²O tratamento controle consistiu na planta de milho não inoculada com cepas de *P. polymyxa* e LIS01 a LIS07, numeração das cepas avaliadas de *P. polymyxa* e A1 inoculadas com *Azospirillum spp.*

Peso seco de raízes (PSR)

No nível de 180 kg.ha⁻¹ de N, os tratamentos LIS06, LIS07 e LIS01 conferiram acréscimo de 17,8%, 14,4% e 12,2%, respectivamente, no peso seco de

raiz em relação ao controle negativo. Quando comparado ao controle positivo A1, os acréscimos no PSR são ainda maiores, com 22,1%, 18,6% e 16,3%, respectivamente. Em contrapartida, nenhum tratamento com 0 kg.ha⁻¹ e 90 kg.ha⁻¹ de N apresentou aumento no PSR, em relação aos controles (Tabela 8).

Considerando os valores de biomassa da parte aérea e raízes avaliados neste trabalho, os isolados foram capazes de aumentar PSR, DBC, altura de plantas, peso de plantas e MSPA de forma positiva, dependendo do isolado e independentemente da dose de N. Entretanto, dependendo da dose de N, um menor número de isolados foi capaz de aumentar o crescimento da parte aérea e de raízes em relação ao controle positivo A1, *Azospirillum* sp, espécie esta considerada na literatura como fixadora de N e promotora de crescimento para a cultura do milho (Hungria et al., 2011). De forma global, o isolado LIS 01 aumentou o peso seco da parte aérea e da raiz, o DBC e a altura de plantas com ganhos significativos em relação a A1. E o isolado LIS 07 aumentou a altura e o peso seco de raízes em relação a A1.

Tabela 8. Média de peso seco de raiz (PSR) em razão das diferentes fontes de inoculação e níveis de adubação nitrogenada em planta de milho. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

| Inoculação ² | PSR (g) ¹ | | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 0 kg.ha ⁻¹ N | 90 kg.ha ⁻¹ N | 180 kg.ha ⁻¹ N |
| Controle | 13,84 a | 39,79 b | 38,11 a |
| LIS01 | 21,41 a | 34,49 a | 42,74 b |
| LIS02 | 16,28 a | 32,57 a | 32,48 a |
| LIS04 | 19,49 a | 30,42 a | 37,01 a |
| LIS06 | 18,09 a | 30,03 a | 44,88 b |
| LIS07 | 18,99 a | 32,70 a | 43,60 b |
| LIS08 | 22,28 a | 27,58 a | 38,52 a |
| A1 | 25,26 a | 37,96 b | 36,75 a |

¹Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

²O tratamento controle consistiu na planta de milho não inoculada com cepas de *P. polymyxa* e LIS01 a LIS07, numeração das cepas avaliadas de *P. polymyxa* e A1 inoculadas com *Azospirillum spp.*

Comprimento de espiga (CEsp)

Em relação ao comprimento de espiga (CEsp), no nível de 90 kg.ha⁻¹ de N, destacaram-se os acréscimos proporcionados pelos inóculos LIS04 (19,3%), LIS08 (17,5%) e LIS07 (13,8%) em relação ao controle negativo, e, quando comparado ao controle positivo A1, apresentaram valores estatisticamente semelhantes. Em contrapartida, tanto no nível de 0 kg.ha⁻¹ de N quanto no de 180 kg.ha⁻¹ de N, nenhuma fonte de inoculação apresentou valores estatisticamente superiores aos controles (Tabela 9).

Tabela 9. Média de comprimento de espiga (CEsp) em razão das diferentes fontes de inoculação e níveis de adubação nitrogenada em planta de milho. Letras iguais não diferem entre si na coluna pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

| Inoculação ² | CEsp (mm) ¹ | | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 0 kg.ha ⁻¹ N | 90 kg.ha ⁻¹ N | 180 kg.ha ⁻¹ N |
| Controle | 75,34 a | 109,97 a | 131,60 a |
| LIS01 | 102,07 a | 112,32 a | 132,41 a |
| LIS02 | 87,91 a | 96,26 a | 125,10 a |
| LIS04 | 82,19 a | 131,15 b | 135,51 a |
| LIS06 | 91,24 a | 106,03 a | 119,93 a |
| LIS07 | 89,42 a | 125,13 b | 126,29 a |
| LIS08 | 74,24 a | 128,95 b | 115,26 a |
| A1 | 86,58 a | 122,09 b | 125,56 a |

¹Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

²O tratamento controle consistiu na planta de milho não inoculada com cepas de *P. polymyxa* e LIS01 a LIS07, numeração das cepas avaliadas de *P. polymyxa* e A1 inoculadas com *Azospirillum spp.*

Diâmetro de espiga (DEsp)

Para o diâmetro da espiga (DEsp) na dosagem de 0 kg.ha⁻¹ de N, foi observado que todas as fontes de inoculação conferiram aumento de diâmetro quando comparadas ao controle negativo, contudo, apenas o inóculo LIS01 obteve aumento significativo quando comparado ao controle positivo A1, com 16,7% de aumento. Nos níveis de 90 kg.ha⁻¹ e 180 kg.ha⁻¹ de N, nenhuma fonte de inóculo apresentou resultado maior que os controles (Tabela 10).

Tabela 10. Média de diâmetro de espiga (DEsp) em razão das diferentes fontes de inoculação e níveis de adubação nitrogenada em planta de milho. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

| Inoculação ² | DEsp (mm) ¹ | | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 0 kg.ha ⁻¹ N | 90 kg.ha ⁻¹ N | 180 kg.ha ⁻¹ N |
| Controle | 18,21 a | 34,19 a | 36,64 a |
| LIS01 | 35,39 d | 35,20 a | 32,00 a |
| LIS02 | 25,78 b | 33,09 a | 35,03 a |
| LIS04 | 28,92 c | 32,23 a | 35,13 a |
| LIS06 | 28,81 c | 29,84 a | 35,00 a |
| LIS07 | 27,40 c | 38,42 a | 34,36 a |
| LIS08 | 24,08 b | 32,89 a | 32,39 a |
| A1 | 30,34 c | 35,25 a | 35,21 a |

¹Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

² O tratamento controle consistiu na planta de milho não inoculada com cepas de *P. polymyxa* e LIS01 a LIS07, numeração das cepas avaliadas de *P. polymyxa* e A1 inoculadas com *Azospirillum spp.*

Peso de mil grãos (PMG)

Diante das três doses de nitrogênio testadas associadas às diferentes fontes de inoculação, para o parâmetro peso de mil grãos (PMG), foi observado que, na dose de 0 kg.ha⁻¹, apenas dois inóculos influenciaram significativamente o peso de grãos quando comparados com os controles, LIS07 (6,16%) e A1 (21,7%) (Tabela 11). Com a dose de 90 kg.ha⁻¹, A1 (185,92 g) LIS08 (182,14 g) e LIS01 (181,71 g) apresentaram maiores valores em relação ao controle. No nível de adubação de 180 kg.ha⁻¹ de N, os isolados LIS04, LIS06, LIS07 e o controle A1 incrementaram em 23,4%, 9,9% e 3,0% e 8,9% o peso de grãos, respectivamente. Já comparando com o controle positivo A1, nas doses de 0 kg.ha⁻¹ e 90 kg.ha⁻¹ de N não houve nenhum inóculo que conferiu acréscimo ao PMG, porém no nível de 180 kg.ha⁻¹ o inóculo LIS04 conferiu um incremento de peso de 13,3% (Tabela 11). Neste trabalho, a maior produção de grãos com a inoculação do *Azospirillum sp* (A1) não dependeu da dose de N, e para os isolados de *Paenibacillus*, o comportamento foi distinto em cada dose, entre os isolados, com destaque para LIS04 e LIS 07, que também aumentaram o CEsp em relação ao controle negativo. Lembrando

que, em relação aos parâmetros vegetativos da planta de milho, o isolado LIS 07 aumentou também a altura e o peso seco de raízes em relação a A1.

Tabela 11. Média de peso de mil grãos (PMG) em razão das diferentes fontes de inoculação e níveis de adubação nitrogenada em planta de milho. Letras iguais não diferem entre si na coluna pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

| Inoculação ² | Peso 1.000 grãos (g) ¹ | | |
|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 0 kg.ha ⁻¹ N | 90 kg.ha ⁻¹ N | 180 kg.ha ⁻¹ N |
| Controle | 157,57 c | 179,04 b | 159,52 b |
| LIS01 | 157,42 c | 181,71 c | 149,00 a |
| LIS02 | 152,76 b | 177,65 b | 159,03 b |
| LIS04 | 124,92 a | 169,63 a | 196,90 e |
| LIS06 | 152,40 b | 171,55 a | 175,31 d |
| LIS07 | 167,28 d | 177,18 b | 164,29 c |
| LIS08 | 158,15 c | 182,14 c | 160,43 b |
| A1 | 191,82 e | 185,92 d | 173,83 d |

¹Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

²O tratamento controle consiste na planta de milho não inoculada com cepas de *P. polymyxa* e LIS01 a LIS07, numeração das cepas avaliadas de *P. polymyxa* e A1 inoculadas com *Azospirillum spp.*

Plântulas de milho originadas de sementes inoculadas com *P. polymyxa* apresentaram aumento significativo no crescimento de plantas (35%) e no incremento da biomassa (31%), 30 dias após a inoculação (Puri, 2015).

Ei-Hadad et al. (2011) demonstraram o caráter multifuncional de *P. polymyxa* ao descreverem os resultados de seus experimentos em que *P. polymyxa* aumentou o significativamente o comprimento do caule, o número de folhas por planta e peso da matéria seca das plantas inoculadas (caule e raízes), por causa do estímulo na mobilização de nutrientes do solo (nitrogênio, fosfato e potássio) e da sua atividade como agente de controle biológico. Outros efeitos atribuídos a essa espécie bacteriana também devem ter contribuído para os resultados apresentados pelos autores mencionados, como a indução de resistência sistêmica conferindo proteção às plantas contra estresses bióticos e outros tipos de estresse ambiental, conforme relatado por Jeong et al. (2019).

Em resumo, a bactéria *Paenibacillus polymyxa* apresenta inúmeras vantagens para o estabelecimento de uma agricultura sustentável e preservação ambiental. O conjunto dos diferentes atributos dessa espécie contribui para o crescimento de plantas e aumento da produtividade agrícola. Entre as atividades comprovadas nessa espécie bacteriana pode-se destacar: 1- a solubilização de fósforo, melhorando a saúde de plantas e do solo; 2- promoção da expansão radicular e o crescimento de plantas por meio da produção de hormônios tais como citocininas, auxinas, etileno e giberelinas; 3- redução da atividade de patogênica de bactérias e fungos promovendo a imunização das raízes das plantas; 4- atividade inseticida; 5- fixação de nitrogênio na forma de amônia (NH₃) que é absorvida pela planta; 6- aumento da porosidade do solo, pela liberação de matéria orgânica e produção de biofilmes (Lal; Tabacchioni, 2009; Grady et al., 2016). Essa bactéria também produz exo-polissacarídeos (EPS), enzimas hidrolíticas (amilases, celulasas, hemicelulasas, lipases, pectinases, oxigenases, dehidrogenases, enzimas modificadoras de lignina e mutanases) e antibióticos (polimixina e fusaridicina) com vasta aplicação na saúde humana e industrial (Liu et al., 2012; Liang et al., 2015; Pleszczyńska et al., 2015; Baidara et al., 2016).

Conclusões

Os resultados dos testes in vitro com os seis isolados de *P. polymyxa*, embora não tenham revelado valores elevados para a produção de AIA, mostraram grande potencial para o uso desses microrganismos como agentes de biocontrole contra *F. verticillioides*. Duas cepas (LIS01 e LIS06) apresentaram inibição de 65% do crescimento do fitopatógeno.

As plantas do milho responderam significativamente aos três níveis de adubação nitrogenada e, dentro desses níveis, as plantas também responderam aos diferentes inóculos de forma distinta para cada variável analisada.

Para o nível de 0 kg.ha⁻¹, destacou-se a estirpe LIS01, que forneceu resultados com valores acima do controle em quase todos os parâmetros analisados, exceto em MSPA e PMG.

Para 90 kg.ha⁻¹, todas as estirpes apresentaram valores superiores ao controle não inoculado pelo menos em dois parâmetros. As estirpes LIS07 e

LIS08, no entanto, destacaram-se em três parâmetros, são eles AP, CEsp e DEsp e PP, CEsp e PMG, respectivamente.

Considerando o nível de 180 kg.ha⁻¹ de N, houve variações pouco expressivas em todos os parâmetros analisados, destacando-se apenas o PMG obtido com as estirpes LIS04 e LIS06, que foi expressivamente maior que os demais tratamentos.

Analisando todos os dados, LIS 01 apresentou superioridade nos testes de antagonismo e na planta, e LIS 07 e LIS 04 apresentaram resultados superiores em mais de uma dose de N e em parâmetros vegetativos e de produtividade da planta de milho quando comparadas ao *Azospirillum* sp.

Outros parâmetros igualmente importantes para promover o crescimento de plantas, tais como fixação de N, capacidade de solubilização de nutrientes do solo e a produção de biofilme em plantas, serão estudados futuramente.

Considerando que a atividade bacteriana, tanto nas condições de laboratório como em casa de vegetação, pode variar quando testadas no campo, é fundamental que as atividades fungicidas e promotora de crescimento dos isolados de *Paenibacillus polymyxa* sejam testadas nas condições de campo.

Referências

- ASWATHY, A. J.; JASIM, B.; JYOTHIS, M.; RADHAKRISHNAN, E. K. Identification of two strains of *Paenibacillus* sp. as indole 3 acetic acid-producing rhizome associated endophytic bacteria from *Curcuma longa*. **3 Biotech**, v. 3, n. 3, p. 219-224, 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs13205-012-0086-0>.
- BAINDARA, P.; CHAUDHRY, V.; MITTAL, G.; LIAO, L. M.; MATOS, C. O.; KHATRI, N. Characterization of the antimicrobial peptide penisin, a class la novel lantibiotic from *Paenibacillus* sp. strain A3. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 1, p. 580-591, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1128/AAC.01813-15>.
- BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 4, p. 343-350, 2001. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00183-7](https://dx.doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00183-7).

CIAMPITTI, I. A.; BOXLER, M.; GARCÍA, F. O. Nutrición de maíz: requerimientos y absorción de nutrientes. **Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica**, v. 48, p. 14-18, 2010. Disponível em: [http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/2EB470FD702C566D85257984005754F1/\\$FILE/14.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/2EB470FD702C566D85257984005754F1/$FILE/14.pdf). Acesso em: 13 set. 2021.

DESJARDINS, A. E. **Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics and biology**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2006.

DIN, A. R. J. M.; ROSLI, M. A.; AZAM, Z. M.; OTHMAN, N. Z.; SARMIDI, M. R. *Paenibacillus polymyxa* role involved in phosphate solubilization and growth promotion of *Zea mays* under abiotic stress condition. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 90, p. 63-71, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01081-1>.

DUETE, R. R. C.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. da; TRIVELIN, P. C. O.; AMBROSANO, E. J. Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (15N) pelo milho em Latossolo Vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 1, p. 161-171, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000100016>.

EL-HADAD, M. E.; MUSTAFA, M. I.; SELIM, S. M.; EL-TAYEB, T. S.; MAHGOOB, A. E. A.; AZIZ, N. H. A. The nematicidal effect of some bacterial biofertilizers on *Meloidogyne incognita* in sandy soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 105-113, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100014>.

FIDDAMAN, P. J.; ROSSALL, S. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, n. 2, p. 119-126, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03004.x>.

GARCÍA, F. **Criterios para el manejo de la fertilización del cultivo de maíz**. Piracicaba: IPNI, 2005. 19 p.

GARDENER, B. B. M. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1252-1258, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1252>.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192-195, 1951. DOI: <https://dx.doi.org/10.1104%2Fpp.26.1.192>.

GRADY, E. N.; MacDONALD, J.; LIU, L.; RICHMAN, A.; YUAN, C. C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. **Microbial Cell Factories**, v. 15, article 203, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>.

HAGGAG, W. M. The role of biofilm exopolysaccharides on biocontrol of plant diseases. In: ELNASHAR, M. (ed.). **Biopolymers**. London: IntechOpen, 2010. p. 271-284. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/12151>. Acesso em: 28 set. 2021.

HERRERA, S. D.; GROSSI, C.; ZAWOZNIK, M.; GROPPA, M. D. Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. **Microbiological Research**, v. 186/187, p. 37-43, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.002>.

HONG, C. E.; KWON, S. Y.; PARK, J. M. Biocontrol activity of *Paenibacillus polymyxa* AC-1 against *Pseudomonas syringae* and its interaction with *Arabidopsis thaliana*. **Microbiological Research**, v. 185, p. 13-21, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.01.004>.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 38 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325).

JEONG, H.; CHOI, S. K.; RYU, C. M.; PARK, S. H. Chronicle of a soil bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a tiny guardian of plant and human health. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, article 467, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00467>.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; AVILA, L. A. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>.

LAL, S.; TABACCHIONI, S. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 2-10, 2009. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs12088-009-0008-y>.

LANGENDRIES, S.; GOORMACHTIG, S. *Paenibacillus polymyxa*, a Jack of all trades. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 10, p. 5659-5669, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15450>.

LI, J. Y.; GAO, T. T.; WANG, Q. Comparative and functional analyses of two sequenced *Paenibacillus polymyxa* genomes provides insights into their potential genes related to plant growth-promoting features and biocontrol mechanisms. **Frontiers in Genetics**, v. 11, article 564939, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.564939>.

LIANG, T. W.; WANG, S. L. Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: production, isolation, structure, and bioactivities. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1847-1863, 2015. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fmd13041847>.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; ZENG, X. Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3/4, p. 767-772, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.016>.

MABOOD, F.; ZHOU, X.; SMITH, D. L. Microbial signaling and plant growth promotion. **Canadian Journal Plant Science**, v. 94, p. 1051-1063, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjps2013-148>.

MADRIGAL, K. Y. L.; CASTRO, E. S.; VÁZQUEZ, C. L. C.; CORONA, C. P. L.; MENDOZA, I. E. M. Pathogenic and genetic variability of *Fusarium verticillioides* from maize in northern Mexico. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 39, n. 4, p. 486-496, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1378726>.

NAING, X. H.; NGUYEN, X. H.; ANEES, M.; LEE, Y. S.; KIM, Y. C.; KIM, S. J.; KIM, M. H.; KIM, Y. H.; KIM, K. Y. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in tomato by *Paenibacillus ehimensis* KWN38. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 165-174, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1771-4>.

NERBASS, F. R.; CASA, R. T.; ANGELO, H. R. Sanidade de sementes de milho comercializadas na safra agrícola de 2006/07 em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 7, n. 1, p. 30-36, 2008.

PLESZCZYŃSKA, M.; WIATER, A.; JANCZAREK, M.; SZCZODRAK, J. (1 → 3)- α -D-Glucan hydrolases in dental biofilm prevention and control: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 761-778, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.052>.

PURI, A. **Plant growth promotion and nitrogen fixation by *Paenibacillus polymyxa* in corn and canola**. 2015. 80 p. Dissertação (Mestrado) - University of British Columbia, Vancouver, 2015. DOI: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2493.1684/1>.

RIBEIRO, N. A.; CASA, R. T.; BOGO, A.; SANGOI, L.; MOREIRA, E. N.; WILE, L. A. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p.1003-1009, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000500004>.

SAIKIA, S. P.; JAIN, V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma? **Curret Science**, v. 92, n. 3, p. 371-322, 2007.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. **Nature**, v. 459, p. 1071-1078, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08122>.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 282-285, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb00446.x>.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MOUNTEER, A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, v. 151, n. 1, p. 42-46, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00678.x>.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Co-inoculação de sementes de caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pela planta. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 2, p. 95-99, 2006.

SILVA, V. N.; SILVA, A. J. N.; MACEDO, G. R. Biofertilizers and performance of *Paenibacillus* in the absorption of macronutrients by cowpea bean and soil fertility. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19,

n. 12, p. 1136-1142, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v19n12p1136-1142>.

SILVEIRA A. B. **Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Estado do Rio Grande do Sul.** 2008. 113 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SONI, R.; RAWAL, K.; KEHARIA H. Genomics assisted functional characterization of *Paenibacillus polymyxa* HK4 as a biocontrol and plant growth promoting bacterium. **Microbiological Research**, v. 248, 126734, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126734>.

SUBEDI, K. D.; MA, B. L. Assessment of some major yield-limiting factors on maize production in a humid temperate environment. **Field Crops Research**, v. 110, n. 1, p. 21-26, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.06.013>.

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

TIMMUSK, S.; GRANTCHAROV, N.; WAGNER, E. G. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7292-7300, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7292-7300.2005>.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, v. 95, n. 5, p. 707-735, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>.

XIN, K.; LI, M.; CHEN, C.; YANG, X.; LI, Q.; CHENG, J.; ZHANG, L.; SHEN, X. *Paenibacillus qinlingensis* sp. nov., an indole-3-acetic acid-producing bacterium isolated from roots of *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 589-595, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001666>.

XIE, J.; SHI, H.; DU, Z.; WANG, T.; LIU, X.; CHEN, S. Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species. **Scientific Reports**, v. 6, 21329, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep21329>.

XU, S. J.; KIM, B. S. Biocontrol of *Fusarium* crown and root rot and promotion of growth of tomato by *Paenibacillus* strains isolated from soil. **Mycobiology**, v. 42, p. 158-166, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.2.158>.

Embrapa

Milho e Sorgo



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

