

# Potencial de *Bacillus* spp. em promover o crescimento e controlar *Fusarium verticillioides* em milho

Thiago Costa Ferreira<sup>1,2</sup>, Lucas do Lago<sup>3</sup>, Lucas Guedes Silva<sup>1</sup>, Marina Guimarães Pacifico<sup>1</sup>,  
Mírian Rabelo de Faria<sup>1</sup>, Wagner Bettiol<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Departamento de Proteção Vegetal, 18.610-307, Botucatu, SP, Brasil. <sup>2</sup> Universidade Estadual da Paraíba, Campus IV, Sítio Cajueiro, S/N, Zona Rural, 58884-000, Catolé do Rocha, Paraíba, Brasil. <sup>3</sup> Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP-340 Km 127,5, 13.918-110, Jaguariúna, SP, Brasil.

Autor para correspondência: Thiago Costa Ferreira (thiago.ferreira@servidor.uepb.edu.br)

Data de chegada: 24/07/2020. Aceito para publicação em: 12/05/2021

10.1590/0100-5405/241384

## RESUMO

Ferreira, T.C.; Lago, L.; Silva, L.G.; Pacifico, M.G.; Faria, M.R.; Bettiol, W. Potencial de *Bacillus* spp. em promover o crescimento e controlar *Fusarium verticillioides* em milho. *Summa Phytopathologica*, v.47, n.4, p.195-203, 2021.

O tratamento de sementes com microrganismos visando promoção de crescimento e controle de *Fusarium verticillioides* é uma tecnologia que poderá ser utilizada para ampliar a sustentabilidade da cultura do milho. Para tanto, estudos com a utilização de microrganismos para tratamento de sementes visando ao controle de *F. verticillioides* e promoção de crescimento vegetal em milho são necessários para o desenvolvimento de bioprodutos. Onze isolados de *Bacillus* spp. foram testados quanto às características bioquímicas relacionadas com promoção de crescimento (produção de ácido cianídrico, ácido indolacético, sideróforos e catalase; solubilização de fosfato

e assimilação de nitrogênio). Ainda *in vitro* foi avaliada a habilidade dos isolados de *Bacillus* em inibir o crescimento micelial e a germinação de conídios de *F. verticillioides*. Em casa de vegetação foi avaliado o efeito dos isolados de *Bacillus* spp. na promoção de crescimento e no controle de *F. verticillioides* em duas variedades de milho. *Bacillus velezensis* AP-03 e *Bacillus* sp. AP-210, não somente inibiram o crescimento micelial e a germinação de esporos, mas também promoveram o crescimento das plantas e controlaram *F. verticillioides* em sementes de milho em condições de casa de vegetação.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, biocontrole, tratamento de sementes

## ABSTRACT

Ferreira, T.C.; Lago, L.; Silva, L.G.; Pacifico, M.G.; Faria, M.R.; Bettiol, W. Potential of *Bacillus* spp. for growth promotion and *Fusarium verticillioides* control in corn. *Summa Phytopathologica*, v.47, n.4, p.195-203, 2021.

Seed treatment with microorganisms aiming to promote plant growth and *Fusarium verticillioides* control is a technology that can be used to improve the sustainability of corn crops. Therefore, studying the use of microorganisms for seed treatment with the aim of controlling *F. verticillioides* and promoting plant growth in corn is necessary for the development of bioproducts. Eleven isolates of *Bacillus* spp. were tested for their biochemical characteristics related to growth promotion (production of hydrocyanic acid, indoleacetic acid, siderophores and

catalase; phosphate solubilization, and nitrogen assimilation). Also *in vitro*, the ability of *Bacillus* isolates to inhibit *F. verticillioides* mycelial growth and conidial germination was assessed. In a greenhouse, the effect of the isolates of *Bacillus* spp. was evaluated on growth promotion and *F. verticillioides* control in two varieties of corn. *Bacillus velezensis* AP-03 and *Bacillus* sp. AP-210 not only inhibited mycelial growth and spore germination, but also promoted plant growth and controlled *F. verticillioides* in corn seeds under greenhouse conditions.

**Keywords:** *Zea mays*, biocontrol, seed treatment

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de milho (*Zea mays* L.) com produção estimada para a safra 2019/2020 de cerca de 100 milhões de toneladas de grãos, em uma área de, aproximadamente, 18 milhões de hectares (9). A produção de milho no mundo é prejudicada pela ação de fungos fitopatogênicos, como os do gênero *Fusarium*, com ênfase para *Fusarium verticillioides* (FV) (Sacc.) Nirenberg (1976) [sinonímia: *Fusarium moniliforme* J. Sheld. (1904)], importante fitopatógeno habitante de solo para a cultura (14, 15, 23, 25, 26). *Fusarium verticillioides* pode diminuir o estande (14, 23, 25), causar podridões de raízes e colo (14, 25), também causar problemas nos homens e animais que consumirem grãos infectados devido à produção de micotoxinas, como as fumonisinas (20, 30). O patógeno pode ser transmitido horizontalmente e verticalmente (14, 25), além de atacar outras gramíneas, como sorgo e milheto (25). Outra característica

importante é a produção de clamidósporo que permite sua sobrevivência por longos períodos no solo (23, 26).

Para o controle deste patógeno é utilizado o tratamento de sementes de milho com fungicidas (25). Entretanto, na busca de maior sustentabilidade, técnicas têm sido pesquisadas para a realização do controle deste patógeno em sementes de milho (23, 26). Essas técnicas são necessárias no cenário atual do desenvolvimento tecnológico da produção de milho, por conta da sua importância mundial como cereal para a alimentação humana, direta ou indireta (23). Dentre as tecnologias alternativas, o tratamento de sementes com agentes microbianos pode ser adequada para o controle de *F. verticillioides* (23, 26). Os agentes de biocontrole podem também promover o crescimento das plantas (1, 18, 22, 23, 26). Dentre os organismos estudados, os do gênero *Bacillus*, por suas características, são os

que estão recebendo maior atenção na atualidade (4, 8, 11, 12, 18, 20, 23, 26).

Hussain et al. (18), Lin et al. (22), Lizárraga-Sánchez et al. (23) e Nguyen et al. (26) descreveram que *Bacillus* spp., aplicados via tratamento de sementes de milho ou no solo, propiciaram maior aproveitamento de nutrientes do solo e aumentaram a biomassa das plantas, por meio da produção de substâncias que inibem a ação de patógenos da cultura. Lizárraga-Sánchez et al. (23) observaram que *Bacillus* sp. B25 promoveu o crescimento de plantas de milho em 30%. Lin et al (22) observaram que *B. subtilis* IN-937a, *B. safenis* SE-52, *B. altitudinis* INR-7, *Lysinibacillus xylanilytics* SE-56 e *Paenibacillus peoriae* E-681 promoveram acréscimo de 30% da produção de biomassa em plântulas de milho com a utilização de metade da adubação nitrogenada recomendada para a cultura. Hussein et al. (18) observaram que *Bacillus* sp. AZ6, formulado com óxido de zinco e cascas de laranja, promoveu o crescimento de milho em 25%.

O potencial de *Bacillus* no biocontrole de fitopatógenos na cultura do milho foi demonstrado por diversos autores (8, 19, 21, 23, 26, 32). Kulimushi et al. (19) observaram que *Bacillus amyloliquefaciens* promoveu o aumento de enzimas de defesa nas plantas contra *Rhizomucor variabilis*, e o crescimento de plântulas de milho e a ação do referido patógeno foi diminuída em cerca de 50%. Lizárraga-Sánchez et al. (23) observaram que *Bacillus* sp. B25 controlou a produção de micotoxinas e a incidência de *F. verticillioides* entre 93 e 25%, respectivamente. Li et al. (21) verificaram que *Bacillus vallismortis* BV23 inibiu, *in vitro*, o crescimento micelial, a germinação e a produção de conídios de *F. graminearum* em 66%, 90% e 86%, respectivamente. Wang et al (32) verificaram que *B. velezensis* BM21 controlou *F. graminearum* em plântulas de milho.

Assim, o objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de *Bacillus* spp. com potencial de serem utilizados para tratamento de sementes, com a finalidade de controlar *F. verticillioides* e promover o crescimento de plântulas de milho.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini” e na casa-de-vegetação da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. Nos ensaios *in vivo* foi utilizado um Latossolo Vermelho Amarelo com as seguintes características (0–20 cm): pH em água=5,8; MO=25,5 g kg<sup>-1</sup>; P=3,5 mg cm<sup>-3</sup>; K=1,51, Ca=27,5, Mg=8,5, Al=1, H=35; CE=73,5 mmol dm<sup>-3</sup>; SB%=50,8 e argila=450 (g kg<sup>-1</sup>).

### Organismos

Os isolados utilizados no estudo foram: *Bacillus velezensis* AP-03; *Bacillus siamensis* AP-117 e *Bacillus* sp. isolados AP-12, AP-61, AP-85, AP-88, AP-115, AP-165, AP-210, AP-240 e AP-512 (3). Os isolados foram reativados em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (Himedia<sup>®</sup>) a 28 ± 2°C, por 48 h no escuro. Também foi utilizado o biofungicida Serenade<sup>®</sup> (Bayer<sup>®</sup>, México) à base de *Bacillus subtilis* QST 713. O isolado de *Fusarium verticillioides* F405, cedido pela Embrapa Milho e Sorgo (20), foi multiplicado em BDA a 25 ± 2 °C, no escuro, por oito dias. Para obter a suspensão de conídios de *F. verticillioides* F405, 5 mL de água foram colocados sobre o micélio previamente crescido (sete dias, 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12 h), em seguida a superfície foi raspada com alça de Drigalski e a suspensão calibrada para 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>. A patogenicidade do isolado foi avaliada em milho comum AL

Bandeirante e milho pipoca IAC 367, de acordo com metodologia proposta por Machado et al. (25). Os ensaios com plantas de milho foram realizados com as variedades de milho comum AL Bandeirante e de milho pipoca IAC 367.

### Caracterização dos isolados de *Bacillus* quanto à produção de compostos promotores de crescimento das plantas

Os isolados de *Bacillus* foram previamente crescidos em Tripticaseína-Soja-Ágar (TSA) 45 g/1000 mL de água (Himedia<sup>®</sup>) a 25 ± 2°C, por cinco dias no escuro. Todos os isolados foram analisados quanto à produção de ácido cianídrico e ácido indolacético (7), sideróforos (29) e catalase (6), solubilização de fosfato (7) e assimilação de nitrogênio (10). Os resultados obtidos foram considerados como positivos (+) ou negativos (-) para as características analisadas, mas não foi quantificada a produção.

### Inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios de *F. verticillioides* por *Bacillus*

A inibição do crescimento micelial de *F. verticillioides* F405 pelos isolados de *Bacillus* foi avaliada em placas de Petri plásticas contendo BDA. Discos de 0,5 cm de diâmetro (colônias crescidas em BDA) de *Fusarium* e de cada um dos isolados de *Bacillus* foram transferidos para placas de Petri (9 cm de diâmetro) com BDA, a 7 cm de distância cada, e incubados em sala climatizada (oito dias, no escuro e a 25 ± 2 °C) (21, 23). A cada 48 h foi mensurado o crescimento micelial de *F. verticillioides*, e, após oito dias, foi calculada a taxa de crescimento e crescimento total. Também foi avaliado o potencial dos isolados de *Bacillus* em inibir a germinação de conídios de *F. verticillioides* F405. Em microtúbulos de 3 mL foi transferida uma suspensão de conídios de *F. verticillioides* (obtida conforme descrito anteriormente, na concentração de 2,0 x 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>) e misturada, na proporção de 1:1, com suspensão de isolados de *Bacillus* (cultivados em Tryptic Soy Broth a 28 ± 2°C por 48 h, no escuro, em agitação constante de 150 rpm, na concentração de OD<sub>550</sub> = 0,1, correspondente a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>). Após incubação por 48 h, a 25 °C e fotoperíodo com 12 h de luz foram avaliadas a germinação de 100 conídios de cada repetição. Para cada isolado de *Bacillus* foram utilizadas três repetições.

### Promoção de crescimento de milho por *Bacillus* spp.

Isolados de *Bacillus* spp. foram multiplicados em meio contendo 10 g de glicose; 10 g de peptona; 5 g de extrato de levedura; 3 g de NaCl; 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 100 mL de água destilada e pH 6,0 a 28 ± 2°C, por 48 h, no escuro e em agitação constante de 150 rpm. Após este período foram calibradas suspensões de cada isolado com o uso de espectrofotômetro (OD<sub>550</sub> = 0,1, correspondente a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>). As sementes das variedades AL Bandeirantes e milho pipoca IAC-367 foram imersas por uma hora nas suspensões, mantendo agitação constante das sementes. Como controle, sementes foram imersas em água nas condições descritas acima. As sementes tratadas foram semeadas em vasos plásticos contendo 500 mL de solo, sendo utilizadas 10 sementes por vaso. O ensaio foi conduzido em casa-de-vegetação por oito dias após a semeadura. Diariamente foram contadas as plântulas emergidas para a determinação do índice de velocidade de emergência (IVE) (24). No final do ensaio foram avaliados o índice SPAD de clorofilas (SPAD-502 Plus – Minolta<sup>®</sup>) das folhas (11, 12), a altura das plantas, o comprimento da raiz, o diâmetro do colo e massa fresca e seca (secagem por 72 h à 60 °C) da parte aérea e do sistema radicular (22).

### **Efeito dos isolados de *Bacillus* spp. no controle de *F. verticillioides***

Para a realização destes estudos foram selecionados isolados de *Bacillus* considerando os resultados de produção de ácido cianídrico, ácido indolacético, sideróforos e catalase, solubilização de fosfato e assimilação de nitrogênio e inibição do crescimento micelial e germinação de conídios de *F. verticillioides* F405. Além disto, foram considerados os resultados obtidos por Dorighello et al. (11, 12) em testes contra outros patógenos.

Para obtenção de sementes de milho infestadas com *F. verticillioides* F405, o patógeno foi inoculado nas sementes pelo método de condicionamento osmótico (25). Discos de micélio de *F. verticillioides* foram transferidos para placas de Petri contendo BDA + Manitol (73,5 g/L) e incubados por 120 h, a  $25 \pm 2$  °C e 12 h de luz. Após este período, sementes de milho foram colocadas sobre a colônia de *F. verticillioides* F405 formando uma camada única e mantidas nas mesmas condições anteriores por 48 h. As sementes inoculadas foram misturadas na proporção de 2:8 com sementes não inoculadas e esta mistura foi utilizada para a realização dos estudos (25).

O tratamento das sementes inoculadas com *F. verticillioides* F405 com os isolados de *Bacillus* foi realizado de acordo com metodologia proposta por Machado et al. (25). Os seguintes tratamentos das sementes foram avaliados: 1) controle inoculado (água destilada); 2) Carboxina (200 g L<sup>-1</sup>) + Thiram (200 g L<sup>-1</sup>) (Vitavax-Thiram®, SC - Chemtura®); 3) *B. subtilis* QST-713 (10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>); 4) *B. velezensis* AP-03 e 5) *Bacillus* sp. AP-210 (10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>). Um tratamento com sementes não inoculadas (testemunha não inoculada) foi incluído. As sementes tratadas foram divididas em três lotes para a realização dos estudos.

As sementes foram semeadas em vasos contendo 500 mL de solo, conforme descrito anteriormente. Além de avaliar o IVE, teor de clorofila (11, 12), altura das plantas e comprimento das raízes (cm), diâmetro do colo (mm) e massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular (g/planta) (22), foi avaliada a incidência de *F. verticillioides* nas plântulas (25). Dez vasos foram semeados, sendo cinco utilizados para as avaliações de promoção de crescimento e cinco para determinação dos pigmentos fotossintetizantes, das atividades enzimáticas e da incidência da doença nas plântulas. Para avaliar a incidência de *F. verticillioides* nas plântulas foram recortados fragmentos, na altura do colo, de 0,5 cm e transferidos para BDA e incubados a 25 °C por sete dias no escuro, quando foi determinada a porcentagem de fragmentos infectados com o patógeno (25). As outras partes das plântulas foram utilizadas na determinação dos pigmentos fotossintetizantes e das atividades enzimáticas.

Para a análise de pigmentos fotossintetizantes as terceiras folhas das plântulas, após oito dias da semeadura, foram coletadas e formaram uma amostra composta para cada repetição para analisar clorofilas a, b, a + b, carotenoides e clorofila a + b/carotenoides (31). O restante das plântulas foi coletado para realizar análises das proteínas totais (PT) e atividades das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), peroxidase (PO) e polifenoloxidase (PPO). Amostras compostas de cada repetição, foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer a -80 °C, para posterior utilização. Em seguida 1 g de tecido vegetal, de cada amostra composta, foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido. Após a obtenção de um pó fino e homogêneo foi adicionado 10 mL de solução tampão [C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO a 1%, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 50 mM, pH 6.5 e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM (PMSF)] e homogeneizado com o auxílio do pistilo. Estas suspensões foram colocadas em microtubos de plástico com

capacidade de 10 mL, centrifugadas (3.000 rpm a 4 °C, por 25 min), sendo o sobrenadante (extrato bruto) resultante do processo recuperado e armazenado em ultra freezer a -80 °C (2). A quantificação da atividade das proteínas totais e das enzimas FAL, PPO e PO foi de acordo com Duangmal & Apenten (13), Halfeld-Vieira et al. (16), Hammerschmidt et al. (17) e Pascholati et al. (27).

As avaliações da germinação, envelhecimento acelerado e sanidade das sementes foram realizadas de acordo com as metodologias descritas em Brasil (5). Para os ensaios de avaliação da germinação e do envelhecimento acelerado foram utilizadas oito repetições com 50 sementes e para o teste de sanidade 25 sementes para cada repetição (25).

### **Análise estatística**

Os ensaios de qualidade de sementes e biocontrole foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições para os estudos de controle, quatro para as análises de sementes e oito para sanidade de sementes. As análises de pigmentos fotossintetizantes, atividades enzimáticas e sanidade das sementes foram realizadas obedecendo ao delineamento dos ensaios em vasos. Nos ensaios em vasos foram utilizados o delineamento em blocos ao acaso, com cinco repetições cada. As médias obtidas foram analisadas por meio da ANOVA e comparadas pelo teste Tukey (p<0,05) no programa estatístico R e as Figuras foram elaboradas no programa Sigma Plot.

## **RESULTADOS**

### **Caracterização dos isolados de *Bacillus* quanto à produção de compostos promotores de crescimento das plantas**

Os isolados AP-12 e AP-165 apresentaram quatro resultados positivos para a produção de compostos relacionados com promoção de crescimento (assimilação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e ácido cianídrico). Por outro lado, os isolados AP-03, AP-85, AP-88, AP-117 e AP-210 apresentaram três resultados positivos, com destaque para a assimilação de nitrogênio para todos os isolados (Tabela 1). Os isolados AP-61, AP-240 e AP-512 apresentaram dois resultados positivos, o isolado AP-115 apenas foi positivo para assimilação de nitrogênio e o isolado AP-161 foi negativo para todas as características analisadas (Tabela 1). Os resultados não apresentaram uniformidade com respeito às características que foram positivas (Tabela 1).

### **Inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios de *F. verticillioides***

*Bacillus velezensis* AP-03 reduziu o crescimento micelial e a germinação de conídios de *F. verticillioides* em 62,1% e 57,5%, respectivamente, com taxa de crescimento micelial de 1,4 cm/dia (Tabela 2). O isolado *Bacillus* AP-512 inibiu o crescimento micelial e a germinação de conídios em 66,0% e 52,2%, respectivamente, com taxa de crescimento de 1 cm/dia. O isolado de *Bacillus* AP-210 inibiu a germinação em 56,2% e apresentou uma taxa de crescimento de 1,5 cm/dia (Tabela 2).

### **Promoção de crescimento de milho por *Bacillus* spp.**

Para o ensaio com milho AL Bandeirantes não foram observados efeitos do tratamento das sementes com *Bacillus* no estante final das plantas, nos índices SPAD de clorofila, velocidade de emergência e no diâmetro do colo (Tabela 3). Contudo, foram observados efeitos

**Tabela 1.** Caracterização bioquímica de isolados de *Bacillus* spp. quanto à produção de metabólitos promotores de crescimento (ácido indolacético - AIA, ácido cianídrico - HCN, sideróforos - SID e catalase - CAT), assimilação de nitrogênio (AN) e solubilização de fosfato (SP). Os resultados estão descritos como positivos (+) ou negativos (-).

ISOLADO	AN	SP	AIA	HCN	SID	CAT
<i>Bacillus</i> sp. AP-12	+	+	-	+	+	-
<i>Bacillus</i> sp. AP-165	+	+	-	+	+	-
<i>B. velezensis</i> AP-03	+	-	-	-	+	+
<i>Bacillus</i> sp. AP-85	+	+	-	-	-	+
<i>Bacillus</i> sp. AP-88	+	+	-	-	-	+
<i>B. siamensis</i> AP-117	+	+	-	-	-	+
<i>Bacillus</i> sp. AP-210	+	-	+	-	+	-
<i>Bacillus</i> sp. AP-61	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus</i> sp. AP-240	+	-	+	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. AP-512	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. AP-115	+	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. AP-161	-	-	-	-	-	-

**Tabela 2.** Efeito de *Bacillus* spp. na porcentagem de inibição do crescimento micelial (%) e da germinação de conídios (%) e taxa de crescimento micelial de *Fusarium verticillioides*.

Isolados	Inibição do crescimento micelial	Taxa de crescimento micelial	Inibição da germinação de conídios
<i>B. velezensis</i> AP-03	62,1ab	1,4ab	57,5e
<i>Bacillus</i> sp. AP-12	23,9a	2,5bc	38,4cd
<i>Bacillus</i> sp. AP-61	24,5a	2,6c	35,8bcd
<i>Bacillus</i> sp. AP-85	23,2a	2,4bc	53,1e
<i>Bacillus</i> sp. AP-88	34,8ab	2,1ab	41,1d
<i>Bacillus</i> sp. AP-115	26,7a	2,4bc	34,0abcd
<i>B. siamensis</i> AP-117	43,3ab	1,9ab	27,8ab
<i>Bacillus</i> sp. AP-161	46,3ab	1,7ab	29,6abc
<i>Bacillus</i> sp. AP-165	30,1ab	2,6bc	25,2a
<i>Bacillus</i> sp. AP-210	38,4ab	1,5ab	56,2e
<i>Bacillus</i> sp. AP-240	22,9a	2,5bc	41,5d
<i>Bacillus</i> sp. AP-512	66,0b	1,0a	52,2e
<b>P</b>	0,0043	0,0004	<0,0001
<b>CV (%)</b>	7,18	9,37	7,38

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey 5%).

significativos na altura, comprimento do sistema radicular e massas secas da parte aérea e do sistema radicular ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3).

Para o ensaio com milho pipoca IAC 367 foram observados efeitos significativos para os índices SPAD de clorofila e velocidade de emergência; altura, massa seca da parte aérea e comprimento radicular ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). Como não foram observadas diferenças expressivas entre os isolados na promoção de crescimento, o teste não permitiu selecionar os melhores isolados. Desta forma, *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* spp. AP-210, por apresentarem 100% de estante

final, para as duas variedades de milho, foram selecionados para serem testados no controle de *F. verticillioides* (Tabelas 3 e 4).

#### Efeito dos isolados de *Bacillus* spp. no controle de *F. verticillioides*

A germinação das sementes tratadas com os isolados de *Bacillus* QST-713, AP-03 e AP-210 foi estatisticamente ( $p < 0,05$ ) maior do que as testemunhas inoculada e não inoculada com o patógeno (Figura 1A), não diferindo estatisticamente do tratamento com fungicida. Para

**Tabela 3.** Efeito do tratamento de sementes de milho AL Bandeirantes com *Bacillus* spp. no estande final de plantas (EF), clorofila total (CLO), índice de velocidade de emergência (IVE), diâmetro do colo (DC), comprimento do sistema radicular (CR), altura das plantas (AL) e massas secas do sistema radicular (MSR) e da parte aérea (MSA).

Isolado	VARIÁVEIS <sup>1</sup>							
	EF <sup>2</sup> (%)	CLO <sup>2</sup>	IVE <sup>2</sup>	DC <sup>2</sup> (mm)	CR (cm)	AL (cm)	MSR (g/planta)	MSA (g/planta)
Controle	95,0	30,0	9,4	2,5	25,1b	16,1b	0,24a	0,08b
<i>B. velezensis</i> AP-03	100,0	29,0	9,4	2,3	26,6b	17,8b	0,23a	0,09b
<i>Bacillus</i> sp. AP-12	90,0	29,5	9,4	2,5	26,3b	18,3b	0,28b	0,08b
<i>Bacillus</i> sp. AP-61	92,5	29,3	8,6	2,4	26,6b	18,7b	0,29b	0,10c
<i>Bacillus</i> sp. AP-85	97,5	29,2	9,9	2,4	26,0b	18,3b	0,30b	0,09b
<i>Bacillus</i> sp. AP-88	97,5	29,8	9,8	2,4	26,6b	18,5b	0,29b	0,10c
<i>Bacillus</i> sp. AP-115	92,5	28,0	9,0	2,2	26,3b	18,3b	0,25a	0,12d
<i>B. siamensis</i> AP-117	90,0	29,2	9,1	2,3	26,4b	18,6b	0,30b	0,08b
<i>Bacillus</i> sp. AP-161	97,5	29,7	9,8	1,9	22,5a	17,5b	0,28b	0,08b
<i>Bacillus</i> sp. AP-165	90,0	30,1	8,2	2,2	26,2b	17,2b	0,26a	0,09b
<i>Bacillus</i> sp. AP-210	95,0	30,3	9,3	2,3	26,3b	17,7b	0,31b	0,08b
<i>Bacillus</i> sp. AP-240	95,0	30,0	8,4	2,1	25,8b	17,4b	0,23a	0,07a
<i>Bacillus</i> sp. AP-512	95,0	27,3	7,4	2,3	20,9a	12,5a	0,22a	0,06a
<b>p</b>	0,7249	0,4870	0,1345	0,275	<0,0001	0,0059	<0,0001	<0,0001
<b>CV (%)</b>	8,13	5,85	12,74	11,74	4,99	10,99	8,64	9,82

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si (Tukey 5%). CLO – índice SPAD de clorofila. <sup>2</sup> NS: Não significativo (F 5%).

**Tabela 4.** Efeito do tratamento de sementes de milho pipoca IAC 367 com *Bacillus* spp. no estande final de plantas (EF), clorofila total [índice SPAD de clorofila] (CLO), índice de velocidade de emergência (IVE), diâmetro do colo (DC), comprimento do sistema radicular (CR), altura das plantas (AL) e massas secas do sistema radicular (MSR) e da parte aérea (MSA).

Isolado	VARIÁVEIS <sup>1</sup>							
	EF <sup>2</sup> (%)	CLO	IVE	DC <sup>2</sup> (mm)	CR (cm)	AL (cm)	MSR <sup>2</sup> (g/planta)	MSA (g/planta)
Controle	97,0	30,7ab	8,0ab	1,7	27,2bcde	19,8ab	0,09	0,04a
<i>B. velezensis</i> AP-03	90,0	31,6b	7,5ab	1,6	25,3ab	22,1ab	0,07	0,05ab
<i>Bacillus</i> sp. AP-12	97,5	31,4b	8,2b	1,6	30,6f	21,2ab	0,07	0,05ab
<i>Bacillus</i> sp. AP-61	95,0	30,4ab	7,7ab	1,6	29,9def	21,1ab	0,07	0,05ab
<i>Bacillus</i> sp. AP-85	92,5	33,2b	8,6b	1,6	29,2def	21,5ab	0,09	0,06ab
<i>Bacillus</i> sp. AP-88	95,0	30,1ab	8,4b	1,6	28,7cdef	18,9a	0,06	0,05ab
<i>Bacillus</i> sp. AP-115	100,0	30,0ab	7,7ab	1,6	29,5def	21,5ab	0,06	0,05ab
<i>B. siamensis</i> AP-117	95,0	30,6ab	7,8ab	1,6	25,3ab	20,9ab	0,07	0,05ab
<i>Bacillus</i> sp. AP-161	97,5	31,2ab	7,7ab	1,5	27,1bcd	20,9ab	0,06	0,04ab
<i>Bacillus</i> sp. AP-165	90,0	31,1ab	7,7ab	1,5	24,1ab	25,2b	0,08	0,05ab
<i>Bacillus</i> sp. AP-210	100,0	30,7ab	8,4b	1,5	26,1bc	21,1ab	0,07	0,05ab
<i>Bacillus</i> sp. AP-240	87,5	29,1ab	7,2ab	1,5	30,3ef	22,1ab	0,07	0,06b
<i>Bacillus</i> sp. AP-512	87,5	26,7a	5,4a	1,5	22,6a	15,9a	0,07	0,04a
<b>p</b>	0,4207	0,0165	0,00234	0,5681	<0,0001	0,0096	0,2236	0,0137
<b>CV (%)</b>	9,03	5,75	7,73	11,45	4,62	12,059	17,27	17,05

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si (Tukey 5%). <sup>2</sup> NS: Não significativo (F 5%).



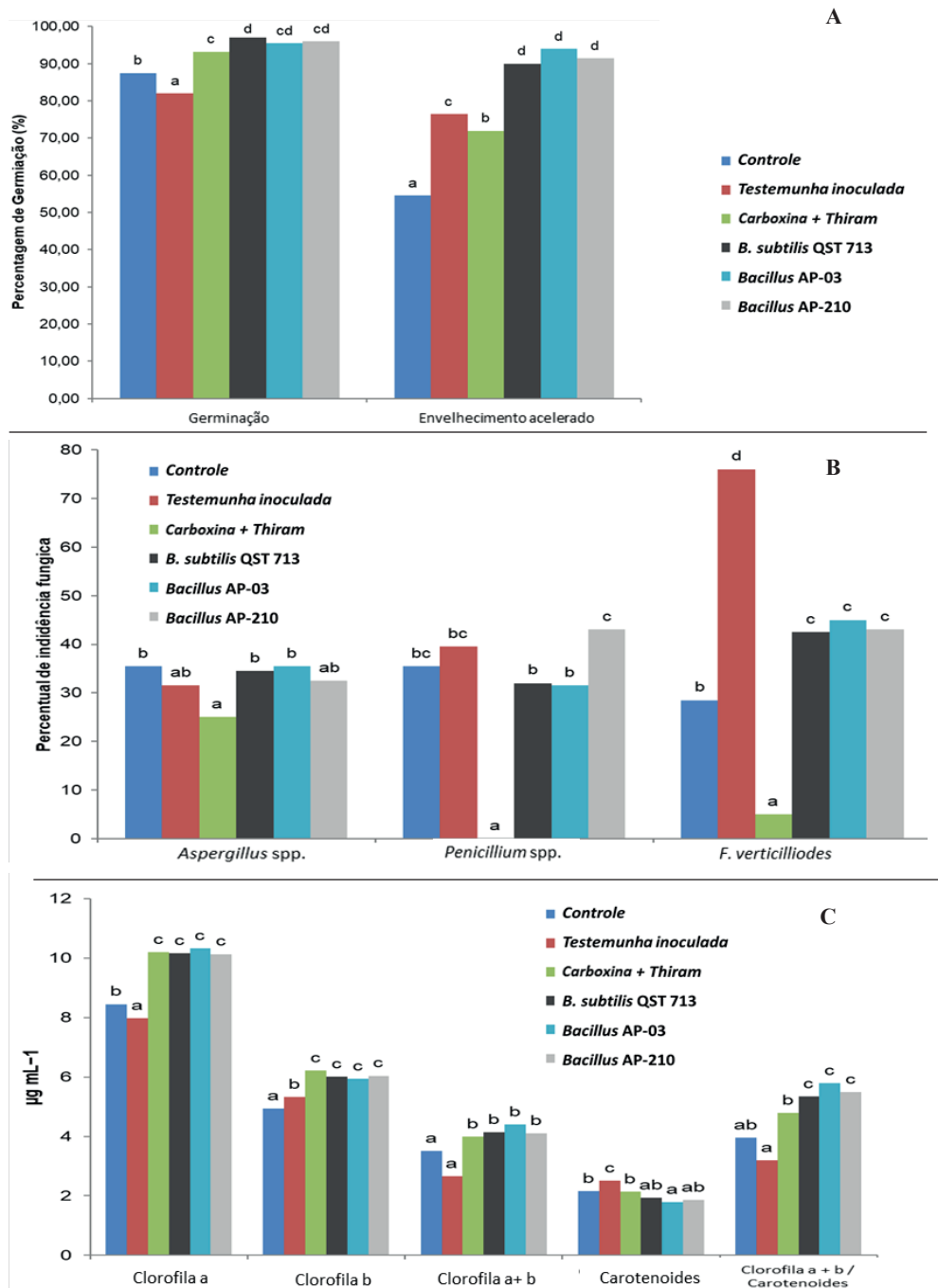


Figura 1 Efeito de *Bacillus subtilis* QST-713, *Bacillus velezensis* AP-03 e *Bacillus sp.* AP-210 no tratamento de sementes de milho AL Bandeirantes inoculadas com *Fusarium verticillioides* sobre qualidade fisiológica (germinação e envelhecimento acelerado) (A), incidência de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium verticillioides* (B) e pigmentos fotossintetizantes (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

o envelhecimento acelerado, os três isolados de *Bacillus* apresentaram germinação superior ( $p < 0,05$ ) aos tratamentos com fungicidas e das testemunhas. *Bacillus velezensis* AP-03 apresentou germinação 72,5% acima da testemunha (Figura 1A).

A mistura de fungicidas (carboxina + Thiram) foi eficiente em reduzir a presença de *F. verticillioides* e *Penicillium* nas sementes de milho (Figura 1B). Todos os isolados de *Bacillus* reduziram a incidência de *F. verticillioides* nas sementes (Figura 1B), mas foram menos eficientes do que os fungicidas. Os isolados de *Bacillus sp.*

não diminuíram a porcentagem de incidência de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* nas sementes de milho. Contudo, nenhum tratamento foi eficiente em reduzir a presença de *Aspergillus* nas sementes (Figura 1B). Além desses fungos, foram detectadas a presença de *F. graminearum*, *Cladosporium sp.*, *Colletotrichum sp.* e *Rhizopus sp.*

A incidência da doença foi estatisticamente reduzida com tratamento de sementes tanto com isolados de *Bacillus* como com a mistura de fungicidas ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5). Também massa seca da parte aérea e total, diâmetro do colo, altura e comprimento do sistema radicular

**Tabela 5.** Efeito do tratamento de sementes de milho com *Bacillus* spp. sobre o estande final de plantas (EF); massa seca do sistema radicular (MSR); massa seca da parte aérea (MSA); massa seca total (MST); diâmetro do colo (DC); altura (A); comprimento do sistema radicular (CR), índice de velocidade de emergência (IVE) e incidência da doença (IN) em plantas de milho AL Bandeirantes provenientes de sementes infestadas com *Fusarium verticillioides*.

TRATAMENTO	VARIÁVEIS <sup>1</sup>								
	EF <sup>2</sup> (%)	MSR <sup>2</sup> (g/planta)	MSA (g/planta)	MST (g/planta)	DC (mm)	A (cm)	CR (cm)	IVE <sup>2</sup>	IN (%)
Controle	88,0	0,318	0,080ab	0,39ab	1,85a	14,08ab	30,46b	4,19	36,6ab
Controle inoculado	76,0	0,272	0,066a	0,33a	1,59a	13,59a	24,47a	3,72	97,1c
Carboxina + Thiram	90,0	0,328	0,082ab	0,40ab	2,13b	14,71ab	32,77b	4,17	25,4a
<i>B. subtilis</i> QST 713	88,0	0,338	0,080ab	0,39ab	2,18bc	14,76ab	31,24b	4,11	41,1ab
<i>B. velezensis</i> AP-03	88,0	0,310	0,088b	0,38ab	2,33bc	15,24b	31,51b	4,21	40,7ab
<i>Bacillus</i> sp. AP-210	90,0	0,350	0,078ab	0,43b	2,44c	14,53ab	30,89b	4,40	54,1b
<b>p value</b>	0,3331	0,1296	0,0397	0,0342	<0,0001	0,0073	<0,0001	0,3116	<0,0001
<b>CV (%)</b>	11,23	13,34	12,03	10,76	6,69	4,24	6,03	11,01	19,31

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si (Tukey 5%). <sup>2</sup> NS: Não significativo (F 5%).

foram significativamente ( $p < 0,05$ ) influenciadas pelos tratamentos, com incremento para todas as variáveis. Estande, massa seca do sistema radicular e IVE não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 5). Maior produção de pigmentos (Clorofilas a, b e a/b) foi observada em todos os tratamentos com *Bacillus* e, também, com fungicidas ( $p < 0,05$ ) (Figura 1C). Maior produção de carotenoides foi observada nas plantas originadas de sementes infestadas com *Fusarium* e sem tratamento sanitário (Figura 1C).

Em relação às enzimas estudadas, foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos, para as atividades de FAL ( $p = 0,0016$ ), de PO ( $p = 0,004$ ) e de PPO ( $p = 0,0472$ ). A resposta a FAL foi maior nas plantas tratadas com isolado *Bacillus* sp. AP-210 (0,0760  $\mu\text{mol}$  ácido cinâmico  $\text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>  $\text{min}^{-1}$ ), diferente estatisticamente dos demais isolados, e 78% acima da testemunha absoluta (0,0426  $\mu\text{mol}$  ácido cinâmico  $\text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>  $\text{min}^{-1}$ ). Para PO os isolados *B. subtilis* QST-713 e *B. velezensis* AP-03 (2,198 e 2,066  $\text{U}$   $\text{mg}^{-1}$  tecido  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente), estimularam sua produção, sendo os valores observados superiores aos demais tratamentos, com a testemunha apresentando 1,932  $\text{U}$   $\text{mg}^{-1}$  tecido  $\text{min}^{-1}$ . Para PPO somente o isolado *B. subtilis* QST-713 diferiu do tratamento com fungicida (1,586 e 0,513  $\text{U}$   $\text{mg}^{-1}$  tecido  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente), sendo que não houve diferença entre os outros tratamentos e a testemunha apresentou valor de 0,860  $\text{U}$   $\text{mg}^{-1}$  tecido  $\text{min}^{-1}$ .

## DISCUSSÃO

Setenta e cinco por cento dos isolados de *Bacillus* estudados foram assimiladores de nitrogênio (Tabela 1). Esta função é importante pois o milho é exigente em nitrogênio, requerendo grandes quantidades (em torno de 50  $\text{kg}$   $\text{ha}^{-1}$ ) para o desenvolvimento (21, 22, 23, 26, 32). Lin et al. (22) observaram que *Bacillus* spp. promoveram o aporte de N necessário para a cultura do milho mesmo com diminuição da adubação nitrogenada em, cerca de, 50%. Estes autores discutem que a característica da assimilação de N, por isolados de *Bacillus*, deve ser considerada na seleção para utilização na cultura do milho.

Também foram descritos isolados de *Bacillus* com capacidade de solubilização de fosfatos (41% do total), evidenciadas em cinco diferentes isolados. A disponibilização deste elemento é importante para a agricultura brasileira, pois os solos cultivados tendem a ser deficientes em relação a este elemento, aumentando a necessidade da utilização de adubos fosfatados e encarecendo a produção agrícola (21, 22, 23, 31). Cinco isolados também foram identificados como produtores de sideróforos (41% do total), que por sua vez tem a capacidade de quelatar o ferro e suas moléculas presentes na suspensão do solo facilitando, assim, a sua utilização pelos vegetais e diminuindo sua disponibilidade para fitopatógenos (22, 23, 28). A produção de sideróforos é importante, segundo Kulimushi et al. (19), pois essa dualidade formada pela restrição da disponibilidade de Fe aos microrganismos e sua disponibilidade para as plantas favorece os cultivos. O ferro pode ser um micronutriente deficitário quando plantas são atacadas por patógenos presentes no solo, como *F. verticillioides*. Assim, é importante considerar essa característica na seleção de microrganismos (28). Também foi constatada a produção de ácido indolacético e ácido cianídrico, em três (25%) e dois (16%) isolados, respectivamente. Esses fitohormônios promovem o crescimento e o desenvolvimento vegetal e o ácido cianídrico inibe fitopatógenos (1, 18, 28).

Nos dois experimentos de promoção de crescimento de plântulas utilizando as variedades AL Bandeirante (comum) e IAC 367 (pipoca) (Tabelas 3 e 4) as respostas não foram uniformes para as cultivares que pudesse claramente selecionar os isolados mais eficientes em promover o crescimento, provavelmente pela variabilidade genética. Lizágara-Sánchez et al. (23) e Nguyen et al. (26) afirmaram que características bioquímicas analisadas em testes *in vitro*, com isolados microbianos, nem sempre são refletidas na presença de plântulas de milho.

A inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios do patógeno (Tabela 2) está relacionada à produção de metabólitos, como por exemplo os lipopeptídeos (19, 22, 23). O isolado *Bacillus* sp. AP-512 foi o mais eficiente em inibir o crescimento micelial, não diferindo estatisticamente dos isolados AP-03, AP-88, AP-117, AP-161, AP-165

e AP-210 (Tabela 2). O isolado *B. velezensis* AP-03 foi mais eficiente em inibir a germinação de conídios, não diferindo estatisticamente dos isolados AP-85, AP-210 e AP-512 (Tabela 2). Informações semelhantes são descritas por Kulimushi et al. (19), Li et al. (21), Lizágarra-Sánchez et al. (23) e Wang et al. (32).

Kulimushi et al. (19) observaram que *B. amyloliquefaciens* inibiu o crescimento micelial e a produção de conídios em, aproximadamente, 50% de *Rhizomucor variabilis*. Lizágarra-Sánchez et al. (23) observaram que *Bacillus* sp. B25 reduziu em 93% a produção de micotoxinas produzidas por *F. verticillioides* em condições de laboratório. O isolado de *Bacillus vallismortis* BV23 inibiu o crescimento micelial de *F. graminearum* em 66,2%, a germinação e a produção de conídios em 90% e 86%, respectivamente (21). No presente estudo *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* sp. AP-210 foram selecionados para a realização dos ensaios com controle biológico de *F. verticillioides*. Como não houve destaque de nenhum dos isolados a seleção foi baseado no fato dos isolados AP-03 e AP-210 apresentarem a maior % de inibição da germinação de conídios de *F. verticillioides* (Tabela 2), estrutura importante para ocorrer a infecção (14, 19, 25). Também foi considerado o fato do isolado AP-210 produzir ácido indolacético importante para a promoção de crescimento das plantas (Tabela 1).

A porcentagem de germinação das sementes de milho AL Bandeirantes inoculadas com *Fusarium* foi semelhante entre as tratadas com isolados de *Bacillus* e com fungicidas (Figura 1A), diferindo das testemunhas. Também para o teste de envelhecimento acelerado, a germinação foi superior nas sementes que foram tratadas com os isolados de *Bacillus* (Figura 1A), provavelmente pela ação de metabólitos vegetais que atuam no crescimento (22). Também as altas temperaturas utilizadas no teste de envelhecimento acelerado podem ter diminuído a efetividade do patógeno nas sementes (Figura 1) (25). Esses resultados são importantes, pois de acordo com Machado et al. (25) *Fusarium* spp. diminuem o estande da cultura. Assim, por meio destes resultados obtidos, pode afirmar que a qualidade fisiológica de sementes de milho, inoculadas ou não com o patógeno, pode ser melhorada com o uso de isolados de *Bacillus* spp., conforme observado por Kulimushi et al. (19), Li et al. (21), Lizágarra-Sánchez et al. (23) e Wang et al. (32).

Na Figura 1B se observa que ocorreu transmissão de *F. verticillioides* para sementes de milho, conforme descrito por Machado et al. (25). Também se observa que os tratamentos com a mistura de fungicidas e com os isolados de *Bacillus* foram eficientes em reduzir a presença deste patógeno nas sementes. Essa redução é de grande importância considerando os prejuízos que este patógeno causa na cultura. O tratamento de sementes de milho com *Bacillus* spp. pode melhorar a qualidade sanitária em sementes inoculadas com *F. verticillioides* (8, 18, 19, 21, 22, 23).

Os valores de estande final; massa seca da parte aérea, do sistema radicular e total; diâmetro do colo; altura, comprimento do sistema radicular e índice de velocidade de emergência do controle inoculado com o patógeno foram os menores, pela ação deletéria do patógenos para as sementes e plântulas de milho (25). Entretanto, somente para algumas variáveis se observa diferença significativa entre o tratamento controle inoculado e os tratamentos de sementes realizados com fungicida e com *Bacillus* (Tabela 5), provavelmente pela ação antagônica dos isolados de *Bacillus* e da molécula sintética testados nesta pesquisa contra *F. verticillioides* (8, 18, 19, 21, 22, 23, 25). *Bacillus velezensis* AP-03 diferiu estatisticamente do controle inoculado para as variáveis massa seca da parte aérea, altura, diâmetro da haste e comprimento do sistema radicular, indicando sua eficiência

em estimular o crescimento das plantas na presença do patógeno. Resultados semelhantes foram observados para os isolados QST-713 e AP-210. Esses resultados estão de acordo com diversos autores que avaliaram a eficiência de isolados de *Bacillus* spp. na promoção de crescimento e no controle de patógenos em culturas comerciais como soja, feijão e milho (8, 11, 12, 18, 21, 22, 23, 28, 32).

A incidência da doença foi estatisticamente reduzida com o tratamento das sementes tanto com os isolados de *Bacillus*, como com fungicida (Tabela 5), indicando que foram eficientes em controlar o patógeno. Esses resultados são semelhantes aos observados por Kulimushi et al. (19), Li et al. (21), Lizágarra-Sánchez et al. (23) e Wang et al. (32). O reflexo do controle do patógeno também pode ser observado nas variáveis de desenvolvimento das plantas, conforme relatado na literatura, como um importante sintoma da ação deste patógeno em sementes e plântulas de milho (8, 18, 19, 21, 22, 23, 25).

Os resultados aqui obtidos indicam que os isolados de *Bacillus* spp. selecionados são promissores para a cultura do milho por promover crescimento e controlar *F. verticillioides*. De maneira geral, os isolados de *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* sp. AP-210 apresentaram resultados semelhantes ao produto comercial à base de *B. subtilis* QST-713. Contudo, esses estudos devem ser realizados em condições de campo para comprovar a eficiência desses organismos nas condições ecológicas de cultivo.

#### AGRADECIMENTOS

Thiago C. Ferreira agradece ao CNPq pela bolsa de doutorado (CNPq 142376/2015-9). Wagner Bettiol agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade (CNPq 307855/2019-8).

#### REFERÊNCIAS

1. Akinrinlola, R.J.; Yuen, G.Y.; Drijber, R.A.; Adesemoye, A.O. Evaluation of *Bacillus* strains for plant growth promotion and predictability of efficacy by *in vitro* physiological traits. **International Journal of Microbiology**, Londres, v.20, p.1-11, 2018.
2. Baracat-Pereira, M.C.; Oliveira, M.G.A.; Barros, E.G.; Moreira, M.A.; Santoro, M.M. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: presence of soluble and membrane-bound forms. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.39, p.91-98, 2001.
3. Bettiol, W. **Seleção de Microrganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae* CAV. para o controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.)**. 1988. 140 p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
4. Brandi, F.; Heck, D.W.; Ferreira, T.C.; Bettiol W. Commercial formulations of *Bacillus* spp. for sugarcane pineapple disease control and growth promotion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.53, n.12, p.1311-1319, 2018.
5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA, 2009. 395p.
6. Bueno, C.J.; Fischer, I.H.; Rosa, D.D.; Furtado, E.L. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v.34, n. 5, p.343-346, 2009.
7. Campos, J.T. **Rizobactérias promotoras do crescimento de cana de açúcar**. 2010. 71p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Sub-tropical) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.
8. Chalivendra, S.; Ham, J.H. *Bacilli* in the biocontrol of mycotoxins. In: Islam, M.; Rahman, M.; Pandey, P.; Boehme, M.; Haesaert, G. (ed.). **Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol**. Cham: Springer, 2019. v.2, p.49-62.
9. Conab. **Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos**, v.7, n.5, 177 p., 2020. Safra 2020/21: Quinto levantamento. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 13 fev. 2020.



10. Döbereiner, J.; Baldani, V.L.D.; Baldani, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, DF: Embrapa, 1995.
11. Dorighello, D.V.; Bettiol, W.; Leite, R.M.V.B.C. Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. **Crop Protection**, Surrey, v.67, p.59-65, 2015.
12. Dorighello, D.V.; Forner, C.; Leite, R.M.V.B.C.; Bettiol, W. Management of Asian soybean rust with *Bacillus subtilis* in sequential and alternating fungicide applications. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v.49, n.1, p.79-86, 2020.
13. Duangmal, K.; Apenten, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. romano). **Food Chemistry**, Norwich, v.64, n.3, p.351-359, 1999.
14. Fantazzini, T.B.; Guimarães, R.M.; Clemente, A.D.C.S.; Carvalho, E.R.; Machado, J.C. *Fusarium verticillioides* inoculum potential and its relation with the physiological stored corn seeds quality. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.32, n.5, p.1254-1262, 2016.
15. Gaige, R.A.; Todd, T.; Stack, J.P. Interspecific competition for colonization of maize plants between *Fusarium proliferatum* and *Fusarium verticillioides*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 104, n.8, p. 1221-1216, 2020.
16. Halfeld-Vieira, B.A.; Vieira Júnior, J.R.; Romeiro, R.S.; Silva, H.S.A.; Baracat-Pereira, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.8, p.1247-1252, 2006.
17. Hammerschmidt, R.; Nuckles, E.M.; Kuć, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, Londres, v.20, n. 1, p.73-82, 1982.
18. Hussain, A.; Zahir, Z.A.; Asghar, H.N.; Imran, M.; Ahmad, M.; Hussain, S. Integrating the potential of *Bacillus* sp. Az6 and organic waste for zinc oxide bio-activation to improve growth, yield and zinc content of maize grains. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, Faisalabad, v.57, n. 1, p.123-130, 2020.
19. Kulimushi, Z.; Arias, A.; Franzil, L.; Steels, S.; Ongena, M. Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.15, article 850, 2017.
20. Lanza, F.E.; Zambolim, L.; Costa, R.V.; Queiroz, V.A.V.; Cota, L.V.; Silva, D.D.; Souza, A.G.C.; Figueiredo, J.E. Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. **Crop Protection**, Surrey, v.65, p.232-237, 2014.
21. Li, Y.; Wang, R.; Liu, J.; Xu, L.; Ji, P.; Sun, L.; Li, L. Identification of a biocontrol agent *Bacillus vallismortis* BV23 and assessment of effects of its metabolites on *Fusarium graminearum* causing corn stalk rot. **Biocontrol Science and Technology**, Abington, v.29, n.3, p.263-275, 2019.
22. Lin, Y.; Watts, D.B.; Kloepper, J.W.; Adesemoye, A.O.; Feng, Y. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria at various nitrogen rates on corn growth. **Agricultural Sciences**, Wuhan, v.10, n.12, p.1542-1565, 2019.
23. Lizárraga-Sánchez, G.J.; Leyva-Madrígal, K.Y.; Sánchez-Peña, P.; Quiroz-Figueroa, F.R.; Maldonado-Mendoza, I.E. *Bacillus cereus sensu lato* strain B25 controls maize stalk and ear rot in Sinaloa, Mexico. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.176, v.1, p.11-21, 2015.
24. Machado, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 138p.
25. Machado, J.C.; Machado, A.Q.; Pozza, E.A.; Machado, C.F.; Zancan, W.L.A. Inoculum potential of *Fusarium verticillioides* and performance of maize seeds. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.38, n.3, p.213-217, 2013.
26. Nguyen, P.A.; Strub, C.; Fontana, A.; Schorr-Galindo, S. Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. **Biological Control**, Amsterdam, v.104, n.1, p.10-27, 2017.
27. Pascholati, S.F.; Nicholson, R.L.; Butler, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v.115, n. 2, p.165-172, 1986.
28. Romera, F.J.; García, M.J.; Lucena, C.; Martínez-Medina, A.; Aparicio, M.Á.; Ramos, J.; Pérez-Vicente, R. Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.10, article 287, 2019.
29. Schwyn, B.; Neilands, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, New York, v.160, n.1, p.47-56, 1987.
30. Silva, J.J.; Viaro, H.P.; Ferranti, L.S.; Oliveira, A.I.M.; Ferreira, J.M.; Ruas, C.F. Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations and occurrence of fumonisins in maize grown in southern Brazil. **Crop Protection**, Surrey, v.99, n.9, p.160-167, 2017.
31. Szafranska, K.; Reiter, R.J.; Posmyk, M.M. Melatonin improves the photosynthetic apparatus in pea leaves stressed by paraquat via chlorophyll breakdown regulation and its accelerated de novo synthesis. **Frontiers in Plant Science**, Lousanne, v.8, article 878, 2017.
32. Wang, S.; Sun, L.; Zhang, W.; Chi, F.; Hao, X.; Bian, J.; Li, Y. *Bacillus velezensis* BM21, a potential and efficient biocontrol agent in control of corn stalk rot caused by *Fusarium graminearum*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, Cairo, v.30, n.1, p.9, 2020.