

MARLA KARYNE FELIPPI BARBIERI

**INTERAÇÃO ENTRE MILHO (*Zea mays*), A BACTÉRIA
Azospirillum brasilense E O FUNGO FITOPATOGÊNICO
*Colletotrichum graminicola***

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Maissonave Arisi

FLORIANÓPOLIS
2018

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

BARBIERI, MARLA KARYNE FELIPPI BARBIERI
INTERAÇÃO ENTRE MILHO (Zea mays), A BACTÉRIA
Azospirillum brasilense E O FUNGO FITOPATOGÊNICO
Colletotrichum graminicola / MARLA KARYNE FELIPPI
BARBIERI BARBIERI ; orientadora, ANA CAROLINA
MAISONNAVE ARISI MAISONNAVE ARISI, 2018.
49 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Zea mays. 3.
Azospirillum brasilense. 4. Colletotrichum
graminicola. 5. qPCR. I. MAISONNAVE ARISI, ANA
CAROLINA MAISONNAVE ARISI. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

**Interação entre milho (*Zea mays*), a bactéria
Azospirillum brasilense e o fungo fitopatogênico
*Colletotrichum graminicola***

por

Marla Karyne Felippi Barbieri

Dissertação julgada e aprovada em 28/02/2018, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.


Banca Examinadora:


Prof.^a.Dr.^a.Ana Carolina Maisonnave Arisi (Presidente-CCA/UFSC)


Prof.^a. Dr.^a. Rose Adele Monteiro (Externo - UFPR/PR)
(participação por videoconferência)


Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares (Interno -
CCB/UFSC)


Prof. Dr. Marciel João Stadnik (Interno - CCA/UFSC)


Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2018

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado forças e nunca ter me abandonado.

À minha mãe, por todos os incentivos, puxões de orelha e por ter me ensinado a não desistir.

Minha amiga Pâmela, que desde o início me ajudou neste trabalho, que me ensinou tudo o que eu não sabia, que teve paciência e dedicação para explicar, acompanhar, corrigir, e no fim, me acalmar. Pâmela, você se tornou uma amiga para a vida e tem um lugar especial no meu coração.

Em especial a CAPES, por ter financiado minha bolsa, sem a qual não haveria Mestrado.

À professora Ana Carolina Maissonave Arisi, por ter aceitado me orientar.

À Aline Martins Cardozo que esteve comigo nos primeiros passos e etapas do projeto. Obrigada por estar sempre disponível e de bem com a vida!

À Maryella por ter ajudado em todas as etapas do experimento.

Meu namorado Luiz Fernando Pezzini, que desde muito divide comigo as agonias e estórias da vida, por estar do meu lado e me ajudar em todos os momentos.

Ao Centro de Ciências Agrárias e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. À turma de mestrandos de 2016.

Ao Laboratório de Fitopatologia, ao professor Marciel Stadnik à Aline Cristina Velho por terem me ajudado e auxiliado em todas as dúvidas e cedido o espaço para a condução do experimento.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e aos colegas do Laboratório de Biomol, que ainda estão e que já saíram, por todas as conversas e momentos de desconcentração.

Aos momentos difíceis, erros e acertos, pontos altos e baixos, sorrisos e choros. Acredito que aprendemos mais com os erros do que com os acertos, são eles que nos mostram qual o próximo caminho que devemos tomar.

Enfim, aos últimos dois anos de minha vida e às pessoas que passaram por ela, obrigada, todos vocês foram peças fundamentais e me ensinaram um pouco mais sobre a vida.

RESUMO

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são capazes de trazer inúmeros benefícios às plantas, uma vez que estas promovem o crescimento e desenvolvimento vegetal, auxiliam diretamente na fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos, e também podem ser capazes de produzir fitormônios. Além disso, as BPCV também podem reduzir o uso de agroquímicos na agricultura, controlando biologicamente alguns patógenos agressivos às diversas culturas agrônômicas por competição de espaço e nutrientes ou pela indução de resistência sistêmica no hospedeiro. *Azospirillum brasilense* é uma BPCV capaz de se associar com gramíneas de alto valor econômico, como o milho. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de colonização de *A. brasilense* estirpe FP2 com plantas de milho, cultivar 20A55, bem como seu potencial benéfico no crescimento da cultura e na capacidade biocontroladora sobre o fungo *Colletotrichum graminicola*, causador da doença antracnose. O experimento foi conduzido em casa de vegetação utilizando solo não estéril, em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro grupos, quatro repetições. Os grupos foram constituídos da seguinte forma: um grupo controle, um grupo contendo apenas o fungo fitopatogênico, um terceiro grupo inoculado com o fungo e tratado com a bactéria diazotrófica, e por fim, o último grupo apenas tratado com a bactéria dizaotrófica. As plântulas de milho foram inoculadas com o fungo fitopatogênico aos 7, 14 e 21 dias após o tratamento (DAT) com *A. brasilense*. Decorridos 4 dias após a inoculação do fungo, as plantas foram coletas e analisadas. A quantificação de DNA de *A. brasilense* por qPCR, utilizando iniciadores AzoR2.1 não apresentou resultado positivo para presença de *A. brasilense* estirpe FP2, logo resultados positivos quanto a ação da bactéria, não foram observados em nenhuma das variáveis de crescimento analisadas, tão pouco a ação biocontrolada pode ser detectada.

Palavras chave: *Zea mays*, *L.*, *Azospirillum brasilense*, *Colletotrichum graminicola*, qPCR.

ABSTRACT

Plant growth promoting bacteria (PGPB) are capable of bringing innumerable benefits to plants, such as: promoting plant growth and development, biological nitrogen fixation and phosphate solubilization. To the environment, the PGPB also shown to be benefic, reducing the use of agrochemicals in agriculture due to the biological control against aggressive pathogens that causes economically damages to divers agronomic crops. The benefic bacteria can be capable to compete for space and nutrients, preventing the pathogen colonization in roots or they can induce the host resistance in plants. PGPB *Azospirillum brasilense* is able to associate with important cereal, such as maize. The objective of this work was to evaluate the *A. brasilense* strain FP2 capacity of colonization on maize plants, cultivar 20A55, and its potential benefits in the crop growth and also the potential biocontrol capacity was evaluated for the fungus *Colletotrichum graminicola*. The experiment was conducted in a greenhouse using non-sterile soil in a completely randomized design with four replicates. The groups were constituted as follows: a control group, a group containing only the phytopathogenic fungus, a third group inoculated with the fungus and treated with the diazotrophic bacteria, and finally, the last group only treated with the bacteria. Maize seedlings were inoculated with *C. graminicola* at 7, 14 and 21 days after treatment (DAT) with *A. brasilense*. After 4 days of inoculation, the plants were collected and analyzed. The results of bacterial DNA quantification by qPCR did not present significant amplifications for *A. brasilense*, so positive results regarding the action of the bacterium were not observed in any of the growth variables analyzed, or in the biocontrol activity.

Key-words: *Zea mays*, *L.*, *Azospirillum brasilense*, *Colletotrichum graminicola*, qPCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Dez maiores produtores de Milho do mundo segundo a FAO	19
Figura 2 - Uso de pesticidas pelo Brasil do ano 2000 até 2015	20
Figura 3 - Processo infeccioso de <i>C. graminicola</i> . SP, esporo; AP, apressório; PH, hifa primária biotrófica; SH, hifa secundária necrotrófica	25
Figura 4 - Damage percentage caused by <i>C. graminicola</i> in maize varieties (P30F53 and 20A55) 7 days after inoculation	39
Figura 5 –Severity of anthracnose disease caused by fungus <i>C. graminicola</i> in maize leaves, cultivar 20A55 (first experiment). Mean values correspond to the average of 4 replicates, each one being comprised of three leaves (n = 12). Data are presented as mean ± SD. The groups represented: non-treated and treated with <i>A. brasilense</i> . A) Plants assessed at 7 D.A.T. B) Plants assessed at 14 D.A.T. C) Plants assessed at 21 D.A.T. Statistically significant difference T-test (P < 0.05) between treated and non-treated	40
Figura 6 –Severity of anthracnose disease caused by fungus <i>C. graminicola</i> in maize leaves cultivar 20A55 (Second experiment) Mean values correspond to the average of 4 replicates, each one being comprised of three leaves (n = 12). Data are presented as mean ± SD. The groups represented: non-treated and treated with <i>A. brasilense</i> . A) Plants assessed at 7 D.A.T. B) Plants assessed at 14 D.A.T. C) Plants assessed at 21 D.A.T. Statistically significant difference T-test (P < 0.05) between treated and non-treated.....	41
Figura 7 - qPCR standard curves for <i>A. brasilense</i> quantification. Average Cq (n = 2). Curve generated using DNA isolated from pure culture of <i>A. brasilense</i> strain FP2 as template. Cq versus log DNA copy number and primer pair AzoR2.1.)	42
Figure 8 - qPCR standard curves for <i>A. brasilense</i> quantification in vitro assay. Average Cq (n = 2): A) Curve generated using DNA isolated from pure culture of <i>A. brasilense</i> strain FP2 as template. Cq versus log DNA copy number and primer pair AzoR2.1	43
Figura 9 – Bacterial DNA copy number/g of root (fresh weight) of maize seedlings grown in vitro after inoculation with <i>Azospirillum brasilense</i> strain FP2 in two cultivars (DKB 390 and dow 20A55). Inoculated samples collected at 7 Days After Inoculation (D.A.I). Data are presented as	
as mean ± SD (n = 9)	
.....	44

Figura 10 – Maize growth variable after *A. brasilense* FP2 inoculation, root fresh weight (A) and for shoot fresh weight (B). PLAZOF (treated) and PLF (non-treated). Data are presented as mean \pm SD (n=12)
..... 45

Figura 11 - Maize growth variable total leaf area, after *A. brasilense* FP2 inoculation, collected at 7, 14 and 21 days after treatment. Non-treated and treated, Data are presented as mean \pm SD (n=12)
..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- qPCR quantification results of <i>Zea mays</i> 20A55 cultivated in soil inoculated with <i>A. brasilense</i>	42
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
CAPÍTULO 1	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 A cultura do Milho	19
2.2 Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal - gênero <i>Azospirillum</i>	21
2.3 Colonização de plantas por <i>A. brasilense</i> FP2	23
2.4 O gênero <i>Colletotrichum</i> e a espécie <i>Colletotrichum graminicola</i>	24
2.5 Interações moleculares entre plantas e fungos patogênicos	26
2.6 Supressão de patógenos por bactérias benéficas	29
3 OBJETIVOS.....	31
CAPÍTULO II	33
Interaction among a maize cultivar, <i>Azospirillum brasilense</i> FP2, and the phytopathogenic fungus <i>Colletotrichum graminicola</i>.....	33
Abstract.....	33
Introduction	34
Material and methods.....	35
Microorganism growth conditions	35
Maize inoculation with <i>A. brasilense</i> and <i>C. graminicola</i>	35
Comparison of disease tolerance in two maize cultivars	36
DNA isolation and <i>Azospirillum brasilense</i> quantification.....	37
In vitro <i>A. brasilense</i> assay	38
Results	38
Comparing disease tolerance in two maize cultivars (DOW 20A55 and P30F53)	38
Maize association with <i>A. brasilense</i> and <i>C. graminicola</i>	39
Bacterial DNA quantification in maize roots by qPCR	42
In vitro <i>A. brasilense</i> assay	43
Effect of <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 on maize growth.....	44
Discussion.....	47
Conclusion.....	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
6 REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas de maior produção de grãos no mundo, devido ao seu potencial produtivo, seu valor nutricional, suas inúmeras aplicações e sua vasta cadeia produtiva. O Brasil é o terceiro maior produtor deste cereal, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China (FAOSTAT, 2015). Graças ao melhoramento genético, o potencial produtivo das cultivares aumentou, e concomitantemente, houve um aumento na exigência de insumos e agroquímicos, que contribuíram para o esgotamento dos solos. Outro aspecto em transformação diz respeito à evolução no aparecimento de doenças fúngicas a partir da década de 90, ocorrido principalmente devido ao aumento da utilização de fertilizantes nitrogenados (LIMA *et al.*, 2010). Grande parte destas doenças são controladas pelo uso intensivo de defensivos agrícolas, ocasionando um impacto negativo ao ambiente.

A biologia do solo oferece inúmeras alternativas para o desenvolvimento de novas biotecnologias que visam substituir sistemas agrícolas tradicionais baseados no crescente uso de fertilizantes químicos e dos agrotóxicos. Estudos apontam que algumas bactérias, que vivem aderidas às plantas, possuem a habilidade de estimular o crescimento vegetal (2010; BENEDUZI *et al.*, 2013; GEORGE *et al.*, 2013), e esses microrganismos têm chamado a atenção pela necessidade de reduzir o uso de químicos na agricultura, especialmente no contexto de produção sustentável e proteção ambiental.

Uma estratégia consiste em explorar os inúmeros benefícios que as bactérias do gênero *Azospirillum* proporcionam. Segundo Reis (2007), a inoculação em gramíneas só teve impulso de fato a partir de 1980, quando o gênero *Azospirillum* teve grande destaque devido à estirpe Cd de *A. brasilense*. Vários experimentos realizados na época com esta estirpe, apresentaram incremento de 20 a 30% na produtividade de gramíneas como arroz, milho e trigo. Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar as respostas positivas observadas nas plantas inoculadas com *Azospirillum*. Dentre os mecanismos diretos podemos citar: a fixação biológica de nitrogênio – FBN (MEHNAZ, 2015), a solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ *et al.*, 2004) a produção de fitormônios (CASSÁN *et al.*, 2009). Já, a ação indireta ocorre por meio do controle biológico de patógenos (WANG *et al.*, 2009), através da competição de espaço e nutrientes ou indução de resistência sistêmica no hospedeiro (VAN WEES *et al.*, 2000).

A resistência sistêmica induzida (ISR, do inglês *induced systemic resistance*) é definida como um aumento na capacidade defensiva das plantas contra patógenos e pragas, que é adquirida após estimulação externa (RAMAMOORTHY *et al.*; 2001) resultando em modificações na estrutura da parede celular e em mudanças bioquímicas e fisiológicas que levam a síntese de proteínas e substâncias envolvidas nos mecanismos de defesa das plantas. Assim, estas se tornam não apenas localmente, mas também sistemicamente mais resistentes a infecções. A indução de resistência por bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) consiste em fenômeno de ampla ocorrência: existem relatos de indução de resistência em feijão de fava (*Vicia faba* L.) contra o vírus do mosaico amarelo do feijão (BYMV) em plantas inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizobium leguminosarum* (ELBADRY *et al.*, 2006; BHATTACHARYYA e JHA, 2012). Em pepino foi observado resistência a murcha de *Fusarium* (causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*) em plantas inoculadas com *Pseudomonas putida* estirpe 89B-27 e cepa 90-166 (LIU *et al.*, 1995; BHATTACHARYYA e JHA, 2012).

Tem sido observado um aumento no número de estudos envolvendo as BPCV, sendo a maioria dos resultados positivos observados *in vitro*. Estudos *in vitro* desconsideram as importantes interações que ocorrem na biota do solo, havendo assim, muitas vezes, falta de correlação entre os resultados destes trabalhos e os realizados no meio externo. Pesquisadores têm apontado alguns percalços no que se refere aos estudos realizados com BPCV, como por exemplo a dificuldade de colonização radicular e os problemas de sobrevivência do inóculo no ambiente. Estes fatores impedem a colonização da rizosfera e consequentemente a ocorrência das interações benéficas (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

Embora muitas vezes os resultados das interações entre plantas e BPCV sejam bastante variáveis, há que se ressaltar que os trabalhos têm continuado, para que se possa conhecer cada vez mais detalhes acerca do comportamento destas bactérias. Por isso e por todos os benefícios que estas bactérias associativas podem trazer à agricultura, cada vez mais a comunidade científica demonstra interesse em estudá-los.

CAPÍTULO 1

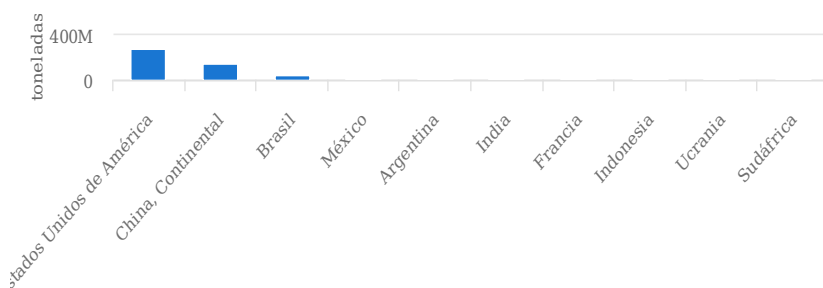
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do Milho

O milho (*Zea mays*) é um alimento básico e versátil que foi domesticado a partir do teosinto (*Zea mays* subsp. *parviglumis*), uma gramínea selvagem nativa do México e da América Central (MATSUOKA *et al.*, 2002).

De importância mundial, é um dos cereais de maior relevância em termos de alimentação humana e animal e tem grande destaque no fornecimento de biocombustível para a população e para as indústrias. O Brasil ocupa 3º lugar no ranking dos maiores produtores deste cereal, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China (Figura 1) sendo o cereal mais extensivamente cultivado, ocupando, na safra de 2016/2017, uma área em torno de 17 milhões de hectares, atingindo uma produção de aproximadamente 96 milhões de toneladas e uma produtividade média de 5.552 kg/ha (CONAB, 2017).

Figura 1 Dez maiores produtores de Milho do mundo segundo a FAO



Fonte: FAOSTAT 2017

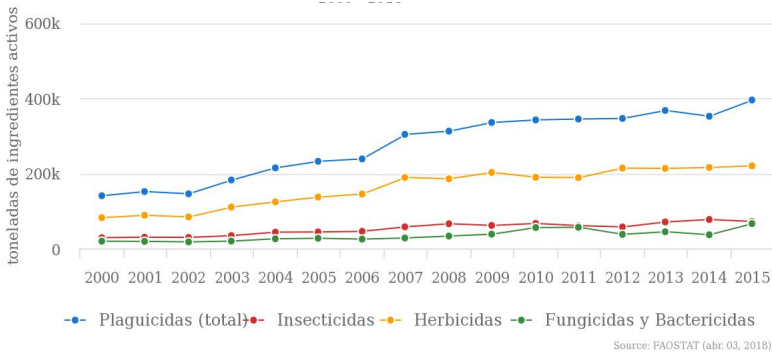
Ainda, de acordo com as projeções feitas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA (2014), até 2022 o grão de milho será o mais negociado nos mercados internacionais, representando 80% do comércio mundial. Esta mesma fonte também afirma que o aumento das importações pela China é o fator responsável por 40% do crescimento projetado no comércio mundial do milho

(DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS, 2014).

Em adicional a sua importância agrônômica, desde o início do século 20 o milho tem se configurado como organismo chave para estudos de genética, citogenética, e pesquisas genômicas. Estes estudos se intensificaram ainda mais após a elucidação completa do genoma da linhagem B73 do milho, em 2009 (SCHNABLE, 2012).

A alta demanda comercial do cereal exige produtividade cada vez mais elevada, o que ocasiona, em consequência, uma crescente utilização de insumos e defensivos agrícolas. O Brasil consumiu em 2014 um total de aproximadamente 400 mil toneladas de ingredientes ativos em suas terras (Figura 2). Este elevado consumo aliado a tecnologias suplementares (Bhattacharjee *et al.*, 2008), acarretou danos graves ao ambiente, principalmente pela eutrofização e contaminação de solos e águas fluviais (CHIEN *et al.*, 2011; DUNGAIT *et al.*, 2012; MARKS *et al.*, 2013), levando a uma grande degradação e esgotamento de recursos naturais, afetando negativamente inúmeras funções ecológicas do solo (SHAHZAD *et al.*, 2013).

Figura 2 Uso de pesticidas no Brasil de 2000 até 2015



Fonte: FAOSTAT 2017

Diante deste preocupante cenário, torna-se necessário o desenvolvimento de novos estudos a fim de encontrar alternativas mais viáveis, econômicas e sustentáveis para o uso do solo. Dentre estas alternativas, a inoculação de plantas com BPCV tem se mostrado uma das alternativas mais eficientes e promissoras.

2.2 Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal - gênero *Azospirillum*

As BPCV são encontradas na natureza na forma de vida livre ou em associação com plantas, sendo amplamente distribuídas no solo. De modo geral, contribuem direta e indiretamente para o crescimento das plantas, podendo fornecer substâncias que se encontram escassas em condições ambientais, como por exemplo o nitrogênio. Tais bactérias benéficas podem também promover a solubilização de fosfatos (KREY *et al.*, 2013) e induzir a produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal, como auxina, giberelina, citocinina e etileno, (ARRUDA *et al.*, 2013). Os efeitos positivos desses organismos podem também ocasionar a supressão de patógenos por produção de sideróforos ou antibióticos e até mesmo promover o antagonismo à organismos patogênicos (ASGHAR *et al.*, 2002); (VAN LOON, 2007). Ademais, as BPCV promovem maior tolerância das plantas a estresses, como seca, alta salinidade, toxicidade de metais e carga de pesticidas (BASHAN *et al.*, 2004).

Os principais gêneros de BPCV estudados são *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Rhizobium* e *Herbaspirillum*, com destaque para um aumento das pesquisas a partir dos anos 90 (MONTEIRO *et al.*, 2012). Estas bactérias, segundo Evans e Burris (1992), estão caracterizadas em três grupos: diazotróficos de vida livre (que fixam o nitrogênio para seu próprio uso); diazotróficos associativos (que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas e sem estabelecer simbiose); e os diazotróficos simbióticos (que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e o micro-simbionte, e em alguns casos, ocorre aparecimento estruturas diferenciadas denominadas nódulos). Um dos grupos de maior interesse para as gramíneas é o grupo de diazotróficos associativos, no qual o gênero *Azospirillum*, redescoberto por Döbereiner e Day (1976) tem se destacado.

As bactérias do gênero *Azospirillum* pertencem à subclasse α das Proteobactérias. São gram-negativas, espiraladas, essencialmente diazotróficas em meio semi-sólido, curvas, móveis e provêm de várias origens geográficas. A temperatura ideal de crescimento varia entre 28 e 41° C, dependendo da espécie (ECKERT *et al.*, 2001), e algumas estirpes podem colonizar não só a rizosfera, mas também o interior das raízes (DOBEREINEIR *et al.*, 1995). Estas bactérias já foram isoladas em mais de 100 espécies de plantas, podendo também ser inoculadas em raízes que

não apresentam qualquer histórico de colonização com *Azospirillum* (BASHAN *et al.*, 2004).

A exemplo da grande maioria das bactérias diazotróficas, o gênero *Azospirillum* possui uma notável capacidade de beneficiar o crescimento e o desenvolvimento de diversas culturas, incluindo espécies de cereais de grande importância, como o milho, o arroz (*Oryza sativa*) e o trigo (*Triticum aestivum*) (BASHAN e DE-BASHAN, 2010; HUNGRIA *et al.*, 2010). Assim como ocorre com a maioria das BPCV, o aumento do crescimento e do desenvolvimento de plantas acarretado pelo gênero em questão provém de uma série de mecanismos (BASHAN e DE-BASHAN, 2010). Alguns desses mecanismos consistem na incorporação de água e nutrientes (Ardakani *et al.*, 2011); na síntese de fitormônios como auxina (Spaepen e Vanderleyden) e giberelinas (REIS *et al.*, 2011); na indução de tolerância a estresses bióticos e abióticos e de genes de defesa (FUKAMI *et al.*, 2017) e na FBN (MARQUES *et al.*, 2017).

Contudo, apesar de estas bactérias trazerem inúmeros benefícios às plantas colonizadas, algumas limitações podem prejudicar seu sucesso. Dentre tais limitações podemos citar a acidez, tanto nos solos como nos meios de cultura, bem como altas concentrações de amônia (NH₃) e baixas concentrações de oxigênio e carbono, as quais inibem o complexo nitrogenase, reduzindo significativamente a população de bactérias (KAVADIA *et al.*, 2008).

Após a redescoberta do gênero *Azospirillum* por Döbereiner e Day (1976) o interesse da comunidade científica pelo estudo da inoculação destas bactérias em gramíneas aumentou significativamente. Buscou-se potenciais cepas de *Azospirillum* e os primeiros inoculantes comerciais para gramíneas foram produzidos. As estirpes de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, apresentaram os melhores resultados e as melhores taxas de sobrevivência nos solos. Tais cepas, além da FBN, promoveram o crescimento das plantas (pela produção de substâncias estimulantes do crescimento radicular) e o maior rendimento de grãos nas culturas do trigo e do milho. Após anos de pesquisa, as cepas foram fornecidas às indústrias tecnológicas para produção de inoculantes, sem custo algum (HUNGRIA *et al.*, 2011).

Depois deste e de outros estudos publicados, a evidência de uma alternativa real de incremento de produtividade e a possibilidade de redução de uso de pacotes tecnológicos em culturas, despertaram ainda mais o interesse da indústria e do meio acadêmico no estudo das interações das BPCV com as mais diversas culturas. Atualmente, o maior

objetivo dos pesquisadores consiste na extensão e utilização em grande escala das BPCV em culturas não leguminosas, principalmente cereais, pois estes constituem a base alimentar mais importante para a população humana e ocupam em torno de 50 % das terras cultivadas, aproximadamente cinco vezes mais que as leguminosas.

2.3 Colonização de plantas por *A. brasilense* FP2

O gênero *Azospirillum* abrange um grupo de BPCV de vida livre e suas espécies já foram encontradas nos mais diversos lugares do planeta (HUNGRIA *et al.*, 2010; MEHNAZ, 2015). Por ser uma bactéria associativa de vida livre, sofre grande influência do ambiente externo e das plantas com as quais interage. Um grande número de estudos com diversas cepas de *A. brasilense* já foi realizado, mas os resultados dependem de um conjunto de mecanismos externos e internos, como: tipo de solo, cultivar, espécie de planta, cepa de *A. brasilense* utilizada e o padrão de colonização.

A cepa FP2 de *A. brasilense*, utilizada neste trabalho, é um mutante natural da cepa SP7 e resistente a dois antibióticos, o Ácido Nalidixico (NAL) e a Estreptomicina (SM), sendo uma bactéria fixadora de nitrogênio (PEDROSA e YATES, 1984). Estudos anteriores com esta cepa e com diferente cultivares já foi realizado por (FALEIRO *et al.*, 2013), e os resultados apresentados foram positivos tanto para a colonização, como para as variáveis de crescimento analisadas. Porém, a como já citado anteriormente, o sucesso da inoculação depende de vários fatores, e mais, no caso de inoculação de *Azospirillum* em campo, o sucesso depende da interação da bactéria com a cultivar e da capacidade de as cepas selecionadas e inoculadas sobreviverem e colonizarem as sementes germinadas na presença de um grande número de outros microorganismos presentes na rizosfera. Esta capacidade de sobrevivência e colonização das bactérias tem estreita relação com a motilidade e quimiotaxia em direção aos exsudatos radiculares liberados pelas plantas (CREUS *et al.*, 1996; HAUWAERTS *et al.*, 2002; BASHAN *et al.*, 2004).

Com relação ao padrão de colonização de *A. brasilense*, Broek (1993) analisando a colonização da cepa Sp245 em trigo demonstrou que os primeiros locais de colonização da raiz primária são os pontos de surgimento de raízes laterais e dos pelos radiculares, e SCHLOTTER *et al.* (1994) observou, através de anticorpos monoclonais e técnicas

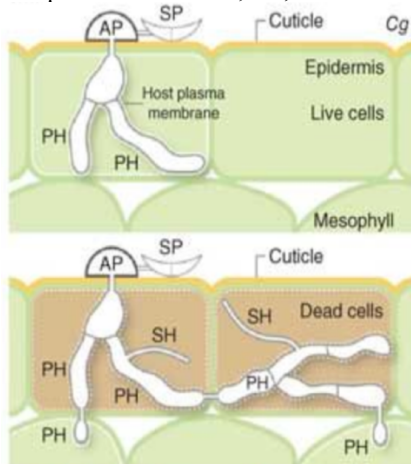
imunológicas, que esta mesma cepa atingiu o interior do xilema, porém a estirpe SP7 foi observado que esta estirpe coloniza a superfície radicular. Assmus et al. (1995) confirmaram estes resultados. Em conclusão, o modo de colonização das raízes das plantas por *Azospirillum* depende de cada espécie e estirpe e sendo a estirpe FP2 uma mutante da cepa SP7, esta fica aderida a superfície radicular das plantas.

2.4 O gênero *Colletotrichum* e a espécie *Colletotrichum graminicola*

Além do benefício diretamente ligado ao incremento de produtividade pelas BPCV, estas são apontadas também como possíveis agentes de controle biológico sobre alguns fitopatógenos, como por exemplo, os pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, causadores da antracnose, uma doença que atinge uma vasta gama de vegetais.

O gênero *Colletotrichum* é amplo e apresenta inúmeras espécies com formas de infecção e colonização muito semelhantes entre si (SANDERS e KORSTEN, 2003; DAMM *et al.*, 2012). De ciclo de vida hemibiotrófico, seu processo de infecção e colonização em vegetais ocorre da seguinte forma: primeiramente o conídio germina formando uma estrutura especializada de infecção (apressório). O apressório facilita a penetração do fungo através da cutícula e das células da epiderme da planta. Na sequência, hifas primárias são emitidas. Estas hifas estão envolvidas por uma membrana que se desenvolve dentro da célula epidérmica viva do hospedeiro. Nesta fase o patógeno ainda é biotrófico, ou seja, a célula vegetal permanece viva. Posteriormente o fungo passa à sua fase necrotrófica, emitindo hifas finas e de rápido crescimento, que invadem células hospedeiras, destruindo então o tecido vegetal (O'CONNELL *et al.*, 2012; VARGAS *et al.*, 2012). Nesta fase que sintomas ficam mais evidentes nas plantas. Este processo de infecção está apresentado na Figura 3

Figura 3 Processo infeccioso de *C. graminicola*. SP, esporo; AP, apressório; PH, hifa primária biotrófica; SH, hifa secundária necrotrófica.



Modelo de infecção descrito para *Colletotrichum graminicola* do milho (*Zea mays*) (B). AP: Apressório; PH: Hifa primária; SP: Esporo; SH: Hifa secundária. Fonte: O'CONNELL et al., 2012.

A antracnose é capaz de afetar mais de 197 espécies de plantas, incluindo árvores, plantas daninhas e importantes plantas de cultivo, como o milho (Park *et al.*, 2013). Seus sintomas se iniciam sob a forma de manchas cloróticas de vários formatos, as quais posteriormente se transformam em lesões necróticas acinzentadas (sintoma referido como antracnose) (Bergstrom e Nicholson, 1999). Tais lesões podem coalescer e prejudicar drasticamente a área fotossintética, além de causar senescência das folhas quando o estágio da doença está avançado. Esses fatores provocam perdas de rendimento e grandes prejuízos econômicos aos agricultores (SUKNO *et al.*, 2008); COTA *et al.*, 2012).

Espécie causadora da antracnose, *Colletotrichum graminicola* ataca gramíneas, sendo um patógeno agressivo tanto no interior da planta, quanto um saprófita facultativo em resíduos de cultura (BERGSTROM e NICHOLSON, 1999). Este patógeno começou a ser um problema na agricultura a partir da década de 70 em campos de milho na América do Norte. Em apenas dois anos, grandes áreas produtoras de milho foram dizimadas e abandonadas (WARREN *et al.*, 1973). No Brasil, o primeiro relato de ocorrência de *C. graminicola* foi feito por Silveira et al. (1965) em campos híbridos de milho na região de Campinas – SP, e os danos variaram de 12 a 40% na perda de produção de grãos.

Atualmente a doença encontra-se disseminada por todo território brasileiro. Um fator relevante e que contribui para a alta incidência da antracnose é o fato deste patógeno ser necrotrófico formador de micélio, podendo sobreviver nos restos de culturas por até 10 meses (NAYLOR e LEONARD, 1977). Desta forma, o controle da doença se torna difícil, pois suas estruturas são uma grande fonte de inóculo primário para as próximas culturas caso seu ciclo não seja quebrado. Também em relação a sobrevivência deste fungo, existem relatos de que ele é capaz de formar uma matriz mucilaginosa ao redor de suas estruturas de reprodutividade, a qual não está somente envolvida na sobrevivência dos conídios, mas também na indução da patogênese (BERGSTROM NICHOLSON, 1999). Ainda, segundo Pascholati (1993) há evidências de que essa matriz possua inibidores de germinação e enzimas importantes no estabelecimento das relações patógeno-hospedeiro, o que facilita sua sobrevivência em ambiente desfavorável, bem como sua infecção nas plantas hospedeiras.

2.5 Interações moleculares entre plantas e fungos patogênicos

No meio ambiente, as plantas são constantemente expostas à um grande número de microrganismos e como resposta apresentam complexos mecanismos de defesa. Na maioria dos ataques, nenhum dano é causado à planta devido à resistência que os vegetais apresentam contra a maioria dos organismos. Estas plantas, chamadas de resistentes, fazem o reconhecimento imediato do patógeno invasor e ativam mecanismos de defesa. Entretanto, algumas plantas apresentam mecanismos de respostas de defesa mais fracas e lentas, tornando-as suscetíveis ao ataque dos organismos. Quando um organismo consegue penetrar na célula vegetal sem que qualquer mecanismo seja ativado, ele pode se tornar um patógeno, e como consequência a planta pode sofrer dano, perdendo sua capacidade produtiva e em casos extremos, a morte (YANG *et al.*, 1997).

A primeira barreira encontrada pelos organismos nocivos na tentativa de acessar o interior da planta são os mecanismos próprios dos vegetais, que podem ser pré ou pós formados. Os pré-formados ou constitutivos são ceras, pilosidade, parede celular espessa, presença de tricomas, adaptações nos estômatos, fibras vasculares, entre outros. Já os pós-formados ou induzíveis são halos, papilas, lignificação, camada de abscisão, tiloses, etc. Tais barreiras evitam a entrada do patógeno no interior da planta (BENT e MACKAY, 2007; YANG *et al.*, 2009). Algumas vezes estas barreiras são efetivas, porém, outras vezes os patógenos conseguem adentrar nas células e quando isso acontece, os

mecanismos de resistência basal e a defesa medida pelo gene R são ativados.

A regra aos ataques por patógenos causadores de doença é a resistência, podendo então inferir que as plantas possuem uma capacidade inate de reconhecer seus potenciais invasores e defender-se deles (STASKAWICZ, 2001). Quando um patógeno não específico ataca uma planta qualquer e esta não se apresenta doente temos então o mecanismo de defesa denominado de resistência não hospedeira ou resposta hipersensitiva (RH). Esse mecanismo consiste na rápida e programada morte celular de células vegetais em contato com o patógeno, impedindo o avanço da colonização pelo mesmo (COLLMER, 1998). Por outro lado, quando o patógeno consegue infectar a planta, a defesa basal é ativada assim que a planta detecta a presença do patógeno em seu interior. Então, elicitores são liberados de duas maneiras: pela ação hidrolítica do patógeno na parede celular vegetal, ou também, por elicitores próprios dos patógenos, que neste caso recebem o nome de padrão molecular associado ao patógeno/ microorganismo (PAMPS ou MAMPS, do inglês *pathogen/microbial-associated ou molecular patterns*) (NURNBERGER *et al.*, 2004). Na célula vegetal estes MAMPS são reconhecidos pelos receptores padrões de reconhecimento (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) que então desencadeiam uma série de respostas de defesa. Tais defesas podem incluir respostas mediadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) ou de nitrogênio (NOS), as quais atuam tanto na sinalização como na produção direta de compostos antimicrobianos. Também pode ocorrer alterações na parede celular vegetal e na síntese de proteínas relacionadas a patogênese (PR – do inglês *pathogenesis-related*), como as quitinas e glucanases, que podem atacar diretamente estruturas dos patógenos (Newman *et al.*, 2013).

Um outro mecanismo de defesa, é a resistência mediada pelo gene R, que começou a ser desvendada em um estudo realizado por Flor (1956), o qual utilizando o patossistema linho (*Linum usitatissimum* L.) versus a ferrugem do linho (*Melampsora lini*) observou que a diferença entre as variedades resistentes e as suscetíveis ao ataque do patógeno, era a presença de um único gene dominante de resistência (*R*). Flor ainda percebeu que a diferença entre os isolados avirulentos e os virulentos do patógeno estava na presença de um único gene dominante de avirulência (*Avr*). O pesquisador concluiu então que a resistência de plantas de linho ao ataque do patógenos era observada somente quando o produto específico do gene *R*, presente na planta, combinava-se com o produto do gene *Avr* correspondente no patógeno. Com base em análises genéticas,

Flor comparou a interação planta-patógeno com a interação antígeno-anticorpo de mamíferos, e postulou que, para cada gene de resistência (*R*) presente na planta, há um gene de avirulência (*Avr*) correspondente no patógeno. Modelos do tipo receptor-elicitor e do tipo sentinela ou guarda têm sido propostos para explicar tal reconhecimento. A hipótese guarda, originalmente proposta por (Van Der Biezen e Jones, 1998), postula que as proteínas *R* (ditas guarda) são ativadas indiretamente, pela interação direta da proteína *Avr* (efetora) do patógeno, com uma proteína alvo do hospedeiro. Isso é possível, pois o patógeno causa modificações na estrutura quaternária da proteína do hospedeiro que, conseqüentemente, são detectadas pelas proteínas-guarda, oriundas do gene *R*. Isto inicia uma cascata de sinalização, culminando na resposta de defesa da planta. A interação *Avr-R* pode ocorrer tanto direta quanto indiretamente em resposta à invasão do patógeno (CRUTE e PINK, 1996; GASSMANN e BHATTACHARJEE, 2012)

Como as plantas são constantemente atacadas por diversos microrganismos, sendo que muitas vezes os ataques são efetuados por microrganismos benéficos as plantas desenvolveram mecanismos evoluídos a fim de selecionar os microrganismos nocivos dos benéficos. Com a evolução da resposta imune vegetal, alguns MAMPs sofrem pressão de seleção em patógenos na tentativa de evitar seu reconhecimento em plantas hospedeiras (NEWMAN *et al.*, 2013). Um caso de um MAMP não reconhecido por plantas de diferentes famílias (e, portanto, que não desencadeia resposta imune inata), é o lipopolissacarídeo (LPS) da bactéria fixadora de nitrogênio *Bradyrhizobium sp.* BTAi1, cuja estrutura é única na natureza (SILIPO *et al.*, 2011). Especula-se que no primeiro contato do vegetal com o patógeno, mecanismos de defesa são ativados e paralelamente a esta ativação, alguns receptores vegetais específicos para bactérias benéficas desencadeiam mecanismos que suprimem as respostas de defesa, permitindo a colonização da planta pela bactéria benéfica (CARVALHO *et al.*, 2016).

Uma vez que, cepas selecionadas de bactérias benéficas habitantes do solo podem proteger as plantas e colocar em ação o sistema imune vegetal por meio da ISR (ZAMIOUDIS *et al.*, 2013), pesquisadores têm buscado meios de utilizar bactérias associativas no controle biológico de patógenos.

2.6 Supressão de patógenos por bactérias benéficas

A agricultura sustentável tem ganhado destaque nos últimos anos, e com o intuito utilizar produtos menos agressivos ao ambiente, pesquisas com bactérias benéficas às plantas tem ganhado destaque e crescido exponencialmente na busca de alternativas mais sustentáveis no desenvolvimento de plantas e na supressão e controle de pragas.

Como já citado anteriormente, os efeitos diretos do uso de BPCV está relacionado à estrutura da planta e seu efeito indireto consiste justamente na supressão de patógenos, que pode ser efetuado de diversas maneiras, como por exemplo: por antagonismo, mediado pela produção de metabólitos secundários antimicrobianos, enzimas líticas (como quitinases e glucanases); através da ocupação do nicho ecológico semelhante àquele ocupado pelo fitopatógeno (ocorrendo controle por meio de competição de nutrientes entre bactérias e fungos); ou também, por meio da produção de substâncias antagonicas ao patógeno ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência pela Resistência Sistêmica Induzida (RSI) (COMPANT *et al.*, 2005; BERENDSEN *et al.*, 2012; PEREZ-MONTANO *et al.*, 2014)

A Resistência Sistêmica Induzida RSI pode ser acionada pela BPCV e coloca em ação o sistema imune da planta contra ampla gama de patógenos, sendo esta a principal resposta de defesa ativada nestes casos. Porém, há comprovada ação aditiva de RSI e resistência sistêmica adquirida (RSA) na defesa contra patógenos. A RSA é a resposta da planta ativada quando esta entra em contato com um patógeno necrotrófico. Este fato indica que as rotas RSI, a qual é dependente de jasmonato e etileno; e RSA, dependente de ácido salicílico, podem agir em conjunto fortalecendo o sistema de defesa vegetal contra patógenos. Já foi observado, por exemplo, que *Bacillus cereus* ativa concomitantemente 3 diferentes rotas de defesa (do ácido salicílico, dos jasmonatos e do etileno) em plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas com *Pseudomonas syringae* pv. tomato, desencadeando assim RSA e RSI (NIU *et al.*, 2011; NIU *et al.*, 2016). RSA decorrente do contato com BPCV também foi observada em pimenta, protegendo as plantas da infecção provocada pelo patógeno *Stemphylium lycopersici* (SON *et al.*, 2014). Assim, embora a RSI seja a resposta mais comum de indução de resistência sistêmica elicitada por BPCV, a indução de RSA também pode ocorrer (NIU *et al.*, 2011).

Em outro trabalho, desenvolvido por Guerrero e Molina (2015), um mutante de *A. brasilense* REC3 inoculado em plantas de morango,

induziu a ativação de outros diferentes mecanismos bioquímicos, estruturais e moleculares, sendo observado um acúmulo de compostos fenólicos solúveis nas raízes e folhas das plantas inoculadas, possivelmente mediado pela ativação da Enzima Fenilalanina Amônia Liase, que poderia levar à síntese de uma variedade de metabólitos secundários relacionados à defesa, como ácido salicílico (SA), fitoalexinas e polímeros semelhantes a lignina.

Yasuda *et al.* (2009) demonstraram que a colonização de plantas de arroz pela cepa *Azospirillum* sp. B510 induziu resistência ao ataque dos fitopatógenos *Magnaporthe oryzae* e *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, causadores da brusone e da mancha foliar bacteriana, respectivamente. *A. brasilense* também foi capaz de produzir sideróforos que atuam na proteção de plantas de morango infectadas por *Colletotrichum acutatum* (TORTORA *et al.*, 2011; 2012). Lembrando que esses compostos são importantes para aumentar o desempenho competitivo dessa BPCV quando em associação com a planta hospedeira (ROSCONI *et al.*, 2016)

Ainda, Arencibia *et al.* (2006) sugeriu que a bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* ativa as respostas de defesa na cana-de-açúcar, resultando em resistência sistêmica contra a bactéria patogênica *Xanthomonas albilineans* em cana-de-açúcar.

Com tantos trabalhos indicando a capacidade das BPCV de auxiliar as plantas na defesa ao ataque dos patógenos, as BPCV despertaram a atenção da comunidade científica, que agora não só mais acredita no potencial benéfico relacionado à estrutura e desenvolvimento das plantas, mas também na possibilidade de redução do uso de produtos agroquímicos e fertilizantes sintéticos, visando um sistema de agricultura cada vez mais sustentável, centrada na proteção ambiental (FIGUEIREDO *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

Avaliar a capacidade de colonização da bactéria *Azospirillum brasilense* FP2 na cultivar de milho Dow 20A55, e observar as variáveis de crescimento das plantas, bem como o efeito da inoculação com *A. brasilense* sobre a incidência da doença causada pelo fungo fitopatogênico *Colletotrichum graminicola*.

CAPÍTULO II

Interaction among a maize cultivar, *Azospirillum brasilense* FP2, and the phytopathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*

Marla Karyne Felippi Barbieri, Pâmela Dall'Asta, Aline Martins Cardozo, Marciel Stadnik, Ana Carolina Maisonnave Arisi.

Abstract

The hemibiotrophic fungus *Colletotrichum graminicola* can cause the antrachnose disease in several crops, including maize, which is one of the most cultivated cereal in the world. On the other hand, the *Azospirillum brasilense*, a diazotrophic plant growth promoting bacteria (PGPB) can affect positively the plants. The positive result depends on the joint action of internal and external mechanisms, which means that they can vary according to environmental conditions and the cultivar. In this way, the objective of this work was to evaluate the colonization of *A. brasilense* FP2 in *Zea mays* seedlings Dow 20A55 cultivar by assessing the plant growth variables and its potential as biocontrol agent against *Colletotrichum graminicola*. The assay was conducted in non-sterile soil with *Zea mays* seedling in greenhouse following a randomized design with four replicates. The plants were pre-treated with *A. brasilense* FP2 followed by *C. graminicola* inoculation at 7, 14 and 21 days after treatment (DAT). The colonization of maize seedlings by *A. brasilense* was not observed in greenhouse conditions and therefore, no significant result was obtained in this experiment. However, once the response depends on several factors such as plant genotype, soil type, environmental factors, cultivar and phytopathogen, it is still possible that further studies, can be effective in biocontrol agent or also, bring benefits for the plant parameters.

Key-words: *Zea mays*, *L.*, *Azospirillum brasilense*, *Colletotrichum graminicola*, qPCR.

Introduction

The development of new technologies is essential to improve agricultural productivity and efficiency. Although the agriculture nowadays is much more sustainable than was in the past, there is still much more to be improved, since synthetic fertilizers and agrochemicals are still widely used in the current production system, which causes large impacts in soil and in environment.

Maize (*Zea mays* L.), a cereal largely produced throughout the world, can be employed as food feed and fuel. The genetic improvement and other factors have contributed to the high productivity of the maize cultivars. However, this large grain production also increases the use of synthetic products, including fertilizers and agrochemicals. In this sense, the search for environmental less aggressive alternatives became a great challenge to the researchers. Associative diazotrophic bacteria like *Azospirillum brasilense*, an important plant growth promoting bacteria (PGPB), was highlighted as potential reducer of these chemicals once can stimulate plant growth through several mechanisms (RODRIGUEZ *et al.*, 2004; CASSÁN *et al.*, 2009), and more recently, PGPB started also to be employed as means of biological control of pathogens. One of these, *Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wilson, causes anthracnose in maize.

Many studies using the PGPB *A. brasilense* is already known, but the positive results of plant-bacterial interaction depend on the internal and external mechanisms, such as environmental factors, different types of soils, crops, plant cultivars and bacterial strains (COMPANT *et al.*, 2010; MOUTIA *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2013). Regarding the beneficial effects of PGPB as biocontrol agents *in planta*, a serie of studies can be found employing several genera. Tortora *et. al.* (2011; 2012) shows that *A. brasilense* controlled anthracnose disease (caused by *C. acutatum*) in strawberry plants. In the same way, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Arencibia *et al.*, 2006), *Brevibacterium iodinum* (Son *et al.*, 2014), *Azospirillum* sp. (YASUDA *et al.*, 2009) and *A. brasilense* (BASHAN E DE-BASHAN, 2002) were able to exert control in plants challenged by different phytopathogens. Taking in account the potencial of PGPB to elicitate response of defense in plants against pathogens and once it was already demonstrated that *A. brasilense* was able to control anthracnose in strawberry plants, we evaluated *A. brasilense* FP2 potential to control the anthracnose disease caused by *C. graminicola* in maize grown in

greenhouse. We also evaluated *A. brasilense* colonization in maize grown in vitro by quantitative PCR (qPCR).

Material and methods

Microorganism growth conditions

Azospirillum brasilense strain FP2 (PEDROSA e YATES, 1984) was grown in NFbHPN agar medium plates (MACHADO *et al.*, 1991) and incubated for 48 hours at 30°C to obtain the pure culture. After the incubation, the pure culture was grown in 30 ml of NFbHPN medium supplemented with 5 mg/L sodium lactate in orbital shaker (120 rpm) until OD₆₀₀ 0.8 (~10⁸ cells/mL). Streptomycin (SM) at a final concentration of 80 µg/mL and nalidixic acid (NAL) concentration at 10 µg/mL was added to the bacterial culture. To obtain cell pellets, the bacterial culture was centrifuged (12000 g) for 2 min and then resuspended in NFb medium. A correlation was obtained between the optical density (OD) measured at 600 nm using Hitachi U2910 Spectrophotometer (Tokyo, Japan) and the number of colonies by plating known serially diluted in saline (0.9% NaCl) cell cultures in NFbHPN agar plates. Colony counts performed after serial dilutions were spread on the medium plates and incubated for 72 h at 30 °C.

Colletotrichum graminicola isolate MANE53 is located in the mycological collection (MANE) of the Laboratory of Plant Pathology, Federal University of Santa Catarina, Brazil. Pure cultures of the isolate MANE53 were grown on potato dextrose agar medium (PDA) and incubated for 21 days under fluorescent light with 12 hours photoperiod at ± 25 °C.

Maize inoculation with *A. brasilense* and *C. graminicola*

These experiments involved *Zea mays* seeds (20A55 - Dow Agrosience) pre-treated with *A. brasilense* FP2 followed by inoculation with *C. graminicola*. Seeds were surface-sterilized in 70% ethanol for 3 minutes followed by submersion in 2% sodium hypochlorite plus 2.5 % Tween 20 for 30 min. Then, the seeds were rinsed 3 times with sterile distilled water, transferred to water-saturated paper and maintained for 3 days in a dark growth chamber at 25 °C for germination.

Pre-germinated seeds were treated with *A. brasilense* strain FP2 culture (OD₆₀₀ ≈ 0.8; 10⁸ cells of *A. brasilense* strain FP2 mL⁻¹) after

dilution to 10^7 cells mL^{-1} in sterile NFb lactate medium without nitrogen source. Seedlings and inoculum were maintained in constant agitation (80 rpm) during 30 min at 30 °C (Roncato-Maccari *et al.*, 2003). In order to confirm the inoculation, the plating count was done. The mean count observed was 3.66×10^8 CFU / mL.

Control seedling were treated at the same way but with no bacterial culture added. After the treatment, the seeds were transferred to 3L pots containing non-sterile soil collected in Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (clay 93 g/kg, silt 249 g/kg, sand 658 g/kg, organic matter 16.62 g/kg TFSA, pH 5.4). No fertilizers and pesticides were added.

C. graminicola inoculation was performed at 7, 14 and 21 days after *A. brasilense* treatment. The conidia suspension was filtered through layer cheesecloth, washed twice by centrifugation at 25 °C and $1098 \times g$ for 8 min until obtain a suspension of 5×10^5 conidia mL^{-1} . Tween 20 (1 μL per 10 mL inoculum) was added to the suspension to facilitate the conidia adherence. Then, whole plants were sprayed using an atomizer connected to an air compressor (58 psi), delivering about 5 mL plant^{-1} and placed in a dark moist chamber (100% humidity) for 24 h. After that period, they were moved to the greenhouse again.

Five days after the pathogen inoculation, two leaves per plant per time of treatment were sampled and scanned to determine the total area and the percentage of necrotic leaf area using the software Quant® (v.1.02, Federal University of Viçosa, 2003).

Two assays were carried out in different periods of year. The first one was performed in 2016, November/December (average temperature in greenhouse of 28°C); and the second in March 2017 (average temperature of 26°C). All the experiments were conducted in greenhouse in completely randomized blocks, with 4 biological replicates, under natural light, without temperature control (average temperature 28 °C) and watered daily. T-test was used to compare control and treated groups. Analyses were performed using Assistat software (v. 7.7 beta, Federal University of Campina Grande, Brazil, 2016) under 95% of significance.

Comparison of disease tolerance in two maize cultivars

Tolerance test was conducted using two maize cultivars (P30F53 and 20A55). Germination of seeds and *C. graminicola* inoculation were performed as described above. Pathogen was inoculated 7 days after sowing. The same experimental conditions were repeated as above.

Five days after the pathogen inoculation, two leaves per plant were sampled and photographed to quantify the percentage of necrotic leaf area using the software Quant®.

DNA isolation and *Azospirillum brasilense* quantification

DNA isolation from pure culture of *A. brasilense* FP2 was performed using Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega™, Madison, WI, EUA). Total DNA from maize roots was isolated using DNeasy plant mini kit (Qiagen) as described by the manufacturer and each extract was pooled of three roots (~ 100 mg of tissue). DNA concentration and quality were estimated using a Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Wilmington, DE, USA) by O.D. measurements at 260 and 280 nm.

To quantify *A. brasilense* FP2 (expressed as DNA copy number) by qPCR we used the pair of primers AzoR2.1 predicted to be located in a noncoding region (Stets *et al.*, 2015).

Standard curves were constructed by ten-fold serial dilution of *A. brasilense* FP2 pure culture in water, from 10^6 (61.6ng/ μ L) to 10^0 (61.6 fg/ μ L), based on the size of *A. brasilense* genome 7.5 Mbp (Wisniewski-Dye *et al.*, 2011). To estimate that, we used the following formula: $m = \frac{A.brasilense \text{ genome size} \times 660}{6.023 \times 10^{23}}$ in wich 6.023×10^{23} and 600 are the Avogadro's constant and the molecular weight of DNA base pairs (660 Da/bp), respectively.

Efficiency, slope, and correlation coefficient of the standard curves were calculated by plotting the Cq values against \log_{10} DNA copy number and amplification efficiency were calculated by the equation $E = \left[\left(10^{-\frac{1}{s}} \right) - 1 \right] \times 100$, being E the efficiency in percentage; and s the slope obtained from the standard curve.

qPCR reactions contained 12.5 μ L of 2x Power SYBR GREEN PCR master mix, 125 nM primer pair AzoR2.1 R/F and ultrapure water in a final volume of 25 μ L. DNA template quantity used was 15 ng/ μ L. PCR runs were analyzed using automatic software settings and all reactions were carried out in duplicate on an ABI PRISM 7500 detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) under cycling conditions of 2 min at 50 °C, 10 min incubation at 95 °C followed by 40 cycles of 15 s at 94 °C and 1 min at 60 °C.

In vitro *A. brasilense* assay

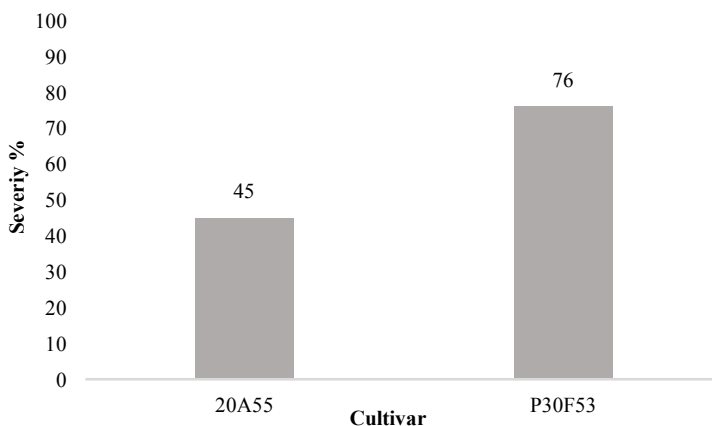
This assay was performed using 20A55 and DKB390 maize cultivars inoculated with *A. brasilense* FP2. Seeds were sterilized as described and transferred to plates containing 0.8% agar-water to germinate. Seeds were kept for 3 days in a dark growth chamber at 25 °C and then inoculated with *A. brasilense* as mentioned. Inoculated and control pre-germinated seeds were placed in glass tubes containing plant medium solution (Egener *et al.*, 1999) and grown in a controlled-environmental chamber, placed side-by-side for 7 days (16 h photoperiod, 25 °C, and 40 % humidity). Maize plants were harvested on the 7th day after inoculation (DAI) and qPCR assays were performed as described previously.

Results

Comparing disease tolerance in two maize cultivars (DOW 20A55 and P30F53)

The disease tolerance test was done to observe possible difference responses caused by the pathogen attack in different maize cultivars. One of the cultivars, P30F53 had already been tested in previous experiments, being already known the plant susceptibility to the *C. graminicola* attack. On the other hand, the variety used in this experiment (DOW 20A55) had never been tested before, in our conditions, for this pathogen. Maize P30F53 presented a higher susceptibility comparing to 20A55 cultivar (Figure 4).

Figure 4 - Damage percentage caused by *C. graminicola* in maize varieties (P30F53 and 20A55) 7 days after inoculation.



Maize association with *A. brasilense* and *C. graminicola*

Experiments consisted in inoculation of *C. graminicola* at 7, 14 and 21 days after treatment with *A. brasilense*. The treatments were four: control trait (only maize plants); plants treated with *A. brasilense*; plants treated with *A. brasilense* and inoculated with *C. graminicola*; plants only inoculated with *C. graminicola*.

The first experiment was conducted in 2016, November/December, presented results were related to disease severity (Figure 5). No relevant differences were observed. It was only observed an isolated significant statistical difference at 14 days after treatment.

The second experiment was carried out in March 2017, results confirmed the first experiment (Figure 6). Once again, no relevant differences were observed. Only another isolated significant statistical difference was detected (at 21 DAT) but it is not relevant taking in account the results in general.

Figure 5 –Severity of anthracnose disease caused by fungus *C. graminicola* in maize leaves, cultivar 20A55 (first experiment). Mean values correspond to the average of 4 replicates, each one being comprised of three leaves (n = 12). Data are presented as mean \pm SD. The groups represented: non-treated and treated with *A. brasilense*. A) Plants assessed at 7 D.A.T. B) Plants assessed at 14 D.A.T. C) Plants assessed at 21 D.A.T. Statistically significant difference T-test ($P < 0.05$) between treated and non-treated.

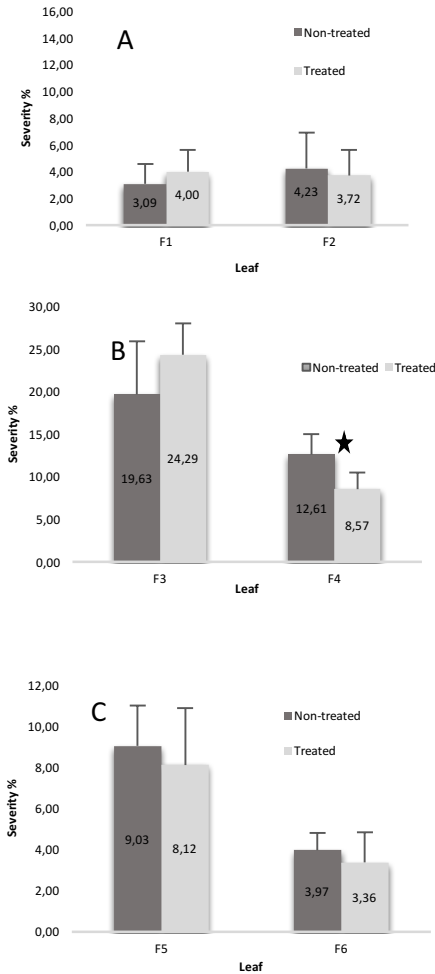
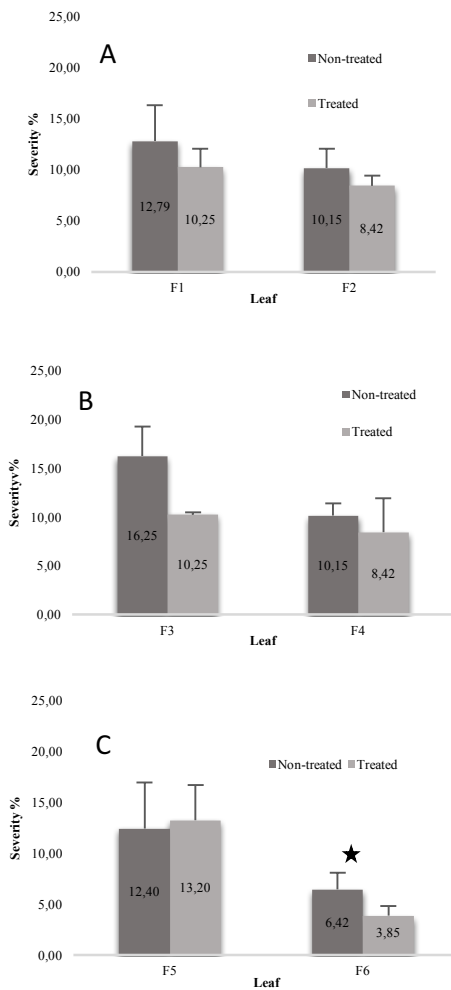


Figure 6 –Severity of anthracnose disease caused by fungus *C. graminicola* in maize leaves cultivar 20A55 (Second experiment) Mean values correspond to the average of 4 replicates, each one being comprised of three leaves (n = 12). Data are presented as mean \pm SD. The groups represented: non-treated and treated with *A. brasilense*. A) Plants assessed at 7 D.A.T. B) Plants assessed at 14 D.A.T. C) Plants assessed at 21 D.A.T. Statistically significant difference T-test ($P < 0.05$) between itreated and non-treated.



Bacterial DNA quantification in maize roots by qPCR

qPCR standard curve (Figure 7) presented efficiency of 95%. The qPCR limit of detection (LOD) for *A. brasilense* FP2 quantification was established as 10^1 copies of bacterial DNA. In amplification reactions, samples showed undetermined amplification even for inoculated and non-inoculated roots of maize seedlings grown in pots (Table 1).

Figure 7 - qPCR standard curves for *A. brasilense* quantification. Average Cq (n = 2). Curve generated using DNA isolated from pure culture of *A. brasilense* strain FP2 as template. Cq versus log DNA copy number and primer pair AzoR2.1.

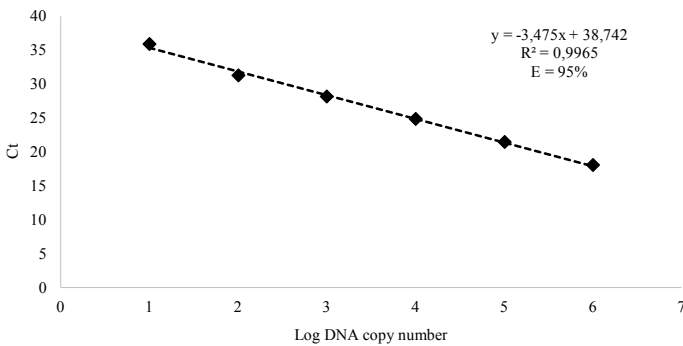


Table1- qPCR quantification results of *Zea mays* 20A55 cultivated in soil inoculated with *A. brasilense*.

D.A. T	Control (Cq)	<i>A. brasilense</i> (Cq)	<i>A. brasilense</i> + <i>C. graminicola</i> (Cq)
7	ND	ND	ND
14	ND	ND	ND
21	ND	ND	ND

In vitro *A. brasilense* assay

To verify *A. brasilense* colonization in roots of two maize cultivars, *A. brasilense* DNA copy number and CFU were estimated by qPCR using standard curves. The standard curve (Figure 8) presented $R^2 = 0.99$ and amplification Efficiency of 102%. The LOD was established in 10^1 copies. *A. brasilense* FP2 DNA was quantified at 7th DAI. 10^5 CFU/g of maize roots were observed in both cultivar in the seventh day after inoculation (Figure 9).

Figure 8 - qPCR standard curves for *A. brasilense* quantification in vitro assay. Average Cq (n = 2): A) Curve generated using DNA isolated from pure culture of *A. brasilense* strain FP2 as template. Cq versus log DNA copy number and primer pair Azor2.1.

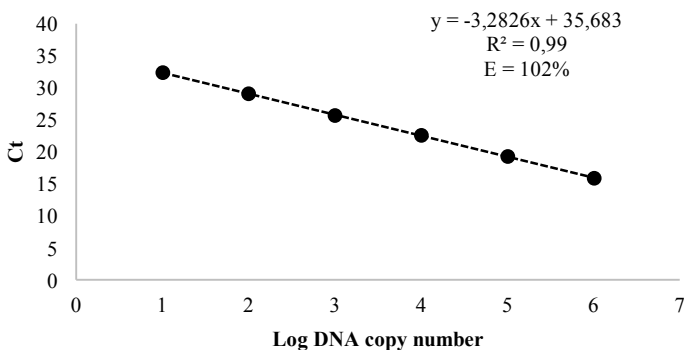
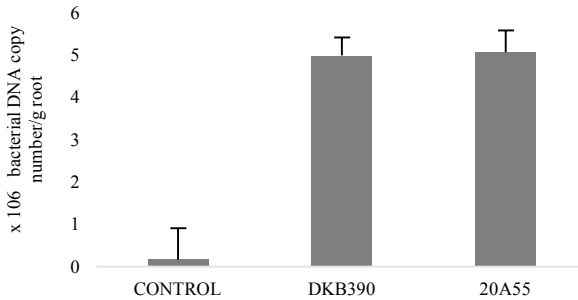


Figure 9 – Bacterial DNA copy number/g of root (fresh weight) of maize seedlings grown in vitro after inoculation with *Azospirillum brasilense* strain FP2 in two cultivars (DKB 390 and dow 20A55). Inoculated samples collected at 7 Days After Inoculation (D.A.I). Data are presented as mean \pm SD (n = 9)



Effect of *Azospirillum brasilense* FP2 on maize growth

Fresh roots and shoots weight of maize plants from the first experiment were measured (Figure 10). The results obtained for inoculated plants were 3.16, 4.31, and 5.40 g of roots; while for control plants, the mean weights were 2.79, 3.76 and 5.90 g of roots at 7, 14 and 21 DAT, respectively. Regarding the shoot fresh weight, the mean values for inoculated plants were 2.82, 5.36, 6.77 g; the results for control plants were 2.95, 5.02 and 5.61 g at 7, 14 and 21 D.A.T. No significant differences were observed in both analyzes. The total leaf area was also evaluated (Figure 11) and no statistical differences were observed.

Figure 10 – Maize growth variable after *A. brasilense* FP2 inoculation, root fresh weight (A) and for shoot fresh weight (B). PLAZOF (treated) and PLF (non-treated). Data are presented as mean \pm SD (n=12)

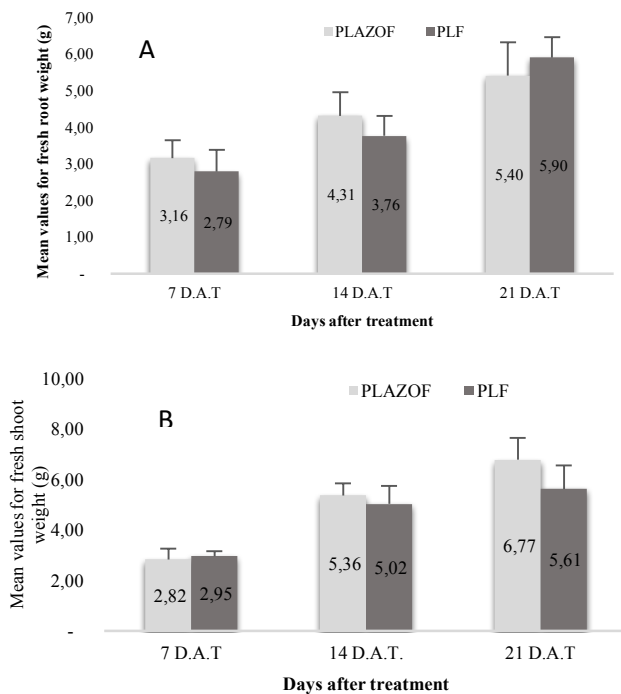
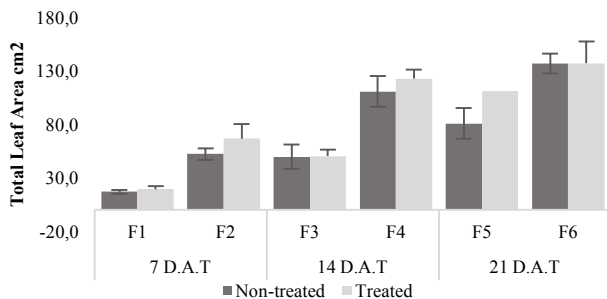


Figure 11 - Maize growth variable total leaf area, after *A. brasilense* FP2 inoculation, collected at 7, 14 and 21 days after treatment. Non-treated and treated, Data are presented as mean \pm SD (n=12)



Discussion

The rhizosphere contains up to 10^{11} microbial cells per gram of root (EGAMBERDIEVA *et al.*, 2008). In general, those microbial cells improve the plant productivity (MENDES *et al.*, 2013). In the coming decades, the academic and industrial communities become more concerned about the future of the planet, and so, safe and eco-friendly methods become the major focus for new sustainable agriculture. In this scenario, the PGPB consists as an important alternative to maintain the high productivity and reduce the use of agrochemical and synthetic fertilizers. Several studies have shown that *A. brasilense* inoculation in plants from *Poacea* family (which englobes cereal crops like maize, rice, sorghum and wheat), potentially improves the development of plants and increases grain production (MEHNAZ e LAZAROVITZ, 2006; Hungria *et al.*, 2010; MEHANZ *et al.*, 2010).

In addition to the benefits of diazotrophic bacteria, in several studies the PGPB was observed as a potential tool for disease control, protecting plants against phytopathogens attack (GUERRERO-MOLINA *et al.*, 2015). Some of this study used *Pseudomonas* species against a large spectrum of pathogens (LIU *et al.*, 1995; NANDAKUMAR *et al.*, 2001; ELBADRY *et al.*, 2006; CABANAS *et al.*, 2014; PATIL *et al.*, 2016; YASMIN *et al.*, 2016), including *Colletotrichum* genera (GANG *et al.*, 1991; VISWANATHAN e SAMIYAPPAN, 1999; 2002; PLANCHAMP *et al.*, 2015), and even *C. graminicola* specie in maize (PLANCHAMP *et al.*, 2015).

Although many studies have shown that PGPB are effective to promote plant development and control diseases, in this study these results were not found. In addition, *A. brasilense* do not colonized successfully the maize in both experiments conducted in greenhouse condition. Bashan *at. Al.*, (2004) says that the success of interaction depends on several factors as concentration of *A. brasilense* on seeds, active motility, bacterial survival, adsorption to soil particles, as well as competition with other microorganisms in the rhizosphere. Moreover, other factors may also affect the colonization and survival of this bacterium, such as environmental factors, weather conditions, different types of soils, cultivars and strains (BASHAN *et al.*, 2004; DE OLIVEIRA *et al.*, 2006; COMPANT *et al.*, 2010; HUNGRIA *et al.*, 2010; MOUTIA *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2013). El-Komy *et al.*, (1998) shows that different responses can be obtained when the same strain is applied in different maize genotypes. According to that, Montañez *et al.*

(2009), demonstrating that the levels of PGPB varied among ten different cultivars, with values starting at 12% until 33% of the total N of the plant.

Facing the failure of 20A55 maize colonization by *A. brasilense* FP2 in greenhouse condition, an in vitro assay was carried out to confirm this. However, the in vitro result showed *A. brasilense* colonization in the two maize cultivars tested. This indicates that the unsuccessful bacterial colonization in cultivar 20A55 in greenhouse condition comes from another source instead of the maize genotype.

Trying to explain the failure of *A. brasilense* FP2 maize colonization in greenhouse condition obtained in this experiment we can raise some hypothesis. One hypothesis could be the competition with other microorganisms present in the soil microbiota, once de colonization depends on several factors, including the type of soil and the microbiota that surround the rhizosphere (BASHAN *et al.*, 2004). The soil used in these assays was not sterilized and was collected from a place with a large variety of plants growing on it before. This could result in a high range of organisms that could compete with *A. brasilense* by the same niche in maize roots. The other microorganisms also could be releasing antagonistic compounds in the rhizosphere, which could prevent the survival of *A. brasilense* in the soil and would result in the bacterial non-colonization. Another hypothesis we can raise relates to the soil Ph. (KAVADIA *et al.*) Kavadia says that an acid soil may hinder the plant root colonization by the bacterium *Azospirillum brasilense*. Since this soil has a pH of 5.4 we can imply that this is a factor that made difficult the root colonization for the bacteria.

Related to the cultivar interaction, we could not say that *A. brasilense* has no affinity with the cultivar 20A55, because in the in vitro experiment a great colonization was achieved (10^8 bacterial DNA copy number/g root) for both cultivars tested (20A55 and DKB 390). DKB 390 was previously tested for our research group and positive results were found for growth variables.

In the meantime, a relevant result was found in this assay. When the tolerance test for *C. graminicola* pathogen was conducted with two different cultivars of maize (P30F53 and 20A55), the cultivar used in this study shown a potential tolerance to the pathogen attack, since the percentage of severity for the 20A55 variety was 45% while the P30F53 variety presented 76% of disease damage. More experiments should be done to improve a possible basal resistance of this cultivar to the *Colletotrichum graminicola* attack.

As the success of colonization by PGPB depends greatly on biotic and abiotic interactions, these themes need to be constantly studied. Although many studies have been done, much work remain to be done. Molecular studies are fundamental and extremely important to solve future doubts. The findings that arise during this studies and trials may provide insights about diazotrophic communities.

Conclusion

In this study *A. brasilense* FP2 do not colonized successfully 20A55 maize cultivar in non-sterile growth condition, but effectively colonized this cultivar in vitro, when quantificated by qPCR. There are several assays and studies which demonstrate the benefits of *A. brasilense* FP2 in many maize cultivars. Also, it was also not possible to observe the biocontrol activity of the PGPB against the fungus *C. graminicola* either, due to the colonization failure. At the same time, it is not possible to exclude the possibility of this PGPB to become a potential biocontrol agent, since its activity has already been demonstrated in other plant agronomic varieties.

Acknowledgments

This work was financially supported by the National Institute of Science and Technology-Biological Nitrogen Fixation (INCT-FBN), National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Brazil. Marla Karyne Felippi Barbieri, Aline Martins Cardozo, and Pâmela Dall'Asta were recipients of fellowships from Coordination of Personnel Improvement of Higher Education (CAPES), Ministry of Education, Brazil and Ana Carolina Maisonnave Arisi is recipient of research fellowship (PQ2) from CNPq.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho trouxe mais uma contribuição para os estudos com estas bactérias associativas, onde pode-se perceber que, embora o papel desta bactéria já esteja bastante elucidado, a associação com diferentes cultivares ainda não está completamente definida, pois como apresentado, não foi possível a colonização da cultivar de milho 20A55 com *A. brasilense*, em experimento em casa de vegetação, com solo não fértil, devido a algum fator exógeno, advindo das condições de cultivo e o solo utilizado, uma vez que o teste in vitro realizado com a cultivar mostrou que a bactéria colonizou de forma eficaz ambas as cultivares testadas, incluindo a utilizada neste trabalho, no experimento em casa de vegetação.

Relacionado ao teste de tolerância das cultivares podemos dizer que a variedade 20A55 apresentou um possível grau de resistência horizontal ao ataque do fungo *C. graminicola*, se comparado a cultivar P30F53 que apresentou um grau elevado de severidade da doença. Isso não confirma que a cultivar utilizada neste trabalho apresenta resistência ao patógeno, pois a repetição do teste bem como a realização de outros testes mais precisos e complexos devem ser realizados para que se tenha um resultado mais completo, porém, o fato de a cultivar utilizada apresentar um grau de variedade de doença muito inferior a outro cultivar já conhecido. Neste trabalho, embora não se tenha observado a colonização da bactéria, não se pode reduzir sua importância, pois sabe-se que o mecanismo de ação envolvido no crescimento e desenvolvimento das plantas, na colonização das BPCV e no controle biológico de patógenos não é único, e sim, modulado por várias rotas e dirigido pela combinação de mecanismos que podem variar de acordo com a espécie da planta inoculada, com a cepa utilizada, com as condições ambientais e até mesmo o tipo de solo, entre outros fatores. Por isso, o estudo com estas bactérias, bem como sua interação com o meio deve continuar avançando, para que cada vez mais se tenha conhecimentos concretos sobre seu comportamento, utilização e limitações no intuito de continuar a caminhada por práticas agrícolas mais sustentáveis e menos agressivas ao meio ambiente.

6 REFERÊNCIAS

ARDAKANI, M. R. et al. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. **Physiol Mol Biol Plants**, v. 17, n. 2, p. 181-92, Apr 2011.

ARENCIBIA, A. D. et al. *Gluconacetobacter diazotrophicus* Elicits a Sugarcane Defense Response Against a Pathogenic Bacteria *Xanthomonas albilineans*. **Plant Signal Behav**, v. 1, n. 5, p. 265-73, Sep 2006.

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

ASGHAR, H. N. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, n. 4, p. 231-237, Jun 2002.

ASSMUS, B. et al. In Situ Localization of *Azospirillum brasilense* in the Rhizosphere of Wheat with Fluorescently Labeled, rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes and Scanning Confocal Laser Microscopy. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, n. 3, p. 1013-9, Mar 1995.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2637-2643, Jun 2002.

_____. HOW THE PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIUM *AZOSPIRILLUM* PROMOTES PLANT GROWTH-A CRITICAL ASSESSMENT. **Advances in Agronomy**, Vol 108, v. 108, p. 77-136, 2010. ISSN 0065-2113.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental

advances (1997-2003). **Can J Microbiol**, v. 50, n. 8, p. 521-77, Aug 2004.

BENEDUZI, A. et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94-104, Jan 2013.

BENT, A. F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 399-436, 2007.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 478-486, Aug 2012.

BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose - Knowledge to exploit for improved management. **Plant Disease**, v. 83, n. 7, p. 596-608, Jul 1999.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 2, p. 199-209, Aug 2008.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 28, n. 4, p. 1327-50, Apr 2012.

BROEK, A. V. et al. SPATIAL-TEMPORAL COLONIZATION PATTERNS OF AZOSPIRILLUM-BRASIENSE ON THE WHEAT ROOT SURFACE AND EXPRESSION OF THE BACTERIAL NIFH GENE DURING ASSOCIATION. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, n. 5, p. 592-600, Sep-Oct 1993. ISSN 0894-0282.

CABANAS, C. G. L. et al. The biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7 induces systemic defense responses in aerial tissues upon colonization of olive roots. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, Sep 2014. ISSN 1664-302X.

CARVALHO, T. L. G. et al. Nice to meet you: genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-leguminous plants. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 561-574, Apr 2016.

CASSÁN, F. et al. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 12-19, 2009.

CHIEN, S. H. et al. Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 89, n. 2, p. 229-255, Mar 2011. >

COLLMER, A. Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, n. 4, p. 329-335, Aug 1998.

COMPANT, S.; CLEMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, May 2010.

COMPANT, S. et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, Sep 2005.

COTA, L. V. et al. Quantification of Yield Losses Due to Anthracnose Stalk Rot on Corn in Brazilian Conditions.

CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. *Azospirillum* inoculation in pregerminating wheat seeds. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 83-86, Jan 1996.

CRUTE, I. R.; PINK, D. A. C. Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1747-1755, Oct 1996.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, n. 73, p. 37-113, Sep 2012.

DE OLIVEIRA, A. L. M. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1-2, p. 23-32, Jun 2006.

DUNGAIT, J. A. J. et al. Advances in the understanding of nutrient dynamics and management in UK agriculture. **Science of the Total Environment**, v. 434, p. 39-50, Sep 2012.

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

ECKERT, B. et al. Azospirillum doebereinae sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass Miscanthus. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, n. Pt 1, p. 17-26, Jan 2001.

EGAMBERDIEVA, D. et al. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-9, Jan 2008.

EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Endophytic expression of nif genes of Azoarcus sp strain BH72 in rice roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 9, p. 813-819, Sep 1999.

EL-KOMY, H. M. A.; MOHARRAM, T. M. M.; SAFWAT, M. S. A. Effect of Azospirillum inoculation on growth and N₂ fixation of maize subjected to different levels of FYM using 15N-dilution method. In: (Ed.). **Nitrogen Fixation with Non-Legumes: Proceedings of the 7th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes, held 16–21 October 1996 in Faisalabad, Pakistan**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1998. p.49-59.

ELBADRY, M. et al. Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed

bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 113, n. 6, p. 247-251, 2006.

FALEIRO, A. C. et al. Real time PCR detection targeting nifA gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. **Symbiosis**, v. 61, n. 3, p. 125-133, Nov 2013.

FERREIRA, A. S. et al. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 103-108, Oct 2013.

FIGUEIREDO, M. D. V. B. et al. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. In: (Ed.). **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p.21-43.

FLOR, H. H. THE COMPLEMENTARY GENIC SYSTEMS IN FLAX AND FLAX RUST. **Advances in Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine**, v. 8, p. 29-54, 1956.

FUKAMI, J. et al. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **Amb Express**, v. 7, Jul 2017.

GANG, W.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. INDUCTION OF SYSTEMIC RESISTANCE OF CUCUMBER TO COLLETOTRICHUM-ORBICULARE BY SELECT STRAINS OF PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA. **Phytopathology**, v. 81, n. 12, p. 1508-1512, Dec 1991.

GASSMANN, W.; BHATTACHARJEE, S. Effector-triggered immunity signaling: from gene-for-gene pathways to protein-protein interaction networks. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 25, n. 7, p. 862-8, Jul 2012.

GEORGE, P. et al. Multifarious beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* KiSII and *Enterobacter* sp RNF 267 isolated from the rhizosphere of coconut palms (*Cocos*

nucifera L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 109-117, Jan 2013.

GUERRERO-MOLINA, M. F. et al. Physiological, structural and molecular traits activated in strawberry plants after inoculation with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* REC3. **Plant Biology**, v. 17, n. 3, p. 766-773, May 2015.

HAUWAERTS, D. et al. A major chemotaxis gene cluster in *Azospirillum brasilense* and relationships between chemotaxis operons in alpha-proteobacteria. In: (Ed.). **FEMS Microbiol Lett.** England, v.208, 2002. p.61-7.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, Jun 2010.

KAVADIA, A. et al. Dynamics of free-living nitrogen-fixing bacterial populations and nitrogen fixation in a two-prey-one-predator system. **Ecological Modelling**, v. 218, n. 3-4, p. 323-338, Nov 2008.

KREY, T. et al. Effects of long-term phosphorus application and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 55, p. 124-130, Mar-Apr 2013.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. INDUCTION OF SYSTEMIC RESISTANCE IN CUCUMBER AGAINST FUSARIUM-WILT BY PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA. **Phytopathology**, v. 85, n. 6, p. 695-698, Jun 1995.

MACHADO, H. B. et al. EXCRETION OF AMMONIUM BY AZOSPIRILLUM-BRASIENSE MUTANTS RESISTANT TO ETHYLENEDIAMINE. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 549-553, Jul 1991.

MARKS, B. B. et al. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. **Amb Express**, v. 3, 2013.

MARQUES, A. C. R. et al. Biological nitrogen fixation in C-4 grasses of different growth strategies of South America natural grasslands. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 54-62, May 2017.

MATSUOKA, Y. et al. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 9, p. 6080-6084, Apr 2002.

MEHNAZ, S. Azospirillum: A Biofertilizer for Every Crop. In: (Ed.). **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**. New Delhi: Springer India, 2015. p.297-314.

MEHNAZ, S. et al. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1848-1856, Oct 2010.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 3, p. 326-335, Apr 2006.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **Fems Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634-663, Sep 2013.

MONTANEZ, A. et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by N-15 isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, n. 3, p. 253-263, Feb 2009.

MONTEIRO, R. A. et al. Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 175-196, Jul 2012.

MOUTIA, J. F. Y. et al. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1-2, p. 233-242, Dec 2010.

NANDAKUMAR, R. et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, n. 4-5, p. 603-612, Apr 2001.

NAYLOR, V. D.; LEONARD, K. J. SURVIVAL OF COLLETOTRICHUM-GRAMINICOLA IN INFECTED CORN STALKS IN NORTH-CAROLINA. **Plant Disease Reporter**, v. 61, n. 5, p. 382-383, 1977.

NEWMAN, M. A. et al. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, May 2013.

NIU, D. D. et al. The Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 Induces Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Simultaneously Activating Salicylate- and Jasmonate/Ethylene-Dependent Signaling Pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 5, p. 533-542, May 2011.

_____. *Bacillus cereus* AR156 activates PAMP-triggered immunity and induces a systemic acquired resistance through a NPR1- and SA-dependent signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 1, p. 120-125, Jan 2016.

NURNBERGER, T. et al. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 249-266, Apr 2004.

O'CONNELL, R. J. et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9, p. 1060+, Sep 2012.

PARK, J. W. et al. Systemic resistance and growth promotion of chili pepper induced by an antibiotic producing *Bacillus vallismortis* strain BS07. **Biological Control**, v. 65, n. 2, p. 246-257, May 2013.

PASCHOLATI, S. F. et al. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 42, n. 1, p. 37-51, 1993.

PATIL, S. V.; JAYAMOHAN, N. S.; KUMUDINI, B. S. Strategic assessment of multiple plant growth promotion traits for shortlisting of fluorescent *Pseudomonas* spp. and seed priming against ragi blast disease. **Plant Growth Regulation**, v. 80, n. 1, p. 47-58, Sep 2016.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. REGULATION OF NITROGEN-FIXATION (NIF) GENES OF *AZOSPIRILLUM-BRASIENSE* BY NIFA AND NTR (GLN) TYPE GENE-PRODUCTS. **Fems Microbiology Letters**, v. 23, n. 1, p. 95-101, 1984.

PEREZ-MONTANO, F. et al. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiol Res**, v. 169, n. 5-6, p. 325-36, May-Jun 2014.

PLANCHAMP, C.; GLAUSER, G.; MAUCH-MANI, B. Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, Jan 2015. I

RAMAMOORTHY, V. et al.,

_____. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, n. 1, p. 1-11, Feb 2001.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. D. S.; PEDRAZA, R. O. What Is Expected from the Genus *Azospirillum* as a Plant Growth-Promoting Bacteria? In: (Ed.). **Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p.123-138.

RODRIGUEZ, H. et al. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552-5, Nov 2004.

RONCATO-MACCARI, L. D. B. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **Fems Microbiology Ecology**, v. 45, n. 1, p. 39-47, Jul 2003.

ROSCONI, F. et al. Serobactins-mediated iron acquisition systems optimize competitive fitness of *Herbaspirillum seropedicae* inside rice plants. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2523-2533, Aug 2016.

SANDERS, G. M.; KORSTEN, L. A comparative morphological study of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique**, v. 81, n. 8, p. 877-885, Aug 2003.

SCHNABLE, P. S. The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics (November, pg 1112, 2009). **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1040-1040, Aug 2012.

SCHLOTTER, M. et al. Immunological studies of the wheat-root-colonization by the *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245 using strain-specific monoclonal antibodies. In: HEGAZIN, N.; FAYEZ, M., et al (Ed.). Nitrogen Fixation with Non-legumes, 1994. p.290-295.

SHAHZAD, S. M. et al. PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 57, p. 27-34, Jul-Aug 2013.

SILIPO, A. et al. A Unique Bicyclic Monosaccharide from the Bradyrhizobium Lipopolysaccharide and Its Role in the Molecular Interaction with Plants. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 50, n. 52, p. 12610-12612, 2011.

SON, J. S. et al. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against gray leaf spot disease in pepper. **Applied Soil Ecology**, v. 73, p. 1-8, Jan 2014.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin Signaling in *Azospirillum brasilense*: A Proteome Analysis.

STASKAWICZ, B. J. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 73-76, Jan 2001.

STETS, M. I. et al. Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 Bacteria in Wheat Roots by Strain-Specific Quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6700-6709, Oct 2015.

SUKNO, S. A. et al. Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 823-832, Feb 2008.

TORTORA, M. L.; DIAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 4, p. 275-286, Apr 2011.

_____. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 279-290, Jul 2012.

VAN DER BIEZEN, E. A.; JONES, J. D. G. The NB-ARC domain: A novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. **Current Biology**, v. 8, n. 7, p. R226-R227, Mar 1998.

VAN LOON, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 243-254, Nov 2007.

VAN WEES, S. C. et al. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 15, p. 8711-6, Jul 18 2000.

VARGAS, W. A. et al. Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotrichum graminicola* in maize. **Plant Physiol**, v. 158, n. 3, p. 1342-58, Mar 2012.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria against red rot disease in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 1, n. 3, p. 67, 1999.

_____. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, v. 21, n. 1, p. 1-10, Feb 2002.

WANG, S. et al. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. **J Microbiol Biotechnol**, v. 19, n. 10, p. 1250-8, Oct 2009.

WARREN, H. L. et al. OBSERVATIONS OF COLLETOTRICHUM-GRAMINICOLA ON SWEET CORN IN INDIANA. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 2, p. 143-144, 1973.

WISNIEWSKI-DYE, F. et al. Azospirillum Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. **Plos Genetics**, v. 7, n. 12, Dec 2011.

YANG, Y. L. et al. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 123-146, Dec 2009.

YANG, Y. O.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Signal perception and transduction in defense responses. **Genes & Development**, v. 11, n. 13, p. 1621-1639, Jul 1997.

YASMIN, S. et al. Plant Growth Promotion and Suppression of Bacterial Leaf Blight in Rice by Inoculated Bacteria. **Plos One**, v. 11, n. 8, Aug 2016.

YASUDA, M. et al. Effects of Colonization of a Bacterial Endophyte, *Azospirillum* sp B510, on Disease Resistance in Rice. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 12, p. 2595-2599, Dec 2009.

ZAMIOUDIS, C. et al. Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. **Plant Physiology**, v. 162, n. 1, p. 304-318, May 2013.