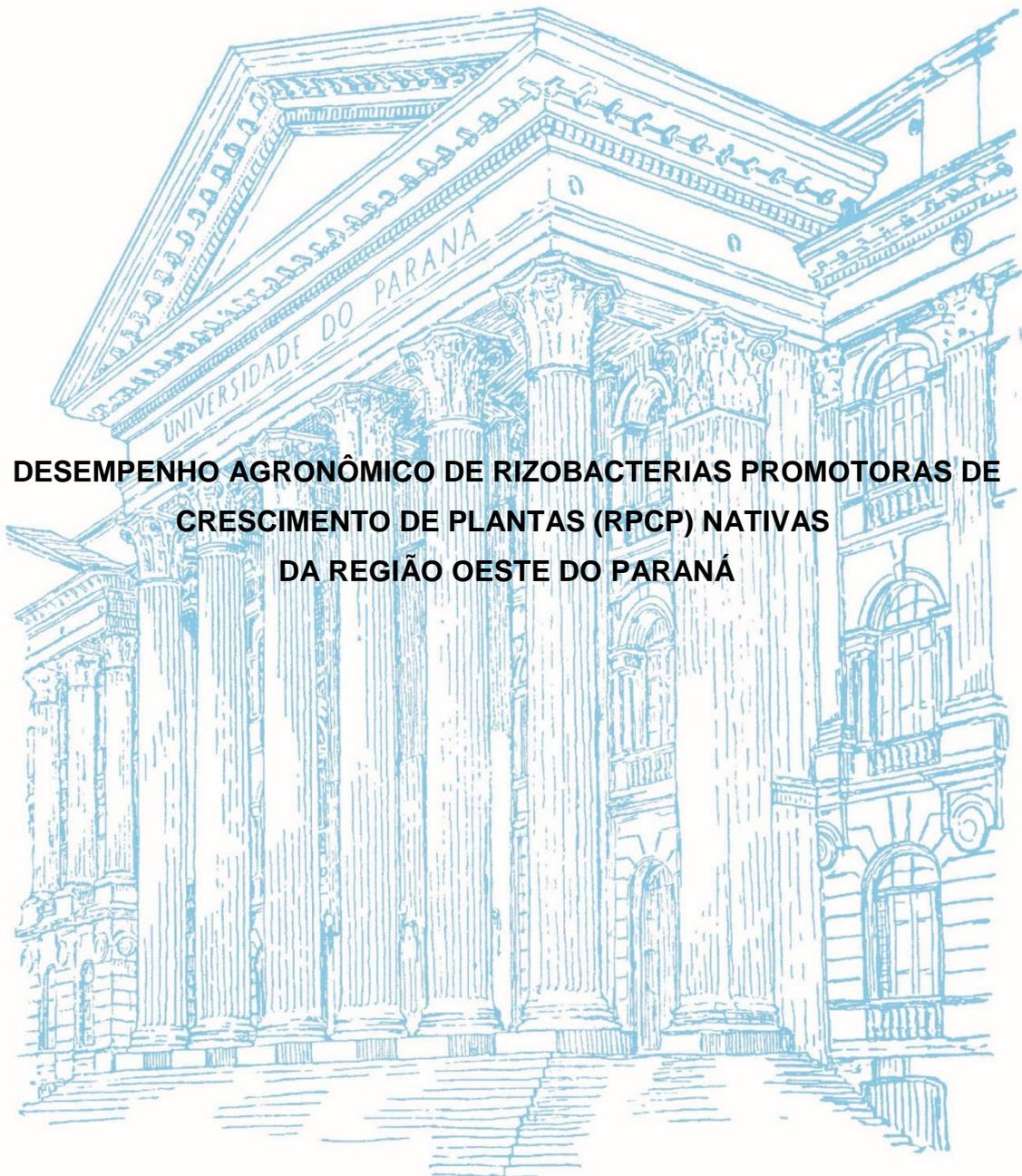


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA FAVETTA



**DESEMPENHO AGRONÔMICO DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS (RPCP) NATIVAS
DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ**

PALOTINA

2016

AMANDA FAVETTA

**DESEMPENHO AGRONÔMICO DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS (RPCP) NATIVAS
DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Agronomia da
Universidade Federal do Paraná – Setor
Palotina como requisito à obtenção do título
de Engenheira Agrônoma.

Orientadora: Profª Drª Luciana Grange.

PALOTINA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO

AMANDA FAVETTA

DESEMPENHO AGRONÔMICO DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS (RPCP) NATIVAS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial à obtenção do título de Engenheira Agrônoma, Curso Agronomia, Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

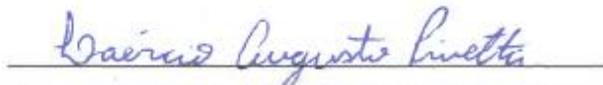


Prof.ª Dra. Luciana Grange.

Orientadora – Departamento de Ciências Agrárias - UFPR Setor Palotina.



Prof.ª Dra. Vivian Carré Missio – Departamento de Ciências Agrárias - UFPR
Setor Palotina.



Prof. Dr. Laércio Augusto Pivetta – Departamento de Ciências Agrárias - UFPR
Setor Palotina.

Palotina, 06 de julho de 2016

*A minha família, a Angelo e Lúcia Vendruscolo, e a todos os amigos que
contribuíram com a realização deste trabalho.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Pai pelas inumeráveis bênçãos durante o curso.

A meus avós de Palotina, que me acolheram como a uma neta de sangue, Ângelo e Lucia Vendruscolo, obrigada por tudo.

A minha família, Valentin, Neli, Vagner, William, João Marcos, Ana Maria, Ana Clara, Ana Luiza, pelo apoio e pela contribuição de cada um na minha história.

A minha tia Luzia Aparecida Favetta e minha prima favorita Kennya, pelo exemplo e incentivo.

Aos meus amigos que caminharam comigo durante o curso e que levarei comigo para o resto da vida, de maneira especial Katle, Vanessa, Wesler e Mirian.

Aos irmãos do Fixtec que trabalharam comigo na execução do experimento.

A todos os meus professores antes da graduação, em especial a Rosa, Rosana, Bete e Silvana. E aos professores da graduação, em especial a professora Vivian, Alessandra e Ivonete.

Ao Professor Marco Antônio Bacellar Barreiros.

A minha Orientadora e mãe acadêmica Professora Luciana Grange.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

Quanto mais difícil, melhor!

FIXTEC

“Usted joven, tiene la Fuerza. Coraje!”

Kiko Argüello.

RESUMO

Uma das alternativas a fim de diminuir a necessidade de adubação nos diferentes sistemas agrícolas é o uso de produtos biológicos a base de microrganismos. Neste sentido, a tecnologia de inoculantes bacterianos vem inovando na elaboração de produtos mistos que consistem em adicionar mais de um microrganismo reconhecidamente benéfico às plantas, visando maximizar a contribuição dos mesmos. Esta técnica chamada de coinoculação vem comprovando vários benefícios principalmente em relação ao aumento de sistemas radiculares. O presente trabalho se propôs a testar estirpes bacterianas nativas isoladas de solos da região oeste do Paraná coinoculadas com padrão de *Azospirillum*. O objetivo foi avaliar estes isolados quanto ao potencial biotecnológico como bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) utilizando o milho como planta modelo. As bactérias nativas foram obtidas da coleção do laboratório de biologia do solo da UFPR Setor Palotina. Os tratamentos foram arranjados utilizando 40 estirpes selecionadas da coleção, uma estirpe padrão de *Azospirillum brasiliense* e um controle não inoculado. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, onde, cada plântula teste foi coinoculada com 0,5 mL de meio contendo a estirpe nativa mais 0,5 mL de meio com *Azospirillum*. A concentração das estirpes foi estabelecida a partir da leitura de absorvância a comprimento de onda 540 com absorvância mínima de 0,5. Após sessenta dias, as plantas foram retiradas para avaliação dos aspectos agrônômicos: crescimento de parte aérea e radicular. 22 estirpes destas bactérias coinoculadas foram comparadas quanto a produção da AIA e eficiência na solubilização de fosfato. As bactérias que apresentaram melhor desempenho em relação à altura de planta e crescimento radicular foram as 203 e 493, do gênero *Enterobacter* e a 208 do gênero *Delftia*. Não foi possível apontar as vias da produção de AIA e da solubilização de fosfato como sendo os mecanismos mais utilizados pelas estirpes candidatas deste trabalho. Novos testes precisam ser conduzidos a fim de confirmar o potencial destas bactérias enquanto BPCV com outras plantas modelo. O presente trabalho considera a coinoculação uma tecnologia alternativa que pode potencializar a resposta da cultura do milho a FBN e/ou a PCV.

Palavras-chave: *Azospirillum*; *Enterobacter*; milho, coinoculação

ABSTRACT

One of the alternatives in order to reduce the need for fertilization in different agricultural systems is the use of biological products based on micro-organisms. In this purpose, the technology of bacterial inoculants comes innovating in the development of mixed products which consist in adding more of a micro-organism known to be beneficial to plants, in order to maximize its contribution. This technique called co-inoculation has been proving many benefits especially in relation to the increase of root systems. This study aimed to test native bacterial strains isolated from soils of Western Paraná co-inoculated with standard strain *Azospirillum*. The objective was to evaluate the biotechnological potential of these isolates as plant growth-promoting bacteria (PGPB) using maize as a model plant. Native bacteria were obtained from the collection of the laboratory of soil biology in the UFPR Palotina Sector. The treatments were carried out using 40 selected strains from the collection, a standard strain of *Azospirillum brasiliense* and a not inoculated control. The experiment was conducted in a greenhouse in completely randomized design with three replications, in which each seedling test was co-inoculated with 0.5 mL containing the native strain plus 0.5 mL with *Azospirillum*. The concentration of the strains was established from the wavelength 540 with absorbance of at least 0.5. After 60 days, the plants were harvested to evaluate the agronomic aspects: shoot and root growth. 22 strains of these co-inoculated bacteria were compared for the AIA production and efficiency in phosphate solubilization. Bacteria that presented better performance in relation to the height of plant and root growth were the strains 203 and 493, from genus *Enterobacter* and 208, from genus *Delftia*. It has not been possible to confirm the production of AIA and phosphate solubilisation as the mechanisms of plant growth promotion by strains assayed in this work. New tests need to be conducted to confirm the potential of these bacteria while PGPR with other plants as model. This work considers the co-inoculation technology an alternative that can enhance the response of maize culture to the BNF and/or PGP.

Keyword: *Azospirillum*; co-inoculation; plant growth promoting bacteria.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MEDIAS DAS SOMAS DE ALTURA E CRESCIMENTO RADICULAR DE PLANTULAS DE MILHO COINOCULADAS COM RIZOBACTÉRIAS NATIVAS E AZOSPIRILLUM	19
FIGURA 2 – DESEMPENHO DE CRESCIMENTO DE PLANTA, PRODUÇÃO DE AIA E EFICIENCIA DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS.	21
IMAGEM 1 - VASOS E ESTRUTURA DA CASA DE VEGETAÇÃO.	32
IMAGEM 2 – ADAPTAÇÃO DE VASOS DE LEONARD.	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO REFERENCIADA	10
2	OBJETIVO	15
3	METODOLOGIA	16
3.1	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS	16
3.2	PREPARO DOS VASOS, SUBSTRATO E SOLUÇÃO NUTRITIVA	16
3.3	PREPARO DAS SEMENTES	17
3.4	PREPARO DOS ISOLADOS E COINOCULAÇÃO COM <i>AZOSPIRILLUM</i> 17	
3.5	ASPECTOS AGRONÔMICOS AVALIADOS	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1	DESEMPENHO NO CRESCIMENTO DE PLANTA	19
4.2	COMPARAÇÃO COM DADOS DE PRODUÇÃO DE AIA E EFICIENCIA DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS	20
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
	REFERÊNCIAS	26
	APENDICE 1 - FOTOS DO EXPERIMENTO	32

1 INTRODUÇÃO REFERENCIADA

Segundo o IBGE (2015), a safra de grãos no Brasil entre os anos de 2013-2015, teve um aumento de 192,8 para 202,9 milhões de toneladas, um crescimento de 5,2%. Este constante aumento da produção brasileira vem exigindo cada vez mais o uso de fertilizantes. Estimativas da ANDA - Agência Nacional para Difusão de Adubos (2015), mostram que em 2013, dos fertilizantes utilizados no Brasil, 70,4% eram importados e, esse valor subiu para 74,6% em 2014, em 2015 a importação de fertilizantes atingiu 75,9% do total utilizado nas lavouras. Na busca por alternativas que diminuam a necessidade de fertilizantes, o uso de microrganismos capazes de promover o crescimento de plantas tem sido uma das principais biotecnologias alçadas pelo setor de produção de grãos (HUNGRIA, 2011).

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas principalmente como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (MYERS, 1996). Apesar de sua grande importância, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza (PACE, 1997). Dentre estes, se destacam as bactérias diazotróficas, organismos edáficos que desempenham funções essenciais no processo de ciclagem de nutrientes e podem favorecer o desenvolvimento vegetal (AZEVEDO, 2010).

Segundo Evans & Burris (1992), as bactérias diazotróficas podem ser classificadas em três grupos: bactérias de vida livre, que fixam o nitrogênio para o seu próprio uso; bactérias associativas, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose; e bactérias simbióticas, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e o microsimbionte e, em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

Bactérias associativas com raízes de plantas também podem ser classificadas de acordo com seus efeitos sobre o crescimento vegetal em: benéficas, deletérias ou neutras (DOBBELAERE et al., 2003). Quando benéficas, as bactérias colonizam o sistema radicular e promovem o crescimento vegetal, sendo denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) – plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) (KUSS, 2006).

A promoção direta do crescimento por PGPRs envolve fornecimento de substâncias promotoras de crescimento vegetal, que são sintetizadas por bactérias ou pela facilitação da absorção de determinados nutrientes de planta do ambiente. Os mecanismos exatos pelos quais estas bactérias promovem o crescimento de planta não são totalmente compreendidos, mas elas podem produzir consideráveis concentrações de reguladores de crescimento de planta como o ácido-indol-acético, giberelinas, citocininas, etileno, aminoácidos, enzimas (GONZALEZ-LOPEZ, 2005), fixação assimbiótica de nitrogênio (BODDEY; DOBEREINER, 1995), solubilização de fosfato mineral e outros nutrientes (DE FREITAS et al., 1997). Já os mecanismos de ação indireta incluem agentes de controle biológico, pois podem suprimir micro-organismos patogênicos na rizosfera, pela produção de β -1,3-glucanase (FRIDLENDER et al., 1993), antibióticos (RAAIJMAKERS et al., 1997), ácido cianídrico (OWEN e ZDOR, 2001) e sideróforos (PIDELLO, 2003).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo biotecnológico mais consagrado na história da agricultura brasileira. Atualmente, nos manejos com inoculação são economizados R\$ 898,00/ha de nitrogênio. Se considerarmos os 27,7 milhões de hectares plantados com soja no Brasil, a economia proporcionada pela não utilização de adubos nitrogenados é da ordem de R\$ 24,9 bilhões anuais, algo em torno de US\$ 10,3 bilhões de dólares (EMBRAPA, 2016). Foi esta tecnologia que alavancou a produção da soja do Brasil para o patamar competitivo em que se encontra.

O N_2 é abundante na natureza, constituindo quase 80% do gás atmosférico. Nenhum animal ou planta é capaz de utilizar o N_2 como fonte de proteína devido a tríplice ligação entre seus átomos, uma das mais fortes na natureza. Bactérias da família *Rhizobiaceae* são indivíduos vivos que conseguem quebrar a tripla ligação pela ação de um complexo enzimático chamado dinitrogenase (MORGANTE, 2003).

A FBN é um processo que permite o fornecimento de nitrogênio na forma mais assimilável pela planta (ALVES, 2007). O potencial de ganho de N via FBN depende da cultura e da variedade plantada. Em leguminosas como soja e feijão, a maior eficiência se dá, entre outros fatores, pela estreita relação estabelecida ao longo da co-evolução entre os envolvidos no processo simbiótico (PARIZOTTO, 2015; ROCHA, 2007; FERREIRA, 2015). Já em culturas como milho, trigo, cana-de-açúcar, arroz e forrageiras a associação é dependente de bactérias de vida livre e/ou endofíticas

facultativas, o que aponta para a necessidade de maiores estudos dos processos evolutivos entre PGPR e gramíneas (DOBBELAERE et al., 1999; MOREIRA, 2014).

Em geral, as plantas da família *Poaceae* (*Gramineae*) são capazes de se associar com diversas espécies de bactérias diazotróficas, dentre essas, acredita-se que as endofíticas sejam as principais responsáveis pela FBN observada em diversas culturas (DÖBEREINER, 1976). Em culturas como a do milho (*Zea mays*, L.), um dos produtos biológicos mais utilizados são inoculantes a base de estirpes selecionadas do gênero *Azospirillum*. As bactérias desse gênero são consideradas diazotróficas endofíticas facultativas, mas tem promovido incremento na produtividade e características agrônômicas desta cultura (ARAÚJO, 2014; PORTUGAL et al. 2012; BASI, 2013; DARTORA et al. 2013).

Além da FBN, existem outros mecanismos metabólicos envolvidos com o crescimento e proteção de plantas. A produção de reguladores e/ou fitormônios, por exemplo se destacam, pois, além da promoção do crescimento vegetal também podem alterar mecanismos fisiológicos da planta hospedeira, beneficiando a colonização bacteriana nas diferentes culturas (OLIVEIRA, 2009). Dentre os principais fitormônios ou reguladores de crescimento vegetal (Plant Growth Regulators – PGRs) estão os grandes grupos das auxinas, citocinas, giberelinas e o grupo dos acetilenos.

Outro mecanismo de ação direta das bactérias promotoras de crescimento vegetal é a solubilização de fosfato no solo. Depois do nitrogênio, o fósforo é o macronutriente que mais limita o desenvolvimento dos vegetais (GYANESHWAR et al., 2002). Os microrganismos solubilizadores de fósforo são responsáveis pela liberação de ácidos orgânicos, como o glucônico, cítrico, glutâmico, oxálico láctico, fumárico, tartárico e succínico, os quais atuam como doadores de prótons e agentes quelantes dos íons Ca, Al e Fe, favorecendo a solubilização do fosfato inorgânico do solo (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

Estudos tem demonstrado que bactérias diazotróficas associadas a gramíneas conseguem se ajustar a um ambiente específico, heterogêneo e variável como a rizosfera. Este ajuste é muito mais dependente da habilidade competitiva e sinérgica dos microrganismos ali presentes do que da simples eficiência de um único indivíduo introduzido. Os ganhos para a planta irão depender das relações bioquímicas e energéticas que serão estabelecidas entre estes microrganismos e os exsudatos liberados pelas raízes e resíduos vegetais disponíveis (LIMA et al., 2011). Além disso, fatores abióticos do meio também influenciam na sobrevivência e

atividade dos microrganismos tais como, temperatura, pH, umidade e concentração de oxigênio do local (KIPE-NOLT et al., 1985).

Neste contexto, estudos vem demonstrando que associações com mais de dois indivíduos de uma mesma espécie e/ou indivíduos de espécies diferentes vem potencializando a atividade biológica de produtos recomendados para culturas de interesse comercial. Esta técnica chamada de coinoculação, ou também denominada de inoculação mista, consiste na utilização de combinações de diferentes microorganismos, aos quais produzem um efeito sinérgico, em que se superam os resultados produtivos obtidos com os mesmos, quando utilizados na forma isolada (FERLINI, 2006; BÁRBARO et al., 2009).

Para milho e trigo, por exemplo, a maioria dos produtos são compostos por duas estirpes de *Azospirillum* conhecidas por Ab-v5 e Ab-v6 (HUNGRIA, 2011). Produtos à base de *Azospirillum brasilense* tem sido preconizados para coinoculação de soja, juntamente com *Bradyrhizobium spp.* tanto na Argentina como na África do Sul (REIS, 2007; GITTI, 2015; BRACCINI et al., 2016). De modo geral, a coinoculação na soja vem potencializando a nodulação e o maior crescimento radicular (FERLINI, 2006). O mesmo autor cita que nos casos onde foi utilizado *A. brasilense*, demonstrou-se que o efeito benéfico da associação se deve, em maior parte, à capacidade que a bactéria tem de produzir fitormônios que determinam maior desenvolvimento do sistema radicular, e, portanto, a possibilidade de explorar um volume mais amplo de solo (FERLINI, 2006; ARAUJO, 2014).

Trabalhos de coinoculação apontam que, o maior benefício obtido pelo uso desta técnica vem sendo o aumento de raízes secundárias bem como de pêlos radiculares (OKON; ITZIGSOHN, 1995; MUÑOZ-GARCIA et al., 1991). São nestas estruturas que acontecem as trocas moleculares mais eficientes entre a rizosfera e/ou os microrganismos com a planta. Os verdadeiros benefícios que a planta obtém a partir do aumento destas partes vegetativas são: melhor absorção de nutrientes do solo; melhor vigor na busca por água entre as galerias de coloides (ARAÚJO, 2008; OKON; VANDERLEYDEN, 1997); oportunidade de obtenção direta de nutrientes por conversão metabólica microbiana (principalmente, nitrogênio e fósforo nas relações simbióticas); obtenção de hormônios de crescimento; biocontrole de fitopatógenos e indução de resistência (SHIOMI, et al. 2015; GARCIA et al., 2015).

O fortalecimento da proposta da coinoculação no uso e aplicação de produtos biológicos associados enquanto técnica de manejo, também se dá devido ao fato de

que, a vida no solo se organiza na forma de comunidade e nichos macro e microbianos. Estas populações edáficas vão se estabelecendo de forma complexa de acordo com suas funções metabólicas, com isso, condicionando os ciclos biogeoquímicos e definindo, ao longo do tempo, o perfil químico e físico dos diferentes solos em constante transformação (PEREIRA, et al., 1999).

O entendimento desta organização é que os membros deste micro-habitat são interdependentes entre si e, alguns deles, das plantas, o que torna estas relações ainda mais intrínsecas (PEREIRA, et al., 1999). Em se tratando da introdução de novos indivíduos a partir da aplicação de produtos biológicos comerciais, é provável que, estirpes nativas e adaptadas àquele solo e suas condições florísticas sejam mais competitivas. Porém se, estabelecida uma proporção populacional microbiana para que haja uma competitividade moderada, pode haver o estabelecimento de um sinergismo saudável com o isolado introduzido sendo estimulado e potencializado em sua proposta biotecnológica (BALDOTTO et al., 2012).

Neste contexto, a busca por estirpes candidatas a serem recomendadas em associação com outros microrganismos consagrados na produção de inoculantes tem se tornado uma alternativa para potencializar os benefícios das estreitas e complexas relações entre plantas e microrganismos.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi analisar estirpes bacterianas nativas de solos da região Oeste do Paraná quanto ao potencial biotecnológico como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), coinoculadas com estirpe padrão *Azospirillum*, utilizando o milho como planta modelo.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS

Os isolados utilizados nesse trabalho fazem parte da coleção de cultura do laboratório de biologia do solo (LABISOL) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina. Estas estirpes foram obtidas de solos de 17 áreas da região Oeste do Paraná submetidos a diferentes sistemas de cultivo e natural.

A seleção dos isolados foi realizada a partir de um “screening” envolvendo etapas de agrupamentos por diversidade morfológica e genética. O agrupamento morfológico foi gerado a partir do programa Past (Paleontological Statistics), pelo uso do algoritmo UFGMA e cálculo da distância RANK, com ponto de corte de 70% de similaridade. Os estudos de diversidade genética foram realizados a partir das técnicas de BOX-PCR, ARDRA-PCR e sequenciamento do gene 16S.

Dentre os gêneros encontrados estão as bactérias: *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Delftia*, *Pantoea* e *Rhizobium*. De uma coleção de 400 isolados, 22 estirpes foram escolhidas para testes de produção de ácido indol acético (AIA) e eficiência na solubilização de fosfato (ESF). Além dessas 22, mais 18 estirpes foram escolhidas para as avaliações agrônômicas com diferentes plantas modelo. Neste trabalho, a planta escolhida foi o milho. Os dados de AIA e ESF dados foram utilizados em um teste comparativo na busca por apontar se a promoção de crescimento das plantas de milho pode ter sido ou não pela utilização destes compostos microbianos.

3.2 PREPARO DOS VASOS, SUBSTRATO E SOLUÇÃO NUTRITIVA

Os vasos foram confeccionados com garrafas descartáveis do tipo pet, tendo como base o modelo de modificação de vasos de Leonard proposto pela Embrapa (SANTOS, 2009). Foram utilizadas garrafas de 2 litros, sem tampa, cortadas a aproximadamente 14 cm da base. As duas partes das garrafas foram lavadas para retirada dos resíduos e, em seguida desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% em um tanque onde ficaram submersas por 1 hora, depois foram enxaguadas com água destilada. Às bocas das garrafas foram amarradas duas compressas de gaze de forma que cobrissem a abertura, a parte de cima das garrafas foram invertidas e encaixadas sobre a base. Os vasos foram envolvidos com papel kraft para proporcionar a

condição de escuro da rizosfera para a formação das raízes. O substrato utilizado foi composto por areia lavada e carvão vegetal moído (em substituição do substrato de areia lavada e vermiculita) na proporção 1:1 (SANTOS,2009). Este foi autoclavado em sacos de polietileno durante 20 minutos a 121°C para esterilização e deixado esfriar dentro dos sacos para depois serem depositados nos vasos.

A solução nutritiva de Hoagland e Arnon foi preparada e modificada para ficar sem N mineral contendo, por litro: 147,05 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 68,05 g de KH_2PO_4 ; 3,67 g de Fe-EDTA; 61,65 g de MgSO_4 ; 43,50 g de K_2SO_4 ; 0,169 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,124 g de H_3BO_3 ; 0,144 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,050 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,028 g de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0553 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MACHADO et. al., 1998a). Esta solução foi colocada na base do vaso no momento da semeadura e repostada a cada dois dias, ou conforme necessário, de forma que a compressa de gaze permanecesse completamente submersa.

3.3 PREPARO DAS SEMENTES

As sementes de milho foram desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 2%, lavadas em água destilada semeadas imediatamente. Cada vaso recebeu quatro sementes e, após a germinação foi realizado um desbaste deixando apenas uma planta por vaso.

3.4 PREPARO DOS ISOLADOS E COINOCULAÇÃO COM *AZOSPIRILLUM*

As estirpes coletadas assim como o *Azospirillum*, foram colocadas em meio tipo DYGS líquido (glicose, peptona e extrato de levedura), (RODRIGUEZ NETO et al., 1986) para crescimento em banho maria agitador a 27°C durante 72 horas. A concentração das estirpes foi estabelecida a partir da leitura de absorbância a comprimento de onda 540 com absorbância mínima de 0,5. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado.

O experimento contou com 42 tratamentos compostos por 40 estirpes nativas, um isolado padrão de *Azospirillum* e um controle somente com solução nutritiva, todos conduzidos com três repetições. Os 40 tratamentos receberam 0,5 ml de meio de cultura contendo uma estirpe selecionada mais 0,5 ml de meio de cultura contendo *Azospirillum*. Os dois controles foram: dose cheia (1mL) apenas de *Azospirillum* e,

sem inoculação. A coinoculação foi feita após a emergência completa das plântulas (10 dias após a emergência), as soluções contendo meio de cultura e bactérias foram administrados ao solo próximo a inserção do caule das plântulas.

3.5 ASPECTOS AGRONÔMICOS AVALIADOS

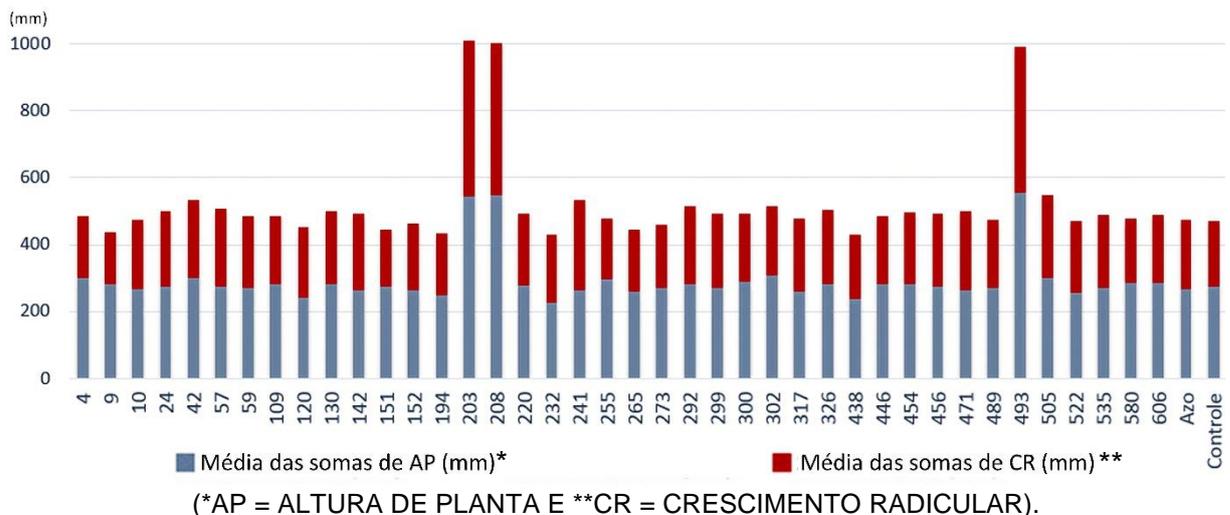
Após 60 dias a partir do plantio, as plantas foram removidas dos vasos e medidas quanto ao comprimento da parte aérea e radicular. O comprimento da parte aérea foi obtido a partir da medição da inserção do caule até a ponta da folha mais alta, e o comprimento da parte radicular através da medição da inserção das raízes até a ponta da raiz mais longa. Neste momento também foi pesada a massa fresca das partes aérea e radicular separadamente. Em seguida, estas partes vegetais colocadas para secar em estufa com circulação de ar a 60°C por 72 horas para posterior pesagem de massa seca. A análise dos dados das 22 estirpes, envolvendo produção de AIA e solubilização de fosfato foi realizada pelo programa Bionumerics e a análise de agrupamento para as sequências do gene da fração 16s DNA ribossomal foi feita pelo algoritmo de Neighbour joining.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESEMPENHO NO CRESCIMENTO DE PLANTA

A massa fresca e massa seca, tanto de parte aérea quanto do sistema radicular, não apresentaram diferença significativa para nenhuma das estirpes testadas nem para as repetições inoculadas somente com *Azospirillum*. Porém, para os valores de comprimento da planta inteira, se destacaram três estirpes, os isolados 203, 208 e 493, promovendo crescimento das plântulas de milho (FIGURA 1). Apesar de não apresentarem diferença estatística, as plantas de milho coinoculadas com esses isolados, obtiveram aproximadamente o dobro de altura de planta e crescimento radicular quando comparadas com as demais.

FIGURA 1 - MÉDIAS DAS SOMAS DE ALTURA E CRESCIMENTO RADICULAR DE PLANTULAS DE MILHO COINOCULADAS COM RIZOBACTÉRIAS NATIVAS E *AZOSPIRILLUM*



Observou-se que o desempenho do controle inoculado com a dose cheia de *Azospirillum* não se diferenciou do controle sem inoculação, nem das estirpes coinoculadas. Fugindo da hipótese que que o controle inoculado com *Azospirillum* obtivesse um desempenho maior que o controle sem inoculação e menor que na coinoculação. A explicação para isso é que o *Azospirillum* é um endofítico facultativo, podendo assim se associar ou não ao milho (VINHAL-FREITAS; RODRIGUES, 2010). Nos estudos de Sangoi et al. (2015) e Zuffo (2015), a inoculação com *Azospirillum* também não influenciou no desempenho do milho. Discordando dos dados de Cavallet

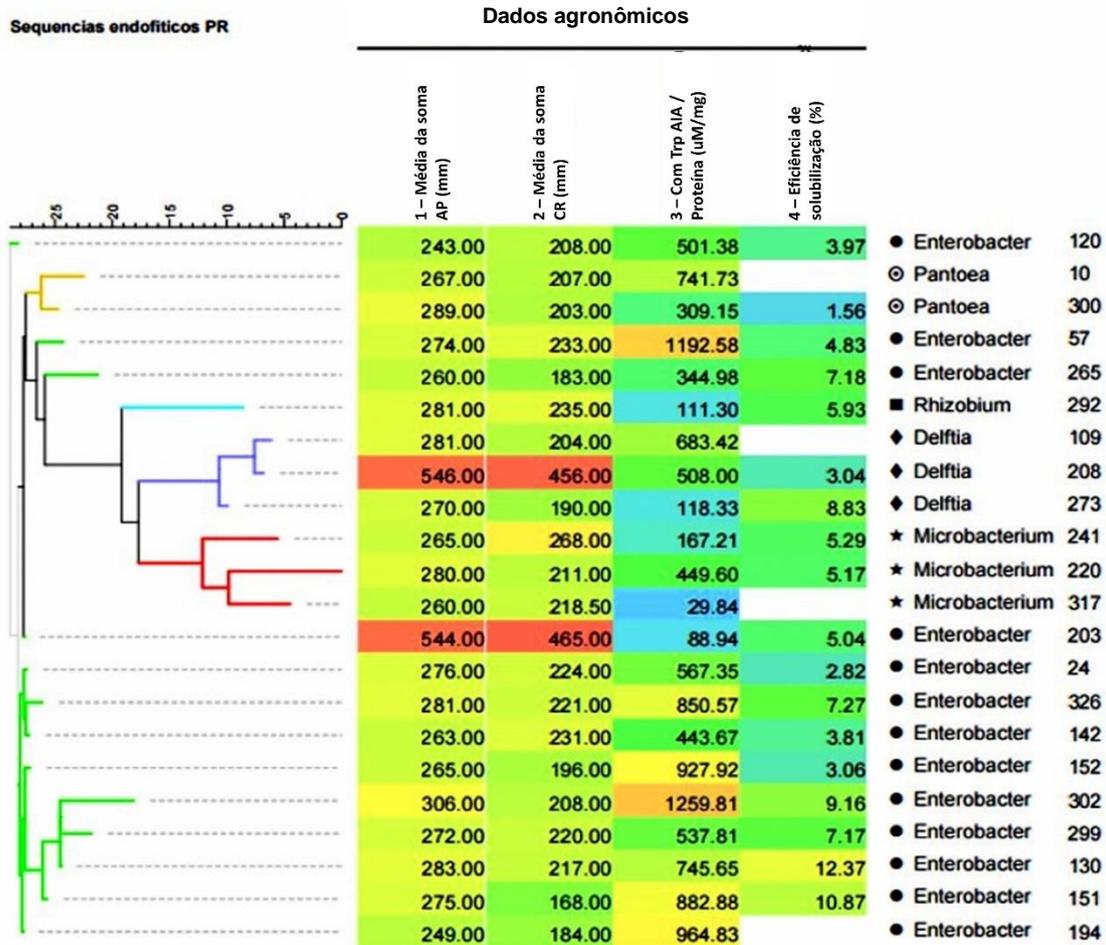
et al. (2000) e Hungria (2011), que obtiveram ganhos de produtividade na ordem de 17 e 9 %, respectivamente, com o uso da bactéria *Azospirillum spp.* em milho.

Por outro lado, pode-se levantar duas hipóteses para o bom desempenho das três estirpes que se destacaram, a primeira é que estas são superiores as demais para produção de crescimento, a segunda que a coinoculação com *Azospirillum* tenha causado um efeito sinérgico promovendo o crescimento no milho quando as duas bactérias foram associadas. Vários trabalhos também mostram a eficiência da coinoculação de *Azospirillum* com outras BPCP. Carreira et al. (2012) observaram em seu trabalho que a dose ideal de N em cobertura para o milho com inoculação foi de aproximadamente 90% da dose recomendada, podendo variar até 95% sem perda significativa na produtividade ou do efeito de *A. brasilense*. No trabalho de Bárbaro et al. (2009) os rendimentos de soja com uso de coinoculante turfoso a base de *A. brasilense* foi maior do que com uso de adubação nitrogenada. Dartora et al. (2013) obtiveram incrementos no diâmetro basal do colmo de 15%, além de bons ganhos com a matéria seca de parte aérea e produtividade de grãos nos tratamentos com inoculação combinada das estirpes de *A. brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em milho. Silveira (2008) também observou a eficiência de outras espécies de BPCP, como é o caso de isolados que promoveram acúmulo de massa seca e raízes laterais no arroz sob solução nutritiva em 30 dias de cultivo. Até mesmo em abacaxizeiro, Baldotto et al. (2010) constataram que a inoculação com estirpes de BPCP promoveram incrementos nas características de crescimento da parte aérea, do sistema radicular e nos conteúdos foliares de N, P, K, Ca e Mg do abacaxizeiro durante a aclimatação.

4.2 COMPARAÇÃO COM DADOS DE PRODUÇÃO DE AIA E EFICIENCIA DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS

Com objetivo de identificar a via metabólica mais utilizada pelas estirpes deste trabalho quanto aos aspectos agronômicos avaliados, dados de produção de AIA e eficiência de solubilização de fosfato, foram obtidos de outro trabalho da equipe para 22 das 40 estirpes testadas. Estes valores serviram para apontar e discutir qual ou quais vias as bactérias candidatas podem ter utilizado para promover o crescimento das plântulas de milho.

FIGURA 2 – DESEMPENHO DE CRESCIMENTO DE PLANTA, PRODUÇÃO DE AIA E EFICIÊNCIA DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS.



1. MÉDIA DAS SOMAS DA AP (ALTURA DA PLANTA) EM MILIMETROS; 2. MÉDIA DAS SOMAS DO CR (COMPRIMENTO DA RAIZ) EM MILIMETRO; 3. OBTENÇÃO PELO MÉTODO DE BRADFORD (1976) A PARTIR DA PRODUÇÃO DE TRIPTOFANO PELO EMPREGO DA SOLUÇÃO DE SALKOWSKY EM µM/mg (DADOS NÃO PUBLICADOS). 4. OBTENÇÃO PELO USO MEIO PIKOVSKAYA MODIFICADO PARA A QUANTIFICAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE FERRO PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO AZUL DE MOLIBDÊNIO EM PORCENTAGEM (DADOS NÃO PUBLICADOS).

Dentro do gênero *Enterobacter*, os isolados 57, 152, 302 e 194 foram os que obtiveram produção de AIA superior a 900 µM mg⁻¹. Destes, o de melhor eficiência para solubilização de fosfatos (ESF) foi a estirpe 302. Os dois valores mais altos de ESF foram obtidos pelas *Enterobacter* 130 e 151. Estes dois isolados também obtiveram valor de produção AIA alto, porém não influenciaram no tamanho das plantas. Deste gênero o único isolado que se destacou tanto no crescimento radicular como de parte aérea foi o 203, com valores similares ao 208 do gênero *Delftia*. O isolado 203 obteve um valor para ESF considerado médio quando comparado com os

isolados do mesmo gênero, porém seu valor para produção de AIA foi o menor dentro do gênero, e segundo menor entre todos as estirpes analisados.

Para o gênero *Pantoea*, o isolado 300 não se destacou em nenhum aspecto e o isolado 10 apresentou produção de AIA de 741,73 $\mu\text{M mg}^{-1}$, mas não promoveu crescimento considerável. O gênero *Rhizobium* (isolado 292) não se destacou em nenhum dos aspectos avaliados em relação ao crescimento vegetal. Os isolados do gênero *Microbacterium* obtiveram valores similares de altura de planta e crescimento radicular.

Dentro do gênero *Delftia*, o isolado 109 apresentou valor considerado bom para produção de AIA comparado com os demais, porém isso não influenciou no crescimento. Já o isolado 208 proporcionou praticamente o dobro de altura de planta e mais que o dobro de crescimento radicular quando comparado aos dois outros isolados do mesmo gênero. Ainda vale ressaltar que quando comparados os dados de AIA, o isolado 208 tem uma produção superior ao 273, porém inferior ao 109, e sua ESF é inferior à do 273, mostrando que essas as vias não podem ser apontadas como responsáveis pela promoção de crescimento.

Alguns estudos apontam que a produção de AIA via microrganismos deve ser fornecida numa concentração específica para cada tipo de planta, isso se deve porque, muitos vegetais são grandes produtores de ácido indol-ácetico, portanto, não necessitam do composto produzido pelas rizobactérias. O que envolve este contexto é que, se há a presença destes microrganismos produtores da AIA no solo, há uma tendência de as plantas reduzirem a sua produção com o objetivo de economizar energia (TAIZ & ZEIGER, 2004). Cada planta responde de maneira diferenciada a concentrações de AIA, mas de um modo geral, as respostas seguem uma curva, na qual a partir de um ponto o aumento na concentração de AIA passa a ser prejudicial ao crescimento, como visto por Muniz et al. (2015), onde a partir da dose 2000 mg Kg^{-1} , houve uma redução no número de raízes em estacas de tango. Titon et al. (2003) também observaram diminuição no enraizamento e sobrevivência de mudas de *Eucalyptus grandis* nas doses mais altas. Neste trabalho não foi possível avaliar a ESF das estirpes como um mecanismo de promoção de crescimento pois o fósforo necessário para o desenvolvimento do milho já estava em solução.

Dentre todas as estirpes testadas, os isolados 203 e 493 pertencentes ao gênero *Enterobacter*, e o isolado 208 pertencente ao gênero *Delftia* foram os que obtiveram o melhor desempenho tanto em altura de planta como em crescimento

radicular. A estirpe 208 (*Delftia*) foi considerada a melhor candidata entre os isolados candidatos a associação do *Azospirillum* para a cultura do milho por ter valores de produção de AIA e ESF considerados bons. Porém, pela quantidade de produção e eficiência dos compostos bioquímicos analisados, não foi possível apontar se estas estirpes utilizam a via de produção de AIA e/ou a via de atividade da fosfatase para promover o crescimento.

Ainda assim, os resultados encontrados neste trabalho também precisam ser ponderados em relação ao papel do *Azospirillum* na coinoculação na cultura do milho. Como o solo deve ser considerado um “corpo único” e em constante atividade metabólica, os diferentes microrganismos responsáveis pela composição desta parte viva tendem a regular a composição populacional que compõem a matéria orgânica para regularem a composição deste solo em constante formação. Este ajuste populacional tem por objetivo maior o equilíbrio bioquímico energético deste “corpo” ou melhor de micro-habitat (ZILLI et al., 2003).

Portanto, a associação com a estirpe *Azospirillum* também pode não estar facilitando a definição clara do papel dos associativos no potencial da promoção do crescimento. O *Azospirillum* é um endofítico facultativo, portanto, nem sempre ele está realizando a promoção de crescimento da planta por fornecimento de N, apesar dos inoculantes serem comercializados como FBN (VINHAL-FREITAS; RODRIGUES, 2010). Esta bactéria só estabelece simbiose se não houver na rizosfera os compostos necessários e na quantidade suficiente para seu ciclo de vida. Quando associadas à rizosfera das plantas podem contribuir com a nutrição nitrogenada dessas plantas (OKON; VANDERLEYDEN, 1997). Além disso, há relatos de liberação de AIA, citocininas e giberilinas por essas bactérias (TIEN et al., 1979) e tolerância a agentes patogênicos, devido inclusive a melhorias na estrutura radicular das plantas (CORREA et al., 2008). Segundo Bashan et al. (2006) o uso de *Azospirillum* proporcionou incremento em vários pigmentos fotossintéticos, que resultariam em plantas mais verdes e mais tolerantes a estresse hídrico.

Vale ressaltar que na literatura são relatados ganhos com o uso de *Azospirillum*. Reis Junior et. al. (2008) relataram que a inoculação com *A. amazonense* promoveu maior produção de matéria seca e acúmulo de N nas raízes. Em seu trabalho, Cavallet et al. 2000, constatou que a inoculação com *Azospirillum spp.* causou aumento significativo na produtividade de grãos de milho, de 5211 kg ha⁻¹ para

6067 kg ha⁻¹, ou seja, aumento médio de 17%, além do aumento no comprimento médio das espigas de milho, de 13,6 para 14,4 cm, ou seja, aumento médio de 6%.

Sendo assim, para se estabelecer as boas associações microbianas a serem recomendadas para a técnica de coinoculação, principalmente em plantas que não estabelecem associação perfeitas, como as simbióticas, será preciso estudar as relações entre os compostos metabólicos envolvidos na promoção de crescimento bem como as proporções dos mesmos em relação a todos os membros efetivos da comunidade rizosférica, ao tipo de solo e planta cultivada.

Outros testes precisam ser conduzidos a fim de confirmar o potencial destas bactérias enquanto BPCV com outras plantas modelo além de testes bioquímicos a fim de confirmar qual ou quais vias metabólicas estão sendo utilizadas pelas estirpes nativas selecionadas para contribuir como associativas na promoção do crescimento de plantas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS:

- As bactérias que apresentaram melhor desempenho em relação à altura de planta e crescimento radicular foram as 203 e 493, do gênero *Enterobacter* e a 208 do gênero *Delftia*;
- Não é possível apontar as vias da produção de AIA e da solubilização de fosfato como sendo os mecanismos mais utilizados pelas estirpes candidatas;

REFERÊNCIAS:

- ALVES, G. C. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *herpaspirillum* e *burkholderia* em genótipos de milho. 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). **Instituto de agronomia**, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.
- ANDA – **Associação Nacional para Difusão de Adubos**. Principais Indicadores Do Setor De Fertilizantes. Estatísticas Indicadores, 2015. Disponível em: <<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:g8M5AXJJhOwJ:anda.org.br/index.php%3Fmpg%3D03.00.00+&cd=4&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=BR>> Acessado em: 08/05/2015.
- ARAÚJO R. M. Resposta do Milho Verde à Inoculação com *Azospirillum brasilense* e Níveis de Nitrogênio. **Cienc. Rural**, vol.44, no.9, Santa Maria, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20130355>> Acessado em: 13/05/2015.
- ARAÚJO, S. C. Realidade e perspectivas para o uso de *Azospirillum* na cultura do milho. *Informações Agronômicas* nº 122, 2008. Acesso em 15 abr. 09.
- AZEVEDO, P. T. M. **Minhocas, fungos micorrizícos arbusculares e bactérias diazotróficas em mudas de *Araucaria angustifolia***. Piracicaba. 77p, 2010.
- BALDOTTO, L. E. B. et al. Seleção de Bactérias Promotoras de Crescimento no Abacaxizeiro Cultivar Vitória Durante a Aclimatização. **Rev. Bras. Ciênc. Solo** [online], vol.34, n.2, pp. 349-360. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832010000200008>> Acessado em: 08/05/2015.
- BALDOTTO, E.B.; SILVA, LUIZ,G.S. ; CANELLAS, L.P. ; OLIVARES, F.L. ; BALDOTTO, M.A. Initial growth of maize in response to application of rock phosphate, vermicompost and endophytic bacteria. **Revista Ceres**, v. 59, p. 262-270, (2012).
- BÁRBARO. I.M. et. al. Produtividade da Soja em Resposta à Inoculação Padrão e Co-inoculação. **Colloquium Agrariae**, v. 5, n.1, p. 01-07. DOI: 10.5747/ca.2009.v05.n1.a0040, 2009. Disponível em: <<http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ca/article/viewFile/372/510>> Acessado em: 05/05/2015.
- BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J.J.; LEYVA, L.A.; HERNANDEZ, J.-P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils*, v.42, p.279-285, 2006.
- BASI, S. Associação de *Azospirillum brasilense* e de nitrogênio em cobertura na cultura do milho. - **Universidade Estadual do Centro-Oeste**, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal. Guarapuava, 2013.

BODDEY, R.M., DOBEREINER, J., Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Resolution**, v. 42, p. 241–250, 1995.

BRACCINI, A. L. et. al. Co-Inoculação e Modos de Aplicação de Bradyrhizobium Japonicum e Azospirillum Brasilense e Adubação Nitrogenada na Nodulação das Plantas e Rendimento da Cultura da Soja. **Sci. Agrar. Parana**, Marechal Cândido Rondon, v. 15, n. 1, jan./mar., p. 27-35, 2016. Disponível em: <file:///C:/Users/Amanda/Downloads/10565-50149-1-PB.pdf> Acessado em: 30/06/2016.

CARREIRA, F. S. et. al. Efeito da *Azospirillum brasilense* na Produtividade de Milho no Sudoeste Goiano. **Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Câmpus Rio Verde do IFGoiano**. 06 e 07 de novembro de 2012. Disponível em: <http://rioverde.ifgoiano.edu.br/wp-content/uploads/dppg/resumos/iniciacao/agronomia/Efeito-da-Azospirillum-brasilense-na-produtividade-de-milho-no-sudoeste-goiano.pdf> Acessado em: 04/05/2015.

CAVALLET, L. E. et. al.. Produtividade do Milho em Resposta à Aplicação de Nitrogênio e Inoculação das Sementes com *Azospirillum spp.* **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol.4 no.1 Campina Grande Jan./Apr. 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662000000100024> Acessado em: 04/05/2015.

CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; SORIA, M.A.; DE ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.87-95.

DARTORA, J. et. al. Adubação Nitrogenada Associada à Inoculação Com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na Cultura do Milho. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.** [online]. vol.17, n.10, pp. 1023-1029. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662013001000001> Acessado em: 13/05/2015.

DE FREITAS, J.R.; BANERJEE, M.R.; GERMIDA, J.J.; Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v.24, p. 358–364, 1997.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**. Dordrecht, v.212, p 155-164, 1999.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Physiological aspects of N₂-fixation by a Spirillum from Digitaria roots. Oxford: **Soil and Biology Biochemistry**, v.8, p.45-50, 1976.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. **High lights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years**. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman and Hall, p.1-42, 1992.

EMBRAPA. Fixação Biológica de Nitrogênio. Espaço temático. Brasília – DF, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/nota-tecnica>> Acessado em: 29/06/2016.

FERLINI, H. A. Co-Inoculación en Soja (Glicyne max) con Bradyrhizobium japonicum y Azospirillum brasilense. **Artículos Técnicos** – Agricultura. 2006.

FERREIRA, N. S, et. al. Fixação biológica de nitrogênio em diferentes genótipos de feijão-caupi. **XXXV Congresso Brasileiro de Ciencia do Solo**, Natal - RN, 2015. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/130391/1/CPAF-AP-2015-Fixacao-biologica-de-nitrogenio.pdf>> Acessado em: 30/06/2016.

FRIDLENDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3-glucanase-producing Pseudomonas cepacia. Oxford: **Soil and Biology Biochemistry**, v.25, p.1211-1221, 1993.

GARCIA T. V. et. al. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. PLANT PATHOLOGY. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.82, 1-9, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aib/v82/1808-1657-aib-001262013.pdf>> Acessado em: 03/07/2016.

GITTI, D. C. **Inoculação e Coinoculação na Cultura da Soja**. Tecnologia e Produção, 2015. Disponível em :<http://www.fundacaoms.org.br/base/www/fundacaoms.org.br/media/attachments/186/186/56c302e71a3e62382844703f2d0237089c95649e50143_01-inoculacao-e-coinoculacao-na-cultura-da-soja.pdf> Acessado em: 30/06/2016.

GONZALEZ-LOPEZ, J. et al. Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria. **Amino Acids**, v. 28, p.363–367, 2005.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v.245, p. 83-93, 2002.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo Documentos 325 - **Embrapa Soja Londrina**, PR, 2011. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/download/doc325.pdf>> Acessado em: 04/05/2015.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2015. Disponível em:<<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?busca=1&id=1&idnoticia=2806&view=noticia>> Acessado em: 17/05/2015.

KIPE-NOLT, J. A.; AVALAKKI, U.K., DART, P.J. Root exudation of sorghum and utilization of exudates by nitrogen-fixing bacteria. Oxford: **Soil Biology and Biochemistry**. v. 17, p.859-863, 1985.

KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. Santa Maria. 110p, 2006.

LIMA, R.A.F, DITTRICH, V.A.O., SOUZA, V.C., SALINO, A., BREIER, T.B. & AGUIAR, O.T. Flora vascular do Parque Estadual Carlos Botelho, São Paulo, Brasil. **Biota Neotrop**. 2011.

MACHADO, A.T.; SODEK, L.; DÖBEREINER, J. & REIS, V.M. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesq. Agropec. Bras.**, 33:961-970, 1998^a.

MOREIRA, J. C. F. Milho Safra Submetido à Inoculação Com Bactérias. Diazotróficas Associativas e Doses de Nitrogênio. **Universidade Federal de Mato Grosso**, Instituto de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola. RONDONÓPOLIS – MT, 2014.

MORGANTE, P.G. Fixação biológica e assimilação de nitrogênio. 2003.

MUNIZ, M. A. et. al. Massa fresca de estacas e doses de ácido indolacético no enraizamento de tango. **Universidade Federal de Viçosa (UFV)**, Departamento de Fitotecnia, Viçosa-MG. V. 21, N^o.1, p. 27-32, 2015. Disponível em: <<https://ornamentalhorticulture.emnuvens.com.br/rbho/article/viewFile/772/553>> Acessado em: 03/07/2016.

MUÑOZ-GARCIA, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; VALDÉS, M. Promoción del crecimiento del maíz por cepas productoras de siderófos de Azospirillum y Pseudomonas fluorescentes. In: Congreso Nacional De La Fijacion Biologica Del Nitrogeno Y I Encuentro Iberoamericano De Investigacion Sobre Fijacion De Nitrogeno, 3., 1991. Cuernavaca. Anais. Cuernvaca, México, p.61. 1991.

MYERS. Environmental services of biodiversity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: NSF **Workshop on Systematics and Inventory of Soil Nematodes**, Julho, 1996.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. The development of Azospirillum as a commercial inoculant for improving crop yield. *Biotechnology Advances*, v. 13, p. 415-424, 1995.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated Azospirillum species can stimulate plants. *ASM News*, v. 63, p. 364-370, 1997.

OLIVEIRA, Z. M. **Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de cana-de-açúcar sob fertilização orgânica e/ou convencional**. São Paulo.165p, 2009.

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

PACE, N. R., A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v.276, p. 734-40, 1997.

PARIZOTTO, D. L.; MARCHIORO, V. S. Uso de inoculante *Rhizobium tropici* e nitrogênio em cobertura na cultura do feijão. **Rev. Cultivando o Saber**. Volume 8 - n°1, p. 16 - 26, 2015. Disponível em: <http://www.fag.edu.br/upload/revista/cultivando_o_saber/5580cbb15da6a.pdf> Acessado em: 30/06/2016.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. .P., DROZDOWICZ, A. Dinâmica Das Populações Bacterianas Em Solos De Cerrados. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.34, n.5, p.801-811, maio 1999.

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

PORTUGAL, J.R.; ARF, O.; LONGUI, W.V.; GITTI, D.C.; BARBIERI, M.K.F.; GONZAGA, A.R.; TEIXEIRA, D.S. Inoculação com *Azospirillum brasilense* Via Foliar Associada à Doses de Nitrogênio em Cobertura na Cultura do Milho. UNESP – Ilha Solteira, SP. In.: **Xxix Congresso Nacional de Milho e Sorgo** - Águas de Lindóia - 26 a 30 de Agosto de 2012.

RAAIJMAKERS, J.M.; WELLER, D.M. e THOMASHOW, L.S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. In natural environments. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.881- 887, 1997.

REIS JUNIOR, F. B. et. al. INOCULAÇÃO DE *Azospirillum Amazonense* Em Dois Genótipos De Milho Sob Diferentes Regimes De Nitrogênio. **R. Bras. Ci. Solo**, 32:1139-1146, 2008.

REIS, V. M. Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**. 22 p, 2007.

ROCHA, G. P. Bactérias Associativas e Simbiontes dos Nódulos de *Arachis Pinto* (Leguminosae). **Universidade Estadual de Feira De Santana**. Programa De Pós-Graduação Em Biotecnologia. Feira de Santana - BA. 2007. Disponível em: <http://www2.uefs.br/ppgbiotec/portugues/arquivos/corpo%20discente/mestrado/2005/gisele_pinto_rocha_santos-dissertacao.pdf> Acessado em: 30/06/2016.

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

RODRIGUEZ NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V.A. VICTOR, O. Meio Simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, v.12, p.16 1986.

SANGOI, L., et. al. Desempenho Agrônômico do Milho em Razão do Tratamento de Sementes com *Azospirillum* sp. e da Aplicação de Doses de Nitrogênio Mineral. **R.**

Bras. Ci. Solo, 2015. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v39n4/0100-0683-rbcs-39-4-1141.pdf>> Acessado em: 30/06/2016.

SANTOS, C. E. R. S. et. al. Modificação de vasos de Leonard com garrafas descartáveis tipo Pet. **Embrapa Agrobiologia** - Comunicado Técnico 124, Seropédica, RJ, Dezembro, 2009. Disponível em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/42757/1/COT124-09.pdf>> Acessado em: 06/04/2015.

SHIOMI, H.F. et. al. Avaliação de bactérias endofíticas para o controle biológico da mancha foliar de *Exserohilum turcicum* em milho. **PLANT PATHOLOGY**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.82, 1-4, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aib/v82/1808-1657-aib-000642013.pdf>> Acessado em: 03/07/2016.

SILVEIRA, E. L. Inoculações de Bactérias Promotoras de Crescimento no Cultivo de Arroz em Solução Nutritiva. **Universidade Estadual Paulista**, Campus de Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, SP, 2008. Disponível em: < <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/micro/d/2049.pdf>> Acessado em: 08/05/2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmerd, 2004.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, v.37, p.1016-1024, 1979.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; REIS, G.G. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill Maiden. *Revista Árvore*, v.27, n.1, p. 1-7, 2003.

VINHAL-FREITAS, I. C., RODRIGUES, M. B. Fixação Biológica Do Nitrogênio Na Cultura Do Milho. **Universidade Federal de Uberlândia**. *Agropecuária Técnica* – v. 31, n. 2, 143 - 154 p., 2010.

ZILLI, J. E. et. al. Diversidade Microbiana Como Indicador De Qualidade Do Solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set./dez. 2003.

ZUFFO, A. M. et. al. Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in the soybean crop. **Rev. de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 38, n. 1, p. 87-93, mar. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2015000100013&lng=pt&nrm=iso>. Acessado em: 30/06/2016.

APENDICE 1 - FOTOS DO EXPERIMENTO

As imagens foram registradas durante a execução do experimento em casa de vegetação no primeiro semestre de 2015.

IMAGEM 1 - VASOS E ESTRUTURA DA CASA DE VEGETAÇÃO.



FONTE: O autor (2015).

IMAGEM 2 – ADAPTAÇÃO DE VASOS DE LEONARD.



FONTE: O autor (2015).