

ANDREZA RAQUEL BARBOSA DE FARIAS

**INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO E MILHO COM BACTÉRIAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL**

GARANHUNS, PERNAMBUCO - BRASIL

FEVEREIRO DE 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA

INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO E MILHO COM BACTÉRIAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

ANDREZA RAQUEL BARBOSA DE FARIAS

SOB ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA

JÚLIA KUKLINSKY SOBRAL

Dissertação apresentada à
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte das
exigências do Programa de Pós
Graduação em Produção agrícola, para
obtenção do título de *Mestre*.

GARANHUNS, PERNAMBUCO – BRASIL

FEVEREIRO – 2015

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

F224i Farias, Andreza Raquel Barbosa de
Inoculação de sementes de feijão e milho com bactérias
promotoras de crescimento vegetal/ Andreza Raquel
Barbosa de Farias .- Garanhuns, 2015.

75fs.

Orientador: Júlia Kuklisky Sobral
Dissertação (Mestrado em Produção agrícola) -
Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade
Acadêmica de Garanhuns, 2015.
Inclui Anexos e Bibliografias

CDD: 635.652

1. Produção de feijão
 2. Adubação organica - Fitorremediação
 3. Inoculantes - Produtividade
 4. Milho - Cultivos consorciados
 5. Estudo qualitativo
- I. Sobral, Júlia kuklinsky
 - II. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA

INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO
VEGETAL EM SEMENTES DE FEIJÃO E MILHO

ANDREZA RAQUEL BARBOSA DE FARIAS

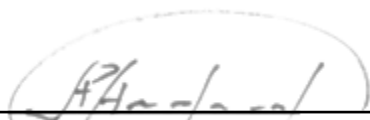
GARANHUNS, PERNAMBUCO - BRASIL

FEVEREIRO – 2014

**INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO
VEGETAL EM SEMENTES DE FEIJÃO E MILHO**

ANDREZA RAQUEL BARBOSA DE FARIAS

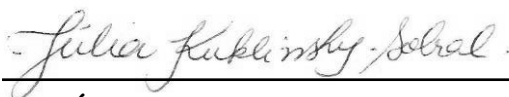
APROVADO EM: **06 DE FEVEREIRO** DE 2015



ALBERÍCIO PEREIRA DE ANDRADE



ERIKA VALENTE DE MEDEIRO



JÚLIA KUKLINSKY SOBRAL

É graça divina começar bem. Graça maior é
persistir na caminhada certa. Mas a graça das
graças é não desistir nunca.

(Dom Hélder Câmara)

DEDICO

*À mulher mais forte, generosa e guerreira que conheço.
Aquele que dia após dia me ensina com exemplos, que me deu a vida e por quem eu
daria a minha, minha rainha, minha Mãe (**MARIA SALETE**).*

OFEREÇO

*Aquele que esteve ao meu lado durante todo este percurso,
apoiando e incentivando, que foi o melhor amigo, ouvinte e companheiro que pude ter
(**JÚNIOR MÁRIO**)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pai todo poderoso, por me dar forças para realizar este que para mim é um sonho.

A meu pai Luiz Claudio por desde os primeiros anos me mostrar o valor dos estudos me dizendo sempre “que este é o maior bem que ele poderia me deixar”. A minha mãe Salete e minha irmã Andriele por todo o apoio, carinho e até broncas na hora certa. Obrigada por estarem do meu lado sempre.

A minha tia Socorro por ter se tornado uma segunda mãe, minha prima Júlia por toda a ajuda quando eu levava trabalho para casa, e ao meu primo “Filho” por mesmo tão pequeno me ensinar tanto.

A toda a minha família, que de alguma forma contribuiu na minha formação pessoal. Cada um de diferentes modos é muito importante e especial para mim.

A minhas amigas, Tatiana Silva, Cathylen Almeida, Raiana Oliveira, Cristiane Silva, Marília Almeida, Mércia Oliveira, Jéssica Lima, Analuluana Monteiro, Andreza Braga, Lucineide Lima, Lianna Veras e Francielle Falcão por serem minhas confidentes de toda a vida, por estarem ali sempre apostos para me emprestar o ombro amigo, pelos momentos de descontração, enfim por confiarem sua amizade a mim.

A minha querida amiga Luana Lira Cadete, por mesmo distante ser tão importante, por seu carinho a cada ligação, obrigada por fazer parte da minha vida.

A todos os meus professores, que foram moldando meu conhecimento desde as séries iniciais até agora.

A minha querida orientadora, que me abriu as portas no mundo da ciência, por sua paciência, dedicação, conselhos e por sempre me incentivar e apoiar. Foi um prazer passar todos esses anos convivendo, admirando e aprendendo a ser uma pessoa melhor com a senhora. Obrigada por tudo.

A meus amigos do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana: Camila (aprendi muito com cada coisa que ela me pedia), Marisângela (apenas uma palavra dela me acalmava), Pedro (sempre disposto a ajudar), Diogo (alguém que sabe um pouco de tudo e muito de ciência), Luana (uma amiga de todas as horas), Jacielle (ótima ouvinte e conselheira), Narcizo (alegrava meus dias no lab), Andresa (dedicada e companheira), Danúbia (inteligente e guerreira), Tiago (me fez rir, me ensinou muito), Williane (companheira na organização de eventos), Gilka (sempre um ótimo abraço), Everthon (o

pernambucano mais italiano que conheço), Isaneli (queria ter sua capacidade em aprender tão rápido), Geraldo (sempre disposto a lhe colocar para cima), Adjailton (aprendi muito com nossas conversas), Bruno (sempre me transmitiu paz), Arthur (o cidadão mais nobre de Aliança), Aldo (companheiro de experimentos), Ricardo (entre uma Coca Cola e outra muito trabalho), Luciane (dela nunca recebi um não, sempre disposta a ajudar), Gabriel (queria ter lido metade dos livros que ele leu), Yasmin (a doçura em pessoa), Claudineide (sempre uma mão amiga), Jesimiel (ainda vou ouvir falar muito de suas ciências inovadoras), Jéssica (sua risada é contagiante), Gesica (dedicada e inteligente), Elvis (mais um nobre cidadão de Aliança). Agradeço a cada um pela amizade, momentos de descontração e apoio em cada experimento, sem vocês este trabalho não seria possível, obrigado por se tornarem minha segunda família.

A meus amigos do mestrado, pelos bons momentos, pelas vezes que acertamos e até erramos juntos.

A todos os funcionários da Unidade Acadêmica de Garanhuns, responsáveis por cada ambiente e diferentes funções mantendo sempre o bom funcionamento da instituição.

Ao Programa de Pós Graduação em Produção Agrícola pela oportunidade a mim concedida, a todos que fazem o setor administrativo, coordenação e corpo docente, em especial o prof. Mácio Farias de Moura que me auxiliou na estatística deste trabalho, meu muito obrigada.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, pelas sementes cedidas para realização do experimento e ao laboratório de fisiologia vegetal desta unidade por ceder o equipamento de .medição de clorofila.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Enfim a todos que passaram por esta jornada, participando de forma direta ou indireta...

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

Andreza Raquel Barbosa de Farias, nascida em 21 de maio de 1988, na cidade de Garanhuns, estado de Pernambuco, filha de Luiz Claudio de Farias e Maria Salete Barbosa de Farias. Iniciou seus estudos no Colégio Diocesano de Garanhuns no ano de 1995, e lá cursou todo o ensino inicial, fundamental e médio concluindo no ano de 2005. Em agosto de 2007 inicia o curso de Agronomia na Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco, obtendo título de Engenheira Agrônoma em Agosto de 2013. Ainda em agosto de 2013 ingressa no mestrado em Produção Agrícola também na Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco concluindo o mesmo em fevereiro de 2015 e iniciando o doutorado em Fitotecnia na Universidade Federal do Ceará - UFC.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL.....	1
GENERAL SUMMARY.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5

CAPÍTULO I

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO (*ZEA MAYS* L.) E FEIJÃO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) INOCULADAS COM DIFERENTES GÊNEROS BACTERIANOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1 Linhagens bacterianas.....	16
2.2 Avaliação de linhagens produtoras de AIA.....	16
2.3 Avaliação de linhagens solubilizadoras de fosfato.....	17
2.4 Avaliação de Linhagens produtoras de Exopolissacarídeos – EPS.....	17
2.5 Qualidade fisiológica de sementes de milho e feijão inoculadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal	18
2.6 Análise estatística.....	19
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
3.1 Promoção de crescimento vegetal.....	20

3.2 Inoculação em feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	24
3.3 Inoculação em milho (<i>Zea mays</i> L.).....	26
4. CONCLUSÕES.....	29
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

CAPÍTULO II

Desenvolvimento do milho (*Zea mays* L.) associado com diferentes gêneros bacterianos potencialmente promotores de crescimento vegetal

RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
1 INTRODUÇÃO.....	42
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1 Linhagens bacterianas.....	44
2.2 Cultivo bacteriano.....	44
2.3 Sementes de milho (<i>Zea mays</i> L.).....	44
2.4 Inoculação em milho avaliado aos 45 e 75 dias de desenvolvimento.....	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1 Avaliação em milho com 45 dias de cultivo após a inoculação	47
3.2 Avaliação em milho com 75 dias de cultivo após a inoculação.....	53
4 CONCLUSÕES.....	58
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

RESUMO GERAL

A inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal pode melhorar o crescimento de plantas, independente de sua origem de isolamento, atuando por diferentes mecanismos, como fixação biológica de nitrogênio, produção de fitohormônios, solubilização do fosfato inorgânico, produção da molécula quorum sensing e ainda na fitorremediação. O milho (*Zea mays* L.) é uma das gramíneas mais cultivadas no mundo, sendo considerada uma das culturas mais antigas e estudadas. O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é consumido em todos os continentes e apresenta papel importante na alimentação do brasileiro, e é um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social no Brasil. Partindo do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar a atuação de diferentes gêneros bacterianos, previamente identificados com características de promoção de crescimento vegetal, quanto à germinação de sementes de milho e feijão em laboratório, emergência e crescimento de milho em casa de vegetação. Para isso 10 linhagens de bactérias dos gêneros *Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp. *Rhizobium* sp., *Pantoea* sp. e *Pseudomonas* sp. foram inoculadas em sementes de milho e feijão e a germinação avaliada em papel germitest, seguindo recomendações das Regras para Análises de Sementes. Além disso, a inoculação com os tratamentos de 4 bactérias mais um controle (sem inóculo bacteriano) e um controle adicional (NPK) foi realizado em sementes de milho e analisados em casa de vegetação. As linhagens de *Bacillus* sp., *Pantoea* sp., *Rhizobium* sp. e *Stenotrophomonas* sp. influenciaram na germinação em feijão, sendo possível observar que a variável massa fresca de raízes apresentou diferença significativa. Em relação a germinação na cultura do milho, as bactérias *Bacillus* sp., *Pantoea* sp., *Rhizobium* sp. e *Stenotrophomonas* sp. influenciaram a germinação, sendo possível verificar que as características massa fresca de parte aérea, massa seca de raiz e parte aérea, e comprimento de raiz e parte aérea foram superiores ao controle quando comparado com os tratamentos dos diferentes inóculos bacterianos. O experimento em casa de vegetação demonstrou que as linhagens UAGC863 (*Bacillus* sp.), UAGC62 (*Pantoea* sp.), UAGC738 (*Rhizobium* sp.) e UAGC982 (*Stenotrophomonas* sp.) promoveram interação positiva, estimulando o desenvolvimento do milho. Foi observado que quando feita comparação entre linhagens massa seca de raiz e parte aérea foram estimulados por *Bacillus* sp., aos 45 dias de cultivo e pelo tratamento composto da mistura de linhagens aos 75 dias de cultivo. Quando a comparação foi feita em relação ao NPK foi observado que todas as linhagens promoveram incremento na massa seca de raiz superior ao controle químico tanto aos 45 quanto aos 75 dias de cultivo. Na comparação em relação ao controle (sem inóculo) altura, massa fresca e seca de raiz foram significativos aos 45 dias de cultivo, e aos 75 dias o tratamento com a mistura das linhagens apresentou melhores resultados para massa fresca e seca da raiz. Tais resultados evidenciam a potencialidade dos diferentes gêneros bacterianos apresentados neste trabalho em promover crescimento vegetal em plantas de milho e feijão.

GENERAL SUMMARY

The inoculation of bacteria that promote plant growth can improve the development of plants, regardless of their origin isolation, acting by different mechanisms, such as nitrogen fixation, phytohormones production, inorganic phosphate solubilization, production of quorum sensing molecule and still the phytoremediation. Corn (*Zea mays* L.) is one of the most cultivated grasses in the world and is considered one of the oldest and studied cultures. The beans (*Phaseolus vulgaris* L.) is consumed on every continent and has an important role in the Brazilian food, and is one of the agricultural products of greater economic and social importance in Brazil. Based on the foregoing, the objective of this work was to evaluate the performance of different bacterial genera, previously characterized with plant growth promoting characteristics, the seed germination in the laboratory, the emergency and development in the greenhouse. To this 10 bacterial strains of *Bacillus* sp, *Stenotrophomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea* sp. and *Pseudomonas* sp. were inoculated in corn and bean seeds and germination evaluated in germitest paper, following recommendations of the Rules for Seed Analysis. Moreover, inoculation with bacteria treatment of 4 plus a control (no inoculum bacterino) and an additional control (NPK) was carried out on corn seeds and analyzed in the greenhouse. The *Bacillus* sp., *Pantoea* sp., *Rhizobium* sp. and *Stenotrophomonas* sp. strains influenced the bean sprouting. Regarding germination in maize, the bacteria *Bacillus* sp., *Pantoea* sp., *Rhizobium* sp. and *Stenotrophomonas* sp. influenced the germination, can be seen that the shoot fresh weight characteristics, dry weight of root and shoot, and shoot and root length were higher than the control when compared with the treatments of different bacterial inoculants. The experiment in greenhouse showed that UAGC863 strains (*Bacillus* sp.), UAGC62 (*Pantoea* sp.), UAGC738 (*Rhizobium* sp.) and UAGC982 (*Stenotrophomonas* sp.) promoted positives interaction, stimulating the development of corn. It was observed that when a comparison between strains dry weight of roots and shoots were stimulated by *Bacillus* sp., At 45 days of cultivation and by the compound treatment of the mixture of strains after 75 days of culture. When the comparison was made regarding the NPK was observed that all strains promoted increase in root dry weight than chemical control at 45 and 75 days of culture. Compared to the control (without inoculum) height, fresh weight and dry root were significant at 45 days of cultivation, and 75 days after treatment with the mixture of strains showed better results for fresh and dry root weight. These results show the potential of different bacterial genera presented in this work in promoting plant growth in corn and bean plants.

INTRODUÇÃO GERAL

A inoculação de bactérias pode melhorar o desenvolvimento de plantas, tendo eficácia comprovada há quase um século no caso de rizóbios e, mais recentemente, outras bactérias promotoras de crescimento de plantas, aquelas simbiotes que tem íntima relação com o vegetal, habitando o interior (endofíticas) e exterior (epifíticas). Além disso, são fontes alternativas a insumos químicos, o que garante a manutenção dos recursos ambientais. Contudo, dois aspectos são de fundamental importância para o sucesso de uma inoculação, a eficácia do isolado bacteriano em conjunto com a aplicação da tecnologia adequada (Andreote et al., 2010; Compant et al., 2010; Bachan et al., 2014).

Dentre os processos que as bactérias podem realizar estão: fixação biológica de nitrogênio (Moreira et al., 2010; Vitorazi Filho et al., 2012), produção de fitohormônios, como o ácido índol acético (AIA), solubilização do fosfato inorgânico, existente no solo, de forma a deixá-lo disponível para os vegetais e produção da molécula *quorum sensing* (Farias et al., 2012; Lira-Cadete et al., 2012; Pereira et al., 2012; Santos et al., 2012; Leite et al., 2014).

Diversos são os gêneros bacterianos com características de estimular o crescimento vegetal, Telke et al. (2011) e Ladeira et al. (2012), mostraram a atuação de linhagens do gênero *Bacillus* sp. na produção de enzimas para diferentes finalidades. Li et al. (2008) observaram que linhagens do gênero *Pantoea* sp. isoladas de plantas de soja tem características para fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de ácido índol acético. Alizadeh et al. (2013) verificaram a capacidade de resistência na cultura do pepino a insetos por meio de bactérias do gênero *Pseudomonas* sp.. Patil et al. (2014) observaram bactérias do gênero *Rhizobium* sp. com características para tolerância a salinidade, o que pode auxiliar o crescimento de plantas submetidas a tais condições. Estudos realizados por Fang-Bo et al. (2012) demonstraram que bactérias do gênero *Stenotrophomonas* sp. foram capazes de degradar o inseticida endosulfan, classificado como altamente tóxico, demonstrando seu potencial a biorremediação.

Para o desenvolvimento de inoculantes bacterianos que venham a promover o crescimento de um vegetal, devem ser avaliados diferentes aspectos da interação bactéria-planta, desde a germinação até a fase de senescência da planta. Neste contexto, a taxa de germinação das sementes e o vigor das plântulas dependem dos fatores genéticos das mesmas, contudo as práticas culturais também podem alterá-las. (Schlindwein et al., 2008; Dartora et al., 2013). Dentre as práticas culturais, a inoculação com micro-organismos benéficos tem se mostrado uma alternativa viável, devido ao baixo custo e diminuição dos impactos ambientais causados por insumos químicos, fatores essenciais para o estabelecimento de sistemas agrícolas sustentáveis (Sottero et al., 2006; Dartora et al., 2013).

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é consumido em todos os continentes e apresenta papel importante na alimentação do brasileiro, a cultura é cultivada por grandes e pequenos produtores em sistemas de produção diversos em todas as regiões do país, além de ser um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social no Brasil (Lemes et al., 2011). No Nordeste, a produtividade é de 600 kg ha⁻¹, sendo o Estado de Pernambuco o segundo maior produtor, apresentando 53.526 t em 107.008 ha, e produtividade média de 500 kg ha⁻¹ e a produção é concentrada na época das águas, ou seja, semeadura entre fevereiro e abril (Pereira et al., 2013). Avaliando o efeito de linhagens do gênero *Bacillus* sp. e *Rhizobium* sp. em feijão caupi, Costa et al. (2013) encontraram características positivas para solubilização de fosfato, produção de ácido indol acético e fixação de nitrogênio atmosférico.

O milho (*Zea mays* L.) é uma das gramíneas mais cultivadas no mundo, sendo considerada uma das culturas mais antigas e estudadas (Schneider; Cruz Silva, 2012), além de ser considerada uma cultura de subsistência do Nordeste brasileiro (Brito et al., 2012). Muitos são os trabalhos que demonstram os benefícios da interação desta gramínea com bactérias: solubilização de fosfato por *Pseudomonas fluorescens* (Chaves et al., 2013); incremento nos teores de potássio também por *Pseudomonas fluorescens* (Oliveira et al., 2012); e incremento na massa seca por *Bacillus subtilis* (Araújo, 2008).

Partindo do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar a interação de diferentes gêneros bacterianos promotores de crescimento vegetal na germinação de feijão e milho e no desenvolvimento em casa de vegetação de plantas de milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIZADEH, H.; BEHBOUDI, K.; AHMADZADEHA, M.; JAVAN-NIKKHAHA, M.; ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. **Biological Control**, v.65, p.14-23, 2013.
- ANDREOTE, F. D.; ROCHA, U. N.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; VAN OVERBEEK, L. S. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v.97, p.389-399, 2010.
- ARAÚJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência Agrotécnica**, v.32, n.2, p.456-462, 2008.
- BACHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil**, v.378, p.1-33, 2014.
- BRITO, L. T.; CAVALCANTI, N. B.; SILVA, A. S.; PEREIRA, L. A. Produtividade da água de chuva em culturas de subsistência no semiárido pernambucano. **Engenharia Agrícola**, v.32, n.1, p.102-109, 2012.
- CHAVES, D. P.; ZUCARELI, C.; OLIVEIRA JUNIOR, A. Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desenvolvimento e produtividade do milho. **Semina: Ciências Agrárias**. v.34, n.1, p. 57-72, 2013.
- COMPANT, S., CLÉMENT, 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, 2010.
- COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. M. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.48, n.9, p.1275-1284, 2013.

- DARTORA, J.; MARINI, D.; GUIMARÃES, V. F.; PAULETTI, D. R.; SANDER, G. Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de milho e trigo inoculadas com estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. **Global Science and Technology**, v.6, n.3, p.190-201, 2013.
- FANG-BO, Y.; ALI, S. W.; JING-YA, S.; LIN-PING, L. Isolation and Characterization of an Endosulfan-Degrading Strain, *Stenotrophomonas* sp. LD-6, and its Potential in Soil Bioremediation. **Journal of Microbiology**, v.61, n.4, p.257-262, 2012.
- FARIAS, A. R. B.; LIMA, D. R. M.; LIRA-CADETE, LUANA.; RAMOS, A. P. S.; SILVA, M. C. de B., FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Promoção de crescimento vegetal de feijão comum por bactérias isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v.17, p.101-104, 2012.
- LADEIRA, S. A.; DELATORRE, A. B.; ANDRADE, M. V. V. Utilização da pectina, proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho para a produção de proteases por *Bacillus* sp. termofílico. **Brazilian Journal Food Technology**, v.15, n.1, p.92-98, 2012.
- LEITE, M. C. B. S.; FARIAS, A. R. B.; FREIRE, F. J.; ANDREOTE, F. D.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; FREIRE, M. B. G. S. Isolation, bioprospecting and diversity of salt-tolerant bacteria associated with sugarcane in soils of Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, p.S73-S79, 2014.
- LEMES, V. R. R.; KUSSUMI, T. A.; NAKANO, V. E.; ROCHA, S. B.; OLIVEIRA, M. C. C.; RODRIGUES, M. P.; RIBEIRO, J. I. A. Avaliação de resíduos de agrotóxicos em arroz e feijão e sua contribuição para prevenção de riscos à saúde da população consumidora. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.70, n.2, p.113-21, 2011.
- LI, J. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology & Biochemistry**. v.40, p.238-246, 2008.

- LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A.R.B. RAMOS, A.P.S. et al. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. **Bioscience Journal**, v.28, p.122-129, 2012.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.
- OLIVEIRA, M. A.; ZUCARELLI, C.; SPOLAOR, L. T.; DOMINGUES, A. R.; FERREIRA, A. S. Composição química dos grãos de milho em resposta à adubação mineral e inoculação com rizobactérias. **Revista Ceres**, v.59, n.5, p.709-715, 2012.
- PATIL, S. M.; PATIL, D. B.; PATIL, M. S.; GAIKWAD, P. V.; BHAMBURDEKAR, S. B.; PATIL, P. J. Isolation, characterization and salt tolerance activity of *Rhizobium* sp. from root nodules of some legumes. **International Journal of Current Microbiology Applied Sciences**, v.3, n.5, p.1005-1008, 2014.
- PEREIRA, A. P. A.; SILVA, M. C. B.; OLIVEIRA, J. R. S.; RAMOS, A. P. S.; FREIRE, M. B. G. S.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia* spp. endofíticas de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v.28, p.112-121, 2012.
- PEREIRA, H. S.; COSTA, A. F.; MELO, L. C.; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, L. C.; WENDLAND, A. Interação entre genótipos de feijoeiro e ambientes no Estado de Pernambuco: estabilidade, estratificação ambiental e decomposição da interação. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.6, p.2603-2614, 2013.
- SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 142-149, 2012.
- SCHNEIDER, T. C.; CRUZ SILVA, C. T. A. Efeito alelopático do nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) sobre o desenvolvimento do milho (*Zea mays* L.) e aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.). **Revista Thêma et Scientia** , v.2, n.1, p.151-156, 2012.

- SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; AZAMBUJA, A.C.; GRANADA, C.E.; GABIATTI, N.C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v.38, n.3, 2008.
- SOTTERO, A.N. FREITAS, S. DOS S.; DE MELO, A.M.T.; TRANI, P.E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, n.2, p.225-234, 2006.
- TELKE, A. A.; GHODAKE, G. S.; KALYANI, D. C.; DHANVE, R. S.; GOVINDWAR, S. P. Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus* sp. ADR. **Bioresource Technology**. v.102, p.1752-1756, 2011.
- VITORAZI FILHO, J. A.; LIMA, K. B.; FREITAS, M. S. M.; MARTINS, M. A.; OLIVARES, F. L. Crescimento de mudas de maracujazeiro-doce inoculadas com fungos micorrizicos arbusculares e bacterias diazotroficas sob diferentes doses de fosforo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p. 442-450, 2012.

CAPÍTULO I

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO E FEIJÃO INOCULADAS COM DIFERENTES GÊNEROS BACTERIANOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL

RESUMO

A associação de micro-organismos com vegetais tem alta importância agrícola e promove diversos benefícios ao meio ambiente. Dentre os micro-organismos, bactérias com características benéficas podem colonizar diferentes espécies vegetais a partir da rizosfera, penetrando em suas raízes e colonizando de forma endofítica. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho avaliar características de promoção de crescimento vegetal, *in vitro* de diferentes gêneros bacterianos e a qualidade da germinação de sementes de milho (*Zea mays* L.) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidas à inoculação com linhagens bacterianas, em condições de laboratório. Foram utilizadas 10 linhagens de diferentes gêneros bacterianos (*Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea* sp. e *Pseudomonas* sp.) e analisadas a capacidade de produzir ácido indol acético, exopolissacarídeos e de solubilizar fosfato inorgânico. Além disso, foi realizado teste de germinação de sementes em papel germitest, seguindo recomendações da RAS (Regra para Análise de Sementes), o experimento constou de onze tratamentos sendo 10 tratamentos inoculados com gêneros bacterianos diferentes e um controle (sem inóculo). O experimento constou de quatro repetições com 25 sementes cada e teve duração de sete dias. No teste de solubilização de fosfato do total apenas duas não apresentaram tal característica (*Bacillus cereus* - UAGC159 e *Stenotrophomonas* sp.- UAGC926), para a produção de AIA 9 linhagens foram positivas na presença de triptofano e 3 na ausência, na avaliação da produção de exopolissacarídeos 3 das linhagens apresentaram esta característica (UAGC159 - *Bacillus cereus*, UAGC62 - *Pantoea* sp., EN306 - *Pantoea* sp.). No teste de germinação em feijão, sete linhagens influenciaram positivamente no processo de germinação, sendo verificado a partir da massa fresca de raízes, e apenas uma linhagem de *Bacillus cereus* (UAGC159) influenciou negativamente a massa fresca das raízes. As outras variáveis analisadas não apresentaram diferenças em relação ao tratamento controle. Na avaliação de germinação do milho, houve significativa interação com diferentes linhagens do gênero *Rhizobium* sp. e *Stenotrophomonas* sp., em relação a massa fresca da parte aérea, massa seca da raiz e da parte aérea e comprimento da raiz e da parte aérea. Linhagens bacterianas oriundas de soja e cana-de-açúcar apresentam potencial para experimentos de promoção de crescimento vegetal em casa de vegetação, com plantas de milho e feijão.

ABSTRACT

The association of microorganisms with vegetables have high agricultural importance and promotes several benefits to the environment. Among the micro-organisms, bacteria with beneficial features can colonize different species from their rhizosphere, penetrating roots and colonizing of endophytic form. Therefore, the aim of this work was to evaluate promoting plant growth characteristics in vitro of different bacterial genera and the quality of maize seed germination (*Zea mays* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculated with these strains in laboratory conditions. 10 strains of different bacterial genera were used (*Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea* sp., and *Pseudomonas* sp.). and analyzed the ability to produce indole acetic acid, exopolysaccharides and solubilizing inorganic phosphate. In addition, we performed seed germination test in germitest paper, following recommendations of the RAS (Rule for Seed Analysis), seeds were inoculated with 10 strains individually. the experiment consisted of four replications with 25 seeds each and lasted seven days. In phosphate solubilization test of total only two had no such feature (*Bacillus cereus* - UAGC159 and *Stenotrophomonas* -SP.- UAGC926), for the production of IAA 9 strains were positive in the presence of tryptophan and 3 in the absence, in the evaluation of exopolysaccharide 3 of the strains showed this feature (UAGC159 - *Bacillus cereus*, UAGC62 - *Pantoea* sp, EN306 -. *Pantoea* sp.). In beans in germination test, seven lines positively influence the germination process, being verified from the fresh root weight, and only a strain of *Bacillus cereus* (UAGC159) negatively influenced the fresh weight of the roots. The variables showed no differences compared to control treatment. In corn germination evaluation, a significant interaction with different strains of the genus *Rhizobium* sp. and *Stenotrophomonas* sp., for the fresh weight of shoot, root dry weight and shoot and root length and shoot. Thus, it is concluded that strains derived from soybean and cane sugar have potential for plant growth promoting experiments in the greenhouse, with corn and bean plants.

1 INTRODUÇÃO

A associação de micro-organismos com vegetais tem alta importância agrícola, e promove diversos benefícios ao meio ambiente, reduzindo o uso de fertilizantes químicos na produção de vegetais através da promoção de crescimento vegetal, garantindo, assim, a sustentabilidade do meio (Egamberdiyeva, 2007; Farias et al., 2012.; Lira-Cadete et al., 2012; Santos et al., 2012).

Uma grande variedade de micro-organismos, quando associados a plantas, auxiliam seu desenvolvimento por mecanismos diretos e indiretos. Considerando-se os diretos, pode-se citar a fixação biológica de nitrogênio (Richardson et al., 2009), a produção de fitohormônios como o ácido indol acético (AIA), que pode ser sintetizado por diferentes rotas bioquímicas (Masciarelli et al., 2013; Jian-Feng et al., 2013; Kasim et al., 2013), solubilização de fosfato inorgânico (Taulé et al., 2011), promoção de enzimas extracelulares (Ferrara et al., 2011), entre outros. Em relação aos mecanismos indiretos, considera-se o controle biológico de fitopatógenos e insetos, aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos, dentre outros (Merzaeva & Shirokikh, 2010; Bulgarelli et al., 2013).

Dentre os micro-organismos, bactérias com características benéficas podem colonizar diferentes espécies vegetais a partir de sua rizosfera, penetrando em suas raízes e, colonizando assim o mesmo de forma endofítica (Santos et al., 2012). Atualmente, são muito utilizados produtos comerciais contendo micro-organismos vivos em sua formulação (uma ou mais linhagens bacterianas), e quando adicionados a um veículo inerte são denominados inoculantes ou biofertilizantes. Em geral, a aplicação é recomendada sobre as sementes, superfície vegetal ou solo. Tais produtos objetivam a colonização da planta pelo micro-organismo inoculado, para que os mecanismos microbianos de promoção do crescimento vegetal possam ser ativados (Armenta-Bojórquez et al., 2010).

A inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs) pode promover a sustentabilidade nos sistemas agrícolas, pois são produzidas e atuam com baixa demanda de energia (Oliveira et al., 2014). Além disso, são responsáveis por expressivas economias nos custos de produção agrícola (Freire Filho et al., 2005).

Entretanto, ao serem aplicados no solo sem um veículo adequado, as populações de bactérias diminuem rapidamente, conseqüentemente afetando os possíveis benefícios da inoculação (Malusa et al., 2012).

Por ser de fácil uso e requerer reduzida quantidade de inoculante, a inoculação de sementes tornou-se a forma mais comum, destacando-se o inoculante líquido, podendo ser realizadas com auxílio de máquinas no campo, facilitando o uso da técnica (Deaker et al., 2004).

Objetivando a adoção de novas tecnologias e manejos que reduzam a utilização de produtos químicos, o aumento da germinação e promoção do crescimento vegetal, estudos tem mostrado que inoculação de sementes com bactérias promotoras de crescimento vegetal torna-se uma alternativa (Beneduzi et al., 2013), obtendo maior desenvolvimento e produtividade na planta (Silva, 2013).

A taxa de germinação e o vigor das plântulas dependem de fatores genéticos e das praticas culturais. (Schlindwein et al., 2008). Dentre as práticas culturais, a inoculação com micro-organismos com características promotoras de crescimento vegetal tem se mostrado uma alternativa viável, apresentando baixo custo e garantindo a conservação ambiental, fatores essenciais para o estabelecimento de sistemas agrícolas sustentáveis. Dartora et al. (2013) afirmam que os benefícios da inoculação com micro-organismos em sementes podem ser tanto diretos (absorção de nutrientes) quanto indiretos (biorremediação), sendo a seleção de estirpes um fator chave para o sucesso da inoculação com bactérias promotoras do crescimento.

A germinação é um dos parâmetros da qualidade fisiológica da semente, o teste de germinação objetiva determinar o máximo potencial de germinação de um lote de sementes, sendo o valor observado usado para comparar a qualidade de diferentes lotes e estimar o valor de semeadura (quantidade de sementes) no campo (ISTA, 1993). A fim de aumentar a eficiência e qualidade dos cultivos, e ainda se enquadrar nas recomendações legais e comerciais, a análise deve ser rápida e as informações obtidas no teste devem ser uniformes, e realizadas por métodos padronizados (Campos et al., 1997).

O milho (*Zea mays* L.) é considerado uma das mais antigas e importantes culturas agrícolas, sendo um produto utilizado tanto na alimentação humana quanto

animal, além de ter finalidade na extração do biodiesel, sendo utilizado em larga escala, principalmente nos Estados Unidos (Salla et al., 2010;). O Brasil encontra-se como o terceiro maior produtor mundial da cultura, atrás apenas dos Estados Unidos e da China, representando cerca de 80% de toda a produção de grãos do país (CONAB, 2014).

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L) é uma leguminosa originária de regiões da antiga cultura inca, apresentando um alto teor proteico na composição centesimal (Kaplan, 1965). É uma notável fonte proteica que faz parte da dieta da população brasileira. É um produto agrícola de alta importância na economia, pois emprega vasta mão de obra em todo ciclo de sua cultura (Benin et al., 2002). O Brasil é o maior produtor mundial de feijão com produção média anual de 3,5 milhões de toneladas (MAPA, 2015).

É amplamente estudada a atuação de diferentes gêneros bacterianos promotores de crescimento vegetal. O gênero *Pantoea* sp. foi caracterizado como fixador de nitrogênio em linhagens isoladas de cana-de-açúcar (Loiret et al., 2004), produção de exopolissacarídeos por linhagens oriundas de ambiente marinho (Silvi et al, 2013), e ainda como produtor de AIA e solubilizador de fosfato em milho (Mendonza et al, 2013). O gênero *Bacillus* sp. também apresentou características distintas em vários estudos: isoladas em raízes de braquiária (Araujo et al., 2013), associada a *Rhizobium* sp. inoculadas em sementes de feijão-caupi melhorando a matéria seca das plântulas (Rodrigues et al., 2012). Linhagens de *Stenotrophomonas* sp. atuaram na biorremediação degradando compostos químicos contaminantes de solos (Fang Bo et al., 2012), e ainda podem fixar nitrogênio atmosférico, solubilizar fosfato inorgânico e produzir ácido índol acético (Criollo et al., 2012). Bactérias do gênero *Rhizobium* sp. apresentam características para tolerância a salinidade, o que pode auxiliar o desenvolvimento de plantas submetidas a tais condições (Patil et al., 2014). A capacidade de resistência a insetos por meio de bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. na cultura do pepino foi percebida por Alizadeh et al., (2013).

Muitos estudos demonstram o sucesso da reinoculação, linhagens isoladas de uma determinada espécie e inoculada em plantas da mesma espécie: Roesch et al., (2005) isolou linhagens de raízes de plantas de trigo, as identificou como diazotróficas e as inoculou em plantas de trigo de uma variedade diferente da inicial e obteve não só

incremento na fixação de nitrogênio, mas também aumento do comprimento radicular e da matéria seca. Silva et al., (2009) inoculou linhagens de cana-de-açúcar isoladas de plantas micropropagadas em campo e obteve incremento de na produtividade e matéria seca. Outra interação de sucesso é o uso de *Bradyrhizobium* em plantas de soja, um incremento que levou o Brasil a torna-se o maior produtor mundial passando a frente dos Estados Unidos (USDA, 2014). No entanto estudos demonstram o sucesso da inoculação cruzada, linhagens isoladas de uma espécie vegetal promovendo crescimento vegetal numa espécie distinta da de sua origem. Farias et al., 2012 obteve aumento de matéria seca ao inocular bactérias oriundas de cana-de-açúcar em feijão (*Phaseollus vulgaris*).

Partindo do exposto, o presente trabalho teve por objetivos caracterizar quanto a produção de AIA, exopolissacarídeos e solubilização de fosfato inorgânico de 10 linhagens bacterianas de diferentes gêneros (*Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea* sp. e *Pseudomonas* sp.). e avaliar a qualidade fisiológica de sementes de milho (*Zea mays* L.) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidas à inoculação bacteriana, em condições de laboratório.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas 10 linhagens bacterianas dos gêneros: *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Stenotrophomonas*. As mesmas pertencem à coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE). As linhagens estavam estocadas em glicerol sob temperatura de -2°C e foram reativadas em meio TSA sólido até obtenção de colônias puras, e possuem características de promoção de crescimento vegetal. A tabela 1 apresenta os tratamentos e as características das linhagens bacterianas testadas.

Tabela 1. Tratamentos e características das linhagens bacterianas utilizadas no teste de qualidade fisiológica de sementes de milho e feijão.

Tratamentos	Gênero	Código	Características*	Referências
T1	<i>Bacillus cereus</i>	UAGC159	-	Barbosa., 2010
T2	<i>P. oryzihabitans</i>	EN268	FBN/AIA/P	Kuklinsky-Sobral et al., 2004
T3	<i>Pseudomonas sp.</i>	UAGC97	FBN	Silva., 2011
T4	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	UAGC926	FBN/AIA	Lima., 2012
T5	<i>Pantoea sp.</i>	UAGC62	FBN	Silva., 2011
T6	<i>Pantoea sp.</i>	EN306	FBN/AIA/P	Kuklinsky-Sobral et al, 2004
T7	<i>Bacillus sp.</i>	UAGC863	FBN/AIA	Lima., 2012
T8	<i>Rhizobium sp.</i>	UAGC735	P	Costa., 2010
T9	<i>Rhizobium sp.</i>	UAGC738	FBN/P/AIA	Costa., 2010
T10	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	UAGC982	AIA	Ramos., 2011
Controle	-	-	-	-

-*AIA= Produção de ácido índol acético; P= Solubilização de Fosfato Inorgânico; FBN=Fixação Biológica de Nitrogênio

2.2 Avaliação de Linhagens produtoras de AIA

As 10 linhagens bacterianas foram inoculadas em meio TSA 10%,(Trypcase Soy Agar) e em meio TSA 10% modificado contendo L- triptofano (5mM) e incubadas por

24 h a 28°C sob agitação de 120 rpm Após este período, a cultura foi tratada com o Reagente de Salkowski (2% de FeCl₃ 0,5 M em 35% de ácido perclórico), segundo metodologia proposta por Crozier et al. (1988), por pelo menos 30 min. As que apresentaram coloração rósea foram caracterizadas como positivas, e testadas também sem adição do mesmo para verificação do uso de rotas alternativas na produção do AIA pelas bactérias avaliadas. Foi utilizada como controle positivo a linhagem EN303 (*Pseudomonas oryzae*), bactéria endofítica de soja, produtora de auxina, solubilizadora de fosfato inorgânico e fixadora de N₂ (Kuklinsky-Sobral et al., 2004). Para linhagens positivas foi feita leitura em espectrofotômetro (DO de 600nm) e os valores observados foram substituídos em equação de regressão mediante curva estabelecida por Santos et al. (2015).

2.3 Avaliação de linhagens solubilizadoras de fosfato

As bactérias foram inoculadas em meio de cultura sólido, contendo fosfato insolúvel (10 g L⁻¹ de glicose; 5 g L⁻¹ de NH₄Cl; 1 g L⁻¹ de NaCl; 1 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 4 g L⁻¹ de CaHPO₄; 15g L⁻¹ de agar; pH 7,2) e incubadas a 28°C por 72h e, em seguida, realizadas as leituras. Os experimentos foram realizados em triplicatas e a presença de um halo claro em torno da colônia indicou a solubilização do fosfato. Foi utilizada como controle positivo a linhagem EN303 de *Pseudomonas oryzae*, bactéria endofítica de soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Os diâmetros das colônias e dos halos de solubilização foram medidos utilizando-se de paquímetro para a determinação dos Índices de Solubilização (IS) por meio da fórmula: $IS = \frac{d \text{ Halo}}{d \text{ Colônia}}$ (diâmetro em mm) / d Colônia (diâmetro em mm) (Hara; Oliveira 2004).

2.4 Avaliação de Linhagens produtoras de Exopolissacarídeos – EPS

Para identificação da produção de exopolissacarídeos – EPS, as colônias isoladas em meio TSA sólido foram adicionadas ao meio TSA líquido e colocadas sob agitação constante de 120 rpm, durante 24 horas. Havendo a identificação do crescimento (turbamento do meio), 100µL foram transferidos para um disco de 5mm de diâmetro em placa de Petri, contendo meio específico adicionado de uma fonte de carbono (manitol), havendo crescimento em torno do disco, retirou-se o material celular oriundo do crescimento com alça de platina, o material foi colocado em um tubo com 2 mL de

álcool 70% e agitado em vortex, havendo precipitação o teste foi considerado positivo (PAULO, 2010).

2.5 Qualidade fisiológica de sementes de milho e feijão inoculadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal

Sementes de feijão e milho oriundas do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) foram submetidas a delineamento experimental em blocos casualizado com 11 tratamentos (10 isolados bacterianos inoculados e uma testemunha) e quatro repetições de 25 sementes por tratamento. Para tanto, as sementes foram desinfestadas superficialmente com solução de NaOCl 1,0 % por 5 min, seguida de lavagem em água destilada. Para a obtenção do inóculo, colônias puras de bactérias foram incubadas em meio de cultura líquido TSA 10,0 % (Trypcase Soy Agar), sob agitação (120 rpm, por 24 h a temperatura ambiente). Após o crescimento, as culturas bacterianas foram diluídas em solução tampão PBS (8 g L⁻¹ de NaCl; 0,2 g L⁻¹ de KCL; 1,44 g L⁻¹ de Na₂HPO₄; pH 7,4), de forma a atingir densidade óptica de 0,095 (630 nm) (Lima, 2012). As sementes permaneceram imersas nessa solução, por 30 min sob agitação. Posteriormente, realizou-se a semeadura em substrato de papel tipo germitest, umedecido com 2,5 vezes o seu peso com água destilada na forma de rolo e depois mantida em câmara de germinação (B.O.D.), por um período de 7 dias para o milho e 9 dias para o feijão (temperatura de 25 ± 5 °C e sob fotoperíodo de 12 h). O índice de velocidade de emergência (IVE) foi determinado com a contagem diária do número de sementes germinadas (consideradas germinadas aquelas com emissão da radícula) de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), a partir do quarto e quinto dia para milho e feijão, respectivamente, após a semeadura até se estabelecer a emergência, como proposto por Maguire (1962). Para avaliação da promoção do crescimento vegetal realizou-se avaliações em todas as plântulas ao término do período experimental (aos sete dias após a semeadura para milho e nove dias para feijão) (BRASIL, 2009).

Foram avaliadas as seguintes variáveis: comprimento da parte aérea (CA), comprimento da raiz (CR), realizados com auxílio de régua; porcentagem de plântulas anormais (PA), consideradas anormais, plântulas com atrofiamento da raiz, encurvamento do caulículo, queima e escurecimento da radícula. Além das massas da

fitomassa verde (MV) e fitomassa seca de plântula (MS), estas analisadas em balança de precisão, e a secagem do material vegetal realizada em estufa a 60 °C, até alcançar a massa constante, segundo metodologia proposta por Oliveira (2012).

2.6 Análise estatística

Foi aplicada análise de variância (ANOVA) e as médias separadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SISVAR para análise dos dados dos testes de germinação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Promoção de crescimento vegetal

Em relação a produção de ácido índol acético (AIA), a figura 1 apresenta o gradiente de produção.

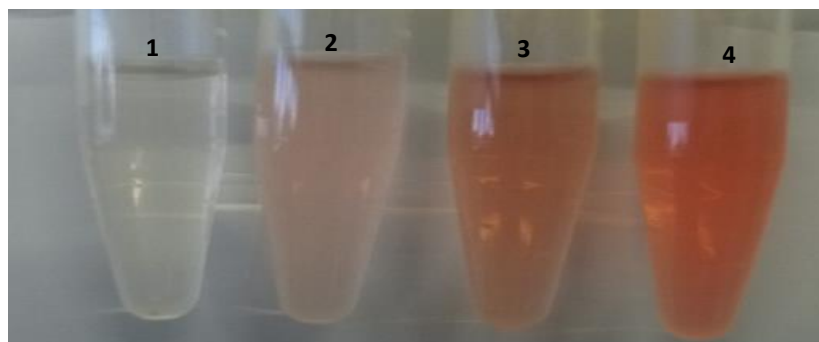


Figura 1. Teste de produção de ácido índol acético (AIA) por bactérias. Gradiente de coloração observado: (1) negativo; (2 a 4) positivo diferentes tonalidades de rósea proporcional à concentração de AIA produzido.

Quando houve a adição do triptofano ao meio, nove linhagens foram capazes de produzir AIA e apenas a linhagem UAGC159 - *Bacillus cereus* não produziu (Figura 2).

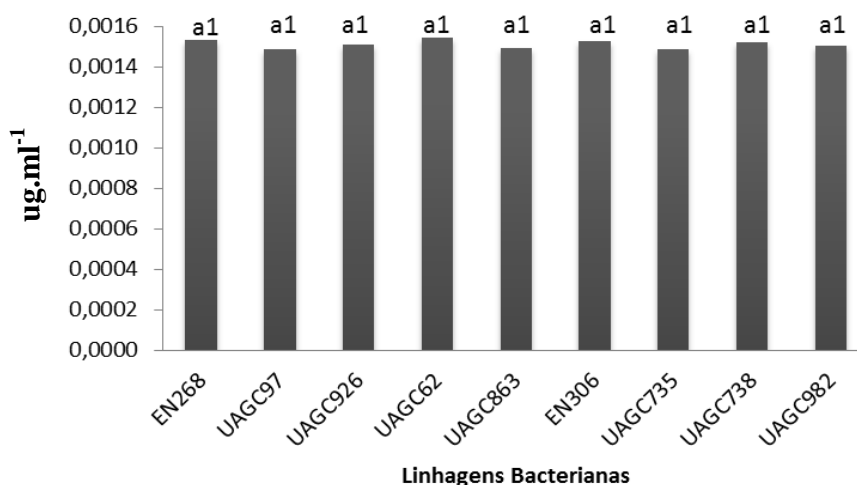


Figura 2. Produção de AIA com adição de triptofano por diferentes gêneros bacterianos. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott à 5% de probabilidade. (EN268 – *Pseudomonas oryzihabitans*, UAGC97- *Pseudomonas* sp., UAGC926- *Stenotrophomonas* sp., UAGC62-*Pantoea* sp., UAGC863-*Bacillus* sp., EN306-*Pantoea* sp., UAGC735-*Rhizobium* sp., UAGC738- *Rhizobium* sp., UAGC982- *Stenotrophomonas* sp.).

Avaliando-se a via de produção de AIA independente de triptofano, apenas as linhagens UAGC62 - *Pantoea* sp., EN306 - *Pantoea* sp., UAGC735 - *Rhizobium* sp. foram positivas (Figura 3).

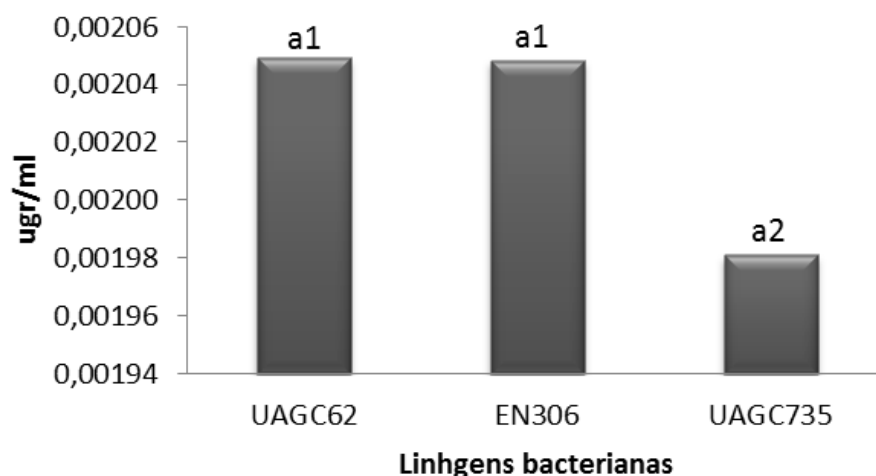


Figura 3. Produção de AIA por via independente de triptofano. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott à 5% de probabilidade. (UAGC62-*Pantoea* sp., EN306-*Pantoea* sp., UAGC735-*Rhizobium* sp.).

Trabalhos com bactérias produtoras de AIA, como os de Marchioro (2005), com gramíneas e outros vegetais, e Costa et al., (2013) com feijão caupi, Pereira et al., (2012) com linhagens oriundas de cana-de-açúcar., e Dartora et al., (2013) em plantas de milho afirmam que a principal via de síntese do AIA por bactérias é a via do triptofano, entretanto o presente trabalho vem confirmar a utilização de vias alternativas como já foi demonstrado por Costa et al., (2013) e Galvão et al., (2012) corroborando com os resultados obtidos neste experimento.

Apesar de algumas linhagens já serem sabidamente solubilizadoras de fosfato inorgânico, optou-se por reavaliá-las no teste semiquantitativo, a fim de melhor caracterizá-las. Foi observado que oito linhagens (EN268 - *P. orizihabitans*, UAGC97 - *Pseudomonas* sp., UAGC62 - *Pantoea* sp., EN306 - *Pantoea* sp., UAGC863 - *Bacillus* sp., UAGC735 - *Rhizobium* sp., UAGC738 - *Rhizobium* sp., UAGC982 - *Stenotrophomonas* sp.). apresentam capacidade de solubilização de fosfato, como demonstrado na figura 4.

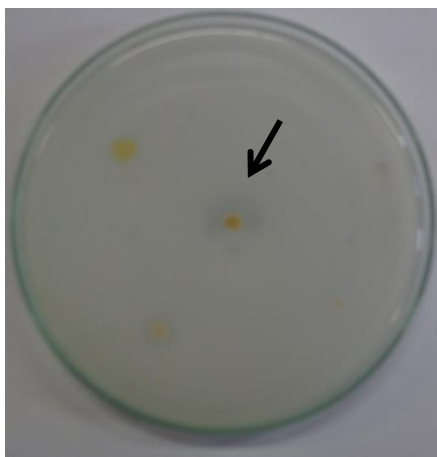


Figura 4. Teste de solubilização de fosfato, a seta indica o halo de solubilização em torno da colônia bacteriana.

Quando avaliado o índice de solubilização, a linhagem UAGC735 (*Rhizobium* sp.) apresentou diferença estatística em relação as demais, apresentando um índice de 3,171. (Figura 5).

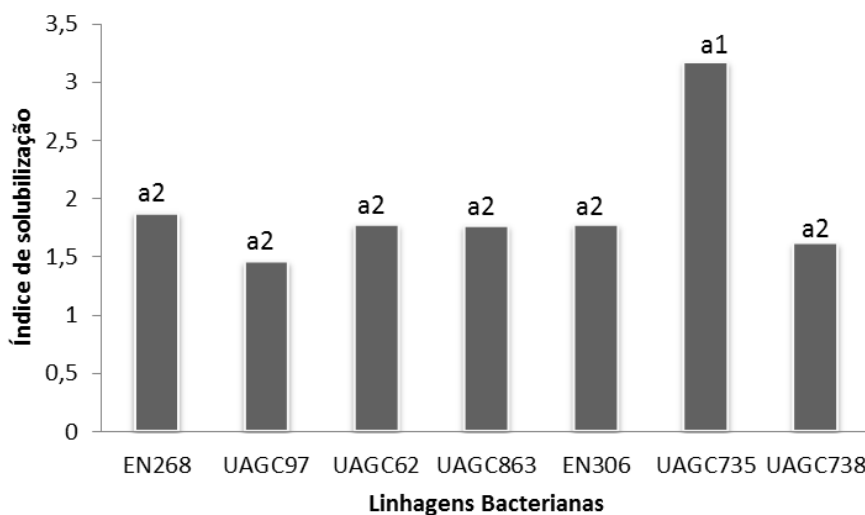


Figura 5. Índice de solubilização de fosfato por diferentes gêneros bacterianos, *in vitro*. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade. (EN268 – *Pseudomonas oryzihabitans*, UAGC97- *Pseudomonas* sp., UAGC62-*Pantoea* sp., UAGC863-*Bacillus* sp., EN306-*Pantoea* sp., UAGC735-*Rhizobium* sp., UAGC738- *Rhizobium* sp.).

As bactérias com capacidade de solubilização de fosfato aumentam a disponibilidade de fosfato lábil (disponível as plantas), promovendo o desenvolvimento vegetal em condições de campo (Verma et al., 2001; Gyaneshwar et al., 2002; Compant et al., 2010). Segundo Shiomi et al. (2009), entre os gêneros de bactérias mais eficientes na solubilização de fosfatos inorgânicos destacam-se *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*, estando tais resultados de acordo com nosso experimento.

A literatura relata que a capacidade dos micro-organismos em realizar a solubilização de fosfato está ligada aos ciclos biogeoquímicos (Reith et al., 2007). Souza et al., (2007) relatam que há maior disponibilidade de fosfato depende da fonte de fosfato utilizada e do aumento do pH do meio. A solubilização de fosfato também é dita como uma característica fenotípica bacteriana que é geralmente utilizada para a caracterização de micro-organismos correlacionados com a promoção de crescimento das plantas (Dias et al., 2009; Jha et al., 2011).

Segundo Shiomi et al., (2009), as bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico vêm recebendo a atenção dos pesquisadores, principalmente, pela possibilidade de seu emprego em programas de interação com bactérias fixadoras de N₂. Ainda segundo estes autores, entre os gêneros de bactérias mais eficientes na solubilização de fosfatos inorgânicos destacam-se *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Rhizobium* sp..

Para avaliação da produção de exopolissacarídeos, apenas as linhagens UAGC159 (*Bacillus cereus*), UAGC62 – (*Pantoea* sp.), EN306 - *Pantoea* sp. produziram EPS nas condições utilizadas. A figura 6 demonstra a produção de EPS em torno da colônia bacteriana em placa de Petri, bem como a confirmação da positividade em tubo de ensaio contendo álcool a 70,0%.

A produção de EPS pelos micro-organismos pode auxiliar na sobrevivência da planta, esses açúcares acumulam em torno das células bacterianas, permitindo que a planta suporte determinados tipos de estresses ambientais como a seca, por temperatura e hídrico (Barreto et al., 2011; Kavamura, 2012;).

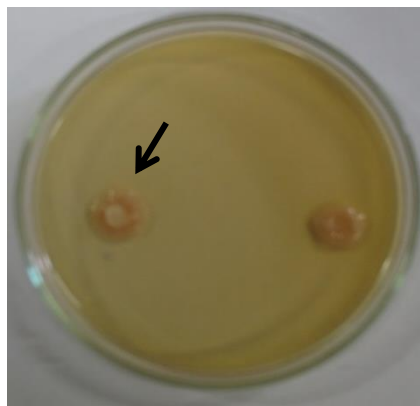


Figura 6. Produção de exopolissacarídeos por diferentes gêneros bacterianos.

A identificação de linhagens positivas para solubilização de fosfato, produção de exopolissacarídios (EPS) e produtoras de ácido índol acético (AIA) com e sem adição de triptofano são apresentadas na tabela 3.

Tabela 2. Características qualitativas de linhagens avaliadas no teste de promoção de crescimento vegetal

Sigla	Gênero	Fosfato	EPS*	AIA/CT**	AIA/ST***
UAGC159	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	-
EN268	<i>P. oryzihabitans</i>	+	-	+	-
UAGC97	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	+	-
UAGC926	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	-	+	-
UAGC62	<i>Pantoea</i> sp.	+	+	+	+
EN306	<i>Pantoea</i> sp.	+	+	+	+
UAGC863	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	+	-
UAGC735	<i>Rhizobium</i> sp.	+	+	+	+
UAGC738	<i>Rhizobium</i> sp.	+	-	+	-
UAGC982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	+	-	+	-

*Exopolissacarídios

**Ácido Indol Acético com adição de triptofano

*** Ácido Indol Acético sem adição de triptofano

3.2 Inoculação em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

A avaliação do teste de germinação em feijão demonstrou que não houve diferença significativa para a porcentagem de germinação pelo teste de Scott Knott a

5% de probabilidade, mesmo não havendo diferença significativa quando observado os valores *Pantoea* sp. (tratamento 5) apresentou 92% de germinação. O índice de velocidade de germinação também não demonstrou diferença estatística no teste realizado. Os dados são apresentados na (tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação de sementes de feijão,

Tratamentos	% Germinação	IVG*
T1	84,00 a1	4,191 a1
T2	81,00 a1	3,921 a1
T3	90,00 a1	4,414 a1
T4	83,00 a1	4,050 a1
T5	92,00 a1	4,500 a1
T6	88,00 a1	4,300 a1
T7	82,00 a1	3,907 a1
T8	84,00 a1	4,114 a1
T9	80,00 a1	3,900 a1
T10	89,00 a1	4,350 a1
T11	84,00 a1	4,100 a1
CV%	10,41	10,14

*Índice de Velocidade de Emergência

Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Dentre as variáveis analisadas apenas a massa fresca da raiz apresentou diferença estatística a 5,0% de probabilidade (Tabela 4), com o tratamento 5 (*Pantoea* sp.) apresentando o maior valor 0,222g, valendo salientar que a linhagem é positiva para todos os testes avaliados neste trabalho, outra característica que merece destaque é que a linhagem produz AIA tanto na presença quanto na ausência de triptofano, sabe-se que esse fitormônio estimula a alongação de raízes, além de auxiliar na diferenciação celular (Taiz; Zeiger, 2004), o que pode explicar tal resultado. No entanto esta não diferiu estatisticamente de T2 (*Pseudomonas orizihabitans*), T4 e T10 (*Stenotrophomonas* sp.), T6 (*Bacillus* sp.) T7 e T8 (*Rhizobium* sp), o que demonstra que todos os gêneros influenciaram positivamente esta variável, nas condições apresentadas.

Oliveira et al. (2014) comenta o uso de linhagens de *Pantoea* sp. na produção de insumos agrícolas que promovem crescimento vegetal. Costa et al. (2013) identificou bactérias do gênero *Pantoea* sp. em nódulos de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.), o

que demonstra a relação entre o vegetal e esse gênero bacteriano. Coattia et al. (2010), trabalhando com rizóbios isolados de nódulos de feijão encontraram 100,0%, de produção de AIA nas linhagens avaliadas com a adição do aminoácido triptofano. Fernandes et al., (2013) observou que linhagens de rizóbios quando inoculadas em feijão além de características de promoção de crescimento vegetal também atuam no controle do *Meloidogyne javanica* um dos principais problemas fitossanitários na cultura do feijoeiro.

Tabela 4. Massa fresca, seca e comprimento de raízes e parte aérea de sementes de feijão.

Tratamentos	Massa Fresca (g)		Massa Seca (g)		Comprimento (cm)	
	Raiz	P. Aérea	Raiz	Raiz	P. Aérea	Raiz
T1	0,159 a3	0,632 a1	0,215 a1	2,380 a1	12,991 a1	8,240 a1
T2	0,211 a1	0,741 a1	0,230 a1	2,297 a1	13,651 a1	10,741 a1
T3	0,187 a2	0,664 a1	0,245 a1	2,515 a1	13,762 a1	9,406 a1
T4	0,206 a1	0,698 a1	0,257 a1	2,375 a1	13,171 a1	8,802 a1
T5	0,222 a1	0,725 a1	0,255 a1	2,432 a1	13,915 a1	9,743 a1
T6	0,206 a1	0,691 a1	0,255 a1	2,465 a1	13,321 a1	9,200 a1
T7	0,198 a1	0,726 a1	0,215 a1	2,432 a1	14,091 a1	8,646 a1
T8	0,204 a1	0,688 a1	0,227 a1	2,255 a1	12,290 a1	8,277 a1
T9	0,185 a2	0,720 a1	0,242 a1	2,415 a1	12,674 a1	8,193 a1
T10	0,210 a1	0,726 a1	0,235 a1	2,430 a1	13,872 a1	8,992 a1
T11	0,175 a2	0,705 a1	0,220 a1	2,470 a1	12,092 a1	8,186 a1
CV%	7,53	8,00	16,85	9,87	8,72	12,87

Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott à 5% de probabilidade.

3.3 Inoculação em milho (*Zea mays* L.)

Considerando a inoculação em sementes de milho, não houve diferença estatística na porcentagem de germinação, ficando a média em torno de 99,0% de germinação. Avaliando o índice de velocidade de germinação mais uma vez não ocorreu diferença significativa pelo teste de Scott Knott a 5,0% de probabilidade (Tabela 5).

Quando avaliada massa das raízes, não houve diferença estatística para massa fresca. Contudo, para avaliação da massa seca, os tratamentos 9 (*Rhizobium* sp.) e 10 (*Stenotrophomonas* sp.) apresentaram um incremento significativo, quando comparado ao tratamento controle (T11). Foi observado também que as outras linhagens

influenciaram negativamente a massa seca da raiz (Tabela 6). Considerando a parte aérea, a massa fresca foi influenciada positivamente pelos tratamentos 1, 4, 6, 7, 8, 9, e 10. Em relação ao massa seca, apenas o T2 (*P. oryzihabitans*) não estimulou ganho nessa característica e os tratamentos T3 (*Pseudomonas* sp.), T4 (*Stenotrophomonas* sp.) e T6 (*Pantoea* sp.) destacaram-se.

Tabela 5. Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação de sementes de milho

Tratamentos	% Germinação	IVG
T1	25,00 a1	4,191 a1
T2	24,25 a1	3,921 a1
T3	24,75 a1	4,414 a1
T4	24,25 a1	4,050 a1
T5	24,50 a1	4,500 a1
T6	24,75 a1	4,300 a1
T7	24,50 a1	3,907 a1
T8	24,00 a1	4,114 a1
T9	24,75 a1	3,900 a1
T10	24,50 a1	4,350 a1
T11	24,75 a1	4,100 a1
CV%	2,19	10,14

*Índice de Velocidade de Emergência

Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Estudos vêm sendo realizados para avaliar os benefícios da inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal na germinação de semente de gramíneas. Ramamoorthy et al. (2000) constataram incremento no percentual de germinação em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) de lotes com alto e baixo vigor, inoculados com *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense*.

O gênero *Rhizobium* é amplamente difundido em literatura por apresentar capacidade de produção de AIA tanto pela via que utiliza o aminoácido triptofano como precursor quanto por vias alternativas (Coattia et al., 2010; Costa et al., 2013,)

Todas as linhagens que promoveram incremento são produtoras de AIA. Os micro-organismos capazes de produzir auxina podem exercer amplo efeito sobre o desenvolvimento da planta, incluindo benefícios na germinação, emergência e crescimento vegetal (Araújo et al., 2013; Mia et al., 2012). Com a melhoria do

desenvolvimento e arquitetura do sistema radicular, as plantas infectadas elevam sua capacidade de absorção de água e de nutrientes do solo e por consequência, aumentam seu desenvolvimento e as chances do estabelecimento da cultura (Malhotra & Srivastava, 2009; Puente et al., 2009; Machado et al., 2013).

Tabela 6. Massa fresca, seca e comprimento de raízes e parte aérea de sementes de milho, letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Tratamentos	Massa Fresca		Massa Seca		Comprimento	
	Raiz	P. Aérea	Raiz	P. Aérea	Raiz	P. Aérea
T1	0,312 a1	0,703 a1	0,024 a4	0,257 a2	13,094 a2	5,523 a1
T2	0,294 a1	0,611 a2	0,022 a4	0,224 a3	13,179 a2	5,711 a2
T3	0,313 a1	0,656 a2	0,027 a3	0,266 a1	12,850 a2	5,047 a2
T4	0,339 a1	0,684 a1	0,028 a2	0,266 a1	13,783 a2	5,532 a2
T5	0,319 a1	0,640 a2	0,026 a3	0,252 a2	14,317 a1	5,942 a2
T6	0,339 a1	0,724 a1	0,024 a4	0,234 a1	14,548 a1	5,821 a2
T7	0,377 a1	0,731 a1	0,031 a2	0,255 a2	15,197 a2	5,920 a2
T8	0,324 a1	0,727 a1	0,030 a2	0,255 a2	13,651 a2	6,135 a2
T9	0,332 a1	0,751 a1	0,032 a1	0,255 a2	13,937 a2	6,915 a1
T10	0,349 a1	0,686 a1	0,035 a1	0,251 a2	15,129 a1	7,313 a1
T11	0,307 a1	0,603 a2	0,029 a2	0,224 a3	12,866 a2	5,681 a2
CV%	8,88	9,15	6,61	3,32	6,30	9,86

Houve diferença quanto a massa fresca e seca de raízes de milho. Conceição et al. (2008), ao avaliar plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas, concluíram que a introdução das bactérias promoveu maior desenvolvimento da parte aérea das plantas, sem interferir na matéria seca da mesma, fato atribuído, à ação das mesmas sobre o alongamento celular, pela turgescência vacuolar. Entretanto, resultados divergentes foram encontrados por Kim et al. (2012), com a inoculação promovendo aumento de 50,0 % na massa fresca em plântulas de *P. virgatum* e Kelemu et al. (2011), observaram incremento na massa de raiz e parte aérea de *B. brizantha* CIAT 6294, cultivar Marandu, inoculadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal.

4 CONCLUSÕES

Diferentes gêneros bacterianos (*Bacillus* sp., *Pantoea* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Rhizobium* sp. e *Pseudomonas* sp.) influenciaram positivamente o processo de germinação de milho e feijão, apresentando potencial para promoção de crescimento vegetal em experimentos de casa de vegetação e campo.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIZADEH, H.; BEHBOUDI, K.; AHMADZADEHA, M.; JAVAN-NIKKHAHA, M.; ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. **Biological Control**, v.65, p.14-23, 2013.
- ARAUJO, F. F.; PEDROSO, R. A. B. Interação de *Bacillus* sp. com a rizosfera de três espécies de plantas forrageiras. **Bioscience Journal**, v.29, n.1, p.152-158, 2013.
- ARMENTA-BOJORQUEZ, A.D.; GUTIERREZ, C.G.; BAEZ, J.R.C.; SÁNCHEZ, M. Á. A., MONTOYA, L. G., & PÉREZ, E. N. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. **Ra Ximhai**, v.6, p.51-56, 2010.
- BARBOSA, M. V. **Interação entre bactérias produtoras de auxinas e diferentes variedades de cana-de-açúcar (*Saccharums spp.*) cultivadas em Pernambuco. Garanhuns: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2010. 60p. Monografia de conclusão de curso.**
- BARRETO, M. C. S.; FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; SILVA, M. L. R. B.; LIMA-FILHO, J. L. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira Agrociência**, v.17, n.2-4, p.221-227, 2011.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. 2009. 399p. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa/ACS. Brasília.
- BENEDUZI, A; MOREIRA, F.; COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J. I.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the south of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.3, p. 94-104, 2013.
- BENIN, G.; CARVALHO, F. I. F.; ASSMANN, I. C.; CIGOLINI, J.; CRUZ, P. J.; MARCHIORO, V. S.; LORENCETTI, C.; SILVA, J. A. G. Identificação da dissimilaridade genética entre genótipos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo preto. **Revista Brasileira Agrociência**, v.8, n.3, p.179-184, 2002.
- BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L., & SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.64, p.807-838, 2013.

- CAMPOS, V.; TILLMANN, M. A. A. Avaliação da metodologia do teste de germinação para sementes de tomate. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.3, n.1, p.37-42, 1997.
- COATTIA, G. C.; ANDRADEB, D. S.; CARDOSO, J. D.; MATOS, M. A. Produção de AIA e Diversidade Fenotípica de Estirpes Elite de Rizóbio Isoladas de Feijoeiro. **Ciências Biológicas Saúde**, v.12, n.1, p.49-53, 2010.
- COMPANT, S; CLÉMENT, 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.30, p.669-678, 2010.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/index.php>>. Acesso em: 18 dez. 2014.
- CONCEIÇÃO, P.M.; DUARTE VIEIRA, H.D.; CANELLAS, L.P.; MARQUES JÚNIOR, R.B.; OLIVARES, F.L. Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.545-548, 2008.
- COSTA, D. P. **Mecanismos de interação entre bactérias endofíticas e plantas de cana-de-açúcar**. Garanhuns: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2010. 98p. Monografia de conclusão de curso
- COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.9, p.1275-1284, 2013.
- CRIOLLO, P. J.; OBANDO, M.; SÁNCHEZ, L. M.; BONILLA, R. Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a Pennisetum clandestinum en el altiplano cundiboyacense. **Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v.13, n.2, p.189-195, 2012.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indóis in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.

- DARTORA, J.; MARINI, D.; GUIMARÃES, V. F.; PAULETTI, D. R.; SANDER, G. Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plantas de milho e trigo inoculadas com estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. **Global Science and Technology**, v.6, n.3, p.190-201, 2013.
- DEAKER, R.; ROUGHLEY, R.J.; KENNEDY, I.R. Legume seed inoculation technology—a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.1275-1288, 2004.
- DIAS, A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPÇÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. World. **Journal Microbiological Biotechnologic**. 25:189-195, 2009.
- EGAMBERDIYEVA, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. **Applied Soil Ecology**, v.36, p.184-189, 2007.
- FANG-BO, Y.; ALI, S. W.; JING-YA, S.; LIN-PING, L. Isolation and Characterization of an Endosulfan-Degrading Strain, *Stenotrophomonas* sp. LD-6, and its Potential in Soil Bioremediation. **Polish Journal of Microbiology**, v.61, n.4, p.257-262, 2012.
- FARIAS, A. R. B.; LIMA, D. R. M.; LIRA-CADETE, LUANA.; RAMOS, A. P. S.; SILVA, M. C. de B., FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Promoção de crescimento vegetal de feijão comum por bactérias isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v.17, p.101-104, 2012.
- FERNANDES, R. H.; LOPES, E. A.; VIEIRA, B. S.; BONTEMPO, A. F. Controle de *Meloidogyne javanica* na Cultura do Feijoeiro com Isolados de *Bacillus* spp. **Revista Tropica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v.7,n.1, 2013.
- FERRARA, F.I.S.; OLIVEIRA, Z.M.; GONZALES, H.H.S.; FLOH, E.I.S.; BARBOSA, H.R. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant Soil**, v.347, p.381-400, 2011.
- FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, JA DE A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Embrapa Informação Tecnológica; Teresina, PI: Embrapa Meio-Norte, 2005.

- GALVÃO, P. G. **Análise proteômica de estirpes selvagem PAL5 e mutante lao- de *Gluconacetobacter diazotrophicus* na presença e ausência de triptofano e o efeito de sua inoculação em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar.** Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012. 147p. Tese de Doutorado.
- 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.
- HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, 34: 343 – 357. 2004.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International Rules for Seed Testing. **Seed Science & Technology**, 21, Supplement, 1993. 288 p.
- JHA, B.; GONTIA, I.; HARTMANN, A. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. **Plant Soil**. 346:1-400, 2011.
- JIAN-FENG, L.; SHU-QING, Z.; PING-HUI, H.; SHANG-LI, S.; YANG-YANG, M. Effect of phosphate solubilizing rhizobium and nitrogen fixing bacteria on growth of alfalfa seedlings under P and n deficient conditions. **Pakistan Journal Botany**, v.45, p.1557-1562, 2013.
- KAPLAN, L.; Archeology and domestication in American Phaseolus (beans). **Econ. Bot.**, 19:358, 1965.
- KASIM, W.A.; OSMAN, M.E.; OMAR, M.N.; EL-DAIM, I.A.A.; BEJAI, S.; MEIJE, J. Control of drought stress in wheat using plant-growth-promoting bacteria. **Journal Plant Growth Regul**, v.32, p.122-130, 2013.
- KAVAMURA, V. N. **Bactérias associadas as cactácias da caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico.** Piracicaba: Universidade de São Paulo- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2012. 246p. Tese de doutorado.
- KELEMU, S.; FORY, P.; ZULETA, C.; RICAURTE, J.; RAO, I.; LASCANO, C. Detecting bacterial endophytes in tropical grasses of the *Brachiaria* genus and

- determining their role in improving plant growth. *African Journal of Biotechnology*, v.10, p.965-976, 2011.
- KIM, S.; LOWMAN, S.; HOU, G.; NOWAK, J. et al. Growth promotion and colonization of switch grass (*Panicum virgatum*) cv. Alamo by bacterial endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Biotechnology for Biofuels*, v.5, p.1-10, 2012.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J. ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANIKLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, v.6, p.1244-1251, 2004.
- LIMA, D. R. M. **Bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012. 106p. Dissertação de mestrado.
- LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A.R.B. RAMOS, A.P.S. et al. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. *Bioscience Journal*, v.28, p.122-129, 2012.
- LOIRET, F. G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODES, P.; RODES, R.; DONG, Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *Journal of Applied Microbiology*, v.97, p.504-511, 2004.
- MACHADO, R.G.; SÁ, E.L.S.; BRUXEL, M.; GIONGO, A.; SANTOS, N.S.; NUNES, A.S. Indoleacetic acid producing rhizobia promote growth of tanzania grass (*Panicum maximum*) and pensacola grass (*Paspalum sauriae*). *International Journal of Agriculture & Biology*, v.15, p.827-834, 2013.
- MALUSA, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers, *The Scientific World Journal*, v.101, p.201-213, 2012.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. *Crop Science*, v.2, p.176-177, 1962.
- MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. Stress-responsive indol-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *European Journal of Soil Biology*, v.45, p.73-80. 2009.

- MARCHIORO, T.E.L. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005, 74p. Tese de doutorado.
- MASCIARELLI, O.; URBANI, L.; REINOSO, H.; LUN, V. Alternative Mechanism for the Evaluation of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production by *Azospirillum brasilense* Strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of Microbiology**, v.51, p.590-597, 2013.
- MAPA - MINISTERIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em 02 de janeiro de 2015.
- MERZAEVA, O.V.; SHIROKIKH, I.G. The production of auxins by the endophytic bacteria of winter rye. **Applied Biochemist Microbiology**, v.46, p.44-50, 2010.
- MENDOZA, L. H. L. Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de las enterobacterias aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.). **Scientia Agropecuaria**, v.5, p.177-185, 2013.
- MIA, M.A.B.; SHAMSUDDIN, Z.H.; MAHMOOD, M. Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice. **African Journal Biotechnol**, v.16, p.37-58, 2012.
- OLIVEIRA, M. A.; ZUCARELLI, C.; SPOLAOR, L. T.; DOMINGUES, A. R.; FERREIRA, A. S. Composição química dos grãos de milho em resposta à adubação minerale inoculação com rizobactérias. **Revista Ceres**, v.59, n.5, p.709-715, 2012.
- OLIVEIRA, A. L. M.; COSTA, K. R.; FERREIRA, D. C.; MILANI, K. M. L.; SANTOS, O. J. A. P.; SILVA, M. B.; ZALUAGA, M. Y. A. Biodiversidade bacteriana do solo e agricultura sustentável. **Biochemistry and Biotechnology reports**, v.3, n.1, p. 56-77, 2014.
- PATIL, S. M.; PATIL, D. B.; PATIL, M. S.; GAIKWAD, P. V.; BHAMBURDEKAR, S. B.; PATIL, P. J. Isolation, characterization and salt tolerance activity of *Rhizobium* sp. from root nodules of some legumes. **International Journal of Current Microbiology Applied Sciences**, v.3, n.5, p.1005-1008, 2014.
- PAULO, E. M. **Encapsulamento de *Lactobacillus acidophilus* por atomização em spray drying, utilizando exopolissacarídios (EPS) produzidos por bactérias**

- láticas**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010. 222p. Tese de doutorado.
- PEREIRA, A. P. A.; SILVA, M. C. B.; OLIVEIRA, J. R. S.; RAMOS, A. P. S.; FREIRE, M. B. G. S.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia* spp. endofíticas de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v.28, p.112-121, 2012.
- PUENTE, M.L.; GARCIA, J.E.; ALEJANDRO, P. Effect of the bacterial concentration of *Azospirillum brasilense* in the inoculum and its plant growth regulator compounds on crop yield of corn (*Zea mays* L.) in the field. **World Journal of Agricultural Science**, v.5, p.604-608, 2009.
- RAMOS, A. P. S. **Bactérias associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco: Diversidade genética e produção de ácido indol acético**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2011. 128p. Dissertação de Mestrado.
- REITH, F.; LENGKE, M. F.; FALCONER, D.; CRAW, D.; SOUTHAM, G. The geomicrobiology of gold. **The International Society for Microbial Ecology (ISME) Journal**. 1: 567-584, 2007.
- RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.M.; MCNEILL, A.M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant Soil**, v.321, p.305-339, 2009.
- RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; MEDEIROS, V. V.; BARROS, B. G. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Resposta da co - inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 196-202, 2012.
- ROESCH, L. F.; CAMARGO, F. O.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, v.35 n.5, p.1201-1204, 2005.
- SALLA, D. A.; FURLANETO, F. P. B.; CABELLO, C.; KANTHACK, R. A. D. Estudo energético da produção de biocombustível a partir do milho. **Ciência Rural**, v.40, p.2017-2022, 2010.

- SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v.28, p.142-149, 2012.
- SANTOS, I. B. **Bactérias associadas a plantas de cana de açúcar : Diversidade genética e promoção de crescimento vegetal**. Garanhuns: Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2015. 106p. Dissertação de mestrado.
- SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; AZAMBUJA, A.C.; GRANADA, C.E.; GABIATTI, N.C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.658-664, 2008.
- SHIOMI, H. F.; VICENSI, M.; DEDORDI, C.; OLIARI, Í.C.R. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico, presentes em líquido ruminal bovino. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 4, p. 294–297, 2009.
- SILVA, M. F.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; REIS, V. M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.11, p.1437-1443, 2009.
- SILVA, M. O. **Bactérias associadas a cana-de-açúcar: Isolamento e potencial promoção do crescimento vegetal**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2011. 69p. Tese de Doutorado.
- SILVA, A. V. **Eficiência simbiótica da inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de Gliricidea**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2013. 57p. Dissertação de mestrado.
- SILVI, S.; BARGHINI, P.; AQUILANTI, A.; JUAREZ-JIMENEZ, B.; FENICE, M. Physiologic and metabolic characterization of a new marine isolate (BM39) of *Pantoea* sp. producing high levels of exopolysaccharide. **Microbial Cell Factories**, v.12, n.10, p.1-11, 2013.

- SOUZA, C. E. S.; SILVA, M. O.; DUDA, G. P.; MENDES, A. M. S. M. Solubilização de fósforo de fertilizantes fosfatados após tratamento com diferentes resíduos orgânicos. **Revista de biologia e ciência da terra**. 7: 120-126, 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3ª ed. Porto Alegre: Guanabara Koogan, 2004, p.454-460.
- TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACHEMBRUCH, F.; REIS, V.M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant Soil**, v.10, p.1007-1023, 2011.
- VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonizationability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v.91, p.127-141, 2001.

CAPÍTULO II

Desenvolvimento do milho (*Zea mays* L.) associado com diferentes gêneros bacterianos potencialmente promotores de crescimento vegetal

RESUMO

A promoção de crescimento vegetal é um dos vários processos obtidos a partir da interação bactéria-planta. As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) são encontradas em habitats naturais, e colonizam de forma interna e externa órgãos e tecidos vegetais. Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atuação de diferentes gêneros bacterianos em milho aos 45 e 75 dias de cultivo em casa de vegetação. Para tanto, sementes foram inoculadas com diferentes linhagens UAGC863 (*Bacillus* sp.), UAGC982 (*Stenotrophomonas* sp.), UAGC738 (*Rhizobium* sp.) e UAGC62 (*Pantoea* sp.) e ainda um tratamento com NPK e um controle (sem inóculo). O experimento foi instalado em casa de vegetação em área da Unidade Acadêmica de Garanhuns, o semeio foi feito em vasos de plástico com volume de 10 litros contendo solo, foram adicionadas cinco sementes por vaso e feito o desbaste aos 15 dias. Durante todo o experimento a irrigação foi feita de acordo com a capacidade de campo e foram realizados tratos culturais para o bom funcionamento do experimento. Foram analisadas altura, número de folhas, diâmetro de colmo, massa fresca e seca de raiz e parte aérea e comprimento de raiz e parte aérea. Foi observado que os gêneros *Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Rhizobium* sp. e *Pantoea* sp. possuem potencial para promoção de crescimento vegetal nas condições analisadas incrementando altura, comprimento e massa seca de plantas de milho. A linhagem UAGC738 (*Rhizobium* sp.) foi a única superior ao tratamento químico para massa seca de parte aérea aos 45 dias de cultivo. Na comparação em relação ao controle (sem inóculo) altura, massa fresca e seca de raiz foram significativos aos 45 dias de cultivo. E que quando aos 75 dias de cultivo o tratamento contendo o mix das quatro linhagens apresentou maior incremento em relação a inoculação de apenas um inóculo.

ABSTRACT

The promotion of plant growth is one of several processes derived from the bacteria-plant interaction. The bacteria that promote plant growth (BPCPs) are found in natural habitats, and colonize internal and external organs and plant tissues form. Therefore, this study aimed to evaluate the performance of different bacterial genera in corn after 45 days of cultivation in the greenhouse. Therefore, seeds were inoculated with different strains UAGC863 (*Bacillus* sp.), UAGC982 (*Stenotrophomonas* sp.), UAGC738 (*Rhizobium* sp.) And UAGC62 (*Pantoea* sp.) And even a treatment with NPK and control (without inoculum). The experiment was conducted in a greenhouse in the area of Academic Unit of Garanhuns, sowing was done in plastic pots with a volume of 10 liters containing soil were added five seeds per pot and made the thinning at 15 days throughout the experiment irrigation was done according to field capacity and were held cultural practices for the proper functioning of the experiment. Height were analyzed, number of leaves, stem diameter, fresh and dry weight of root and shoot and root length and shoot. It was observed that *Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Rhizobium* sp. and *Pantoea* sp. have the potential to promote plant growth under the conditions examined increasing height, length and dry weight of maize plants. he UAGC738 strain (*Rhizobium* sp.) Was the only superior to chemical treatment for dry weight of shoots at 45 days of cultivation.. Compared to the control (without inoculum) height, fresh and dry weight of root were significant at 45 days of cultivo. E that when after 45 days of cultivation treatment containing the mix of the four strains showed higher increase compared to inoculation only one inoculum.

1 INTRODUÇÃO

O vegetal é um amplo e diversificado nicho para colonização bacteriana (Compant et al., 2010), podendo habitar diversos órgãos vegetais, como raízes, caules, folhas, sementes, frutos, pólen, e dentro de nódulos de leguminosas (Rosenblueth; Martínez-Romero, 2006; Magnani et al., 2010). As bactérias já foram isoladas de uma ampla variedade de plantas, como as gramíneas, cana-de-açúcar (Pereira et al., 2012), trigo (Spaepen et al., 2008), milho (Szilagyi-Zecchin et al., 2014), gramíneas forrageiras (Reis Junior et al., 2008; Dubeux et al., 2014), cactáceas, como a palma forrageira (Lyra et al., 2013), *Mammillaria fraileana* (Lopez et al., 2012) e em leguminosas, como gliricídia (Jalonen et al., 2009), soja (Kuklinsky-Sobral et al., 2004), sabiá (Freitas et al., 2010) e alfafa (Martínez et al., 2014).

O milho (*Zea mays* L.) é uma das gramíneas mais cultivadas no mundo, sendo considerada uma das culturas mais antigas e estudadas (Schneider et al., 2012). Pertence à família *Poaceae*, constitui-se em um dos principais cereais, por possuir alto potencial produtivo, por sua composição e valor nutritivo (Fancelli; Dourado Neto, 2004). O United States Department of Agriculture (USDA) prevê, em seu 9º levantamento da safra mundial de milho 2014/15, uma produção global de 988,1 milhões de toneladas, deste total o Brasil representa 75 milhões de toneladas o que lhe garante o quarto lugar na produção mundial. Do seu total de produção 19,5 toneladas são estimadas para exportação (FIESP, 2015). Além de ser considerada uma cultura de subsistência do Nordeste brasileiro (Brito et al., 2012). Muitos são os trabalhos que demonstram os benefícios da interação desta gramínea com bactérias: solubilização de fosfato por *Pseudomonas fluorescens* (Chaves et al., 2013) e incremento nos teores de potássio também por *Pseudomonas fluorescens* (Oliveira et al., 2012).

A promoção de crescimento vegetal é um dos vários processos obtidos a partir da interação bactéria-planta, as bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) são encontradas em habitats naturais, e colonizam de forma interna e externa órgãos e tecidos vegetais (Compant et al., 2010). Micro-organismos como bactérias que habitam o interior dos tecidos vegetais podem acarretar efeitos positivos através da promoção de crescimento vegetal, seja por meio da disponibilização de nutrientes,

produção de reguladores de crescimento vegetal, efeito antagônico a patógenos ou produção de antibióticos (Rosenblueth; Martinez-Romero, 2006;).

Dentre estes processos os micro-organismos podem atuar com a fixação biológica de nitrogênio (Moreira et al., 2010; Vitorazi Filho et al., 2012), produção de fitohormônios como o ácido índol acético (AIA), e solubilização do fosfato inorgânico existente no solo, de forma a deixá-lo disponível para os vegetais (Speapen et al., 2008). Tais características tem por consequência a diminuição do uso de adubos químicos, o que representa benefícios econômicos além de minimizar impactos de fertilizantes sobre o meio ambiente (Farias et al., 2012; Lira-Cadete et al., 2012; Pereira et al., 2012; Santos et al., 2012).

Diversos são os gêneros bacterianos com características de crescimento vegetal, Telke et al. (2011) e Ladeira et al. (2012) mostraram atuação de linhagens do gênero *Bacillus sp.* na produção de enzimas para diferentes finalidades. Li et al. (2008) observaram que linhagens do gênero *Pantoea sp.* isoladas de plantas de soja tem características para fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de ácido índol acético. Alizadeh et al. (2013) verificou a capacidade de resistência a insetos por meio de bactérias do gênero *Pseudomonas sp.* em pepino. Patil et al. (2014) observaram bactérias do gênero *Rhizobium sp.* com características para tolerância a salinidade o que pode auxiliar o desenvolvimento de plantas submetidas a tais condições. Estudos de Fang-Bo et al. (2012) encontraram características na degradação de endosulfan (inseticida altamente tóxico) do solo por *Stenotrophomonas sp.* demonstrando assim seu potencial para biorremediação.

Portanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atuação de diferentes gêneros bacterianos promotores do crescimento de plantas em milho aos 45 e 75 dias de cultivo em casa de vegetação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas quatro linhagens bacterianas isoladas de raízes de cana-de-açúcar de diferentes gêneros: UAGC863 (*Bacillus* sp.), UAGC62 (*Pantoea* sp.), UAGC738 (*Rhizobium* sp.) e UAGC982 (*Stenotrophomonas* sp.). As mesmas pertencem à coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE). A tabela 1 apresenta os tratamentos e as respectivas características das linhagens utilizadas.

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas no teste de promoção de crescimento em plantas de milho

Tratamento	Gênero	Código	Referências Isolamento	Características
Tratamento 1	<i>Bacillus</i> sp.	UAGC863	Lima, 2012	FBN/AIA/P
Tratamento 2	<i>Pantoea</i> sp.	UAGC62	Silva, 2011	FBN/EPS
Tratamento 3	<i>Rhizobium</i> sp.	UAGC738	Costa, 2010	FBN/P/AIA
Tratamento 4	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	UAGC982	Ramos,2011	AIA/P
Tratamento 5*	Mix			
Tratamento 6	NPK			
Tratamento 7	Sem inóculo			

*Linhagens dos tratamentos um, dois, três e quatro.

- NPK – Nitrogênio, fosforo e potássio

- AIA=Produtora de ácido índol acético; P= Solubilizadora de Fosfato Inorgânico; FBN= Fixação Biológica de Nitrogênio

2.2 Cultivo bacteriano

As linhagens bacterianas foram repicadas em placas de Petri contendo meio TSA (Trypcase Soy Agar), para obtenção de colônias isoladas. Em seguida, colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de TSA líquido e incubadas por 24 horas sob agitação constante (120 rpm).

2.3 Sementes de milho (*Zea mays* L.)

As sementes utilizadas são da variedade São José, cultivar rústica para o semiárido e regiões similares. É uma cultivar desenvolvida por pesquisadores do IPA

(Instituto Agronômico de Pernambuco) e vem sendo mantida por meio de seleção nas Estações Experimentais do IPA, visando à estabilidade de produção e fixação de características agronômicas de interesse (IPA, 2014).

2.4 Inoculação em milho avaliado aos 45 e 75 dias de desenvolvimento da cultura do milho

Foram estabelecidos sete tratamentos, quatro em sistema de cultivo único (uma linhagem apenas), um mix (mistura das quatro linhagens em apenas um tratamento), um controle absoluto (sem presença de inóculo bacteriano ou de qualquer outro tratamento) e um controle adicional (contendo nitrogênio, fosforo e potássio com quantidades estimadas diante da análise de solo).

cultivadas em meio TSA líquido foram diluídas em tampão PBS (Phosphate Buffered Saline) (Kuklinsky-Sobral et al., 2004) para obtenção de inóculos em torno de 10^6 UFC mL⁻¹, com leituras realizadas em espectrofotômetro a 630 nm (Lima, 2012). As sementes foram colocadas na solução contendo o inóculo e apenas em solução no caso das sementes usadas nos tratamentos dos controles e mantidas sob agitação constante de 120 rpm durante 30 min, passado este tempo a solução foi coada em papel filtro. As sementes foram levadas para casa de vegetação para serem semeadas em vasos de material plástico contendo solo oriundo da unidade Acadêmica de Garanhuns, as características do mesmo são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Análise química do solo utilizado no experimento de inoculação de bactérias potencialmente promotoras de crescimento vegetal em milho *Zea mays* L. cultivar São José, camada de 0,0 a 0,2 m, no município de Garanhuns – PE.

pH	P mg dm ³	K	Ca	Mg	Ca + Mg	Al³	H + Al
		-----cmol _c dm ³ -----					
6,1	5,22	0,246	4,7	2,8	7,5	0,3	0,65

Foram colocadas cinco sementes por vaso e quinze dias após a germinação foi feito desbaste permanecendo apenas uma planta por vaso, a irrigação foi feita diariamente de acordo com a capacidade de campo e semanalmente era feito o controle

das plantas invasoras no solo dentro do vaso e também na área onde os vasos se encontravam objetivando evitar o ataque por pragas e contaminação por doenças. As análises foram feitas aos 15 e 30 dias após a germinação. Durante o desenvolvimento da cultura, foi realizada a estimativa do teor de clorofila foliar com a utilização do clorofilômetro portátil ClorofiLOG[®] (modelo CFL 1030), que por meio de sensores, analisa três faixas de frequência de luz e através de relações de absorção de diferentes frequências, fornece medições dos teores das clorofilas *a*, *b* e total (*a+b*), expressas em unidades dimensionais chamadas Índice de Clorofila Foliar (ICF). Foi avaliado também diâmetro de colmo usando paquímetro no primeiro entrenó acima do colo da planta, (Hanashiro et al., 2013), altura de planta (medição do colo até a inserção da folha “bandeira”) (Kappes et al., 2013). Foram realizadas ainda contagens de folhas objetivando identificar o estágio fenológico da cultura (Weinsmann, 2008).

Quando o experimento foi retirado da casa de vegetação aos 45 dias após a emergência, as plantas foram levadas ao laboratório para análise de massa fresca de raiz e parte aérea e comprimento de raiz e parte aérea. Em seguida, as plantas foram acondicionadas em estufa de secagem sob temperatura de 65°C até obtenção de peso constante, para então ser avaliada massa seca. Em paralelo, foi realizado um segundo experimento avaliando as mesmas características com o tempo de cultivo diferente, 75 dias após a emergência.

Os dados foram submetidos à análise de variância pela estimativa F de Fisher-Snedecor e quando detectadas diferenças significativas, procedeu-se com o teste de comparação de médias por Tukey a 5,0% de probabilidade. O teste de Tukey é usado na análise de variância para comparar todo e qualquer contraste entre duas médias de tratamentos. É o teste de comparação de médias de tratamentos mais usado na experimentação agropecuária, por ser bastante rigoroso e de fácil aplicação (Ferreira, 1991). Para as médias de comparação das médias de tratamentos com inóculo bacteriano em relação aos controles foi aplicado Dunnett a 5,0% de probabilidade utilizando o software SAEG[®] Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Avaliação em milho com 45 dias de cultivo após a inoculação

Tabela 4. Médias de altura, número de folhas, diâmetro do colmo, clorofila a, b e total de plantas de milho inoculadas com diferentes gêneros bacterianos aos 45 dias de cultivo.

Código	Tratamento	Altura (cm)	Número Folhas	Diâmetro Colmo (mm)	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila Total
UAGC62	<i>Pantoea</i> sp.	69,45 a	5,60 a	12,40 a	28,12 a	5,54 a	33,66 a
UAGC 982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	71,35 a	6,00 a	12,43 a	25,34 a	4,77 a	30,11 a
UAGC 738	<i>Rhizobium</i> sp.	73,10 a	5,30 a	12,06 a	26,88 a	5,30 a	32,18 a
UAGC 863	<i>Bacillus</i> sp.	70,100 a	5,20 a	12,41 a	25,33 a	4,75 a	30,08 a
-	Mix*	70,800 a	5,40 a	11,91 a	26,20 a	4,73 a	30,93 a
	CV (%)	14,29 a	11,53	10,25	11,22	20,77	12,18

*Mistura dos demais tratamentos.

Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

Ainda na avaliação dos tratamentos com inóculos bacterianos, massa fresca e comprimento de raiz e parte aérea não apresentaram diferença estatística, mas quando avaliado massa seca de raiz e parte aérea, foi observado que os tratamentos contendo *Bacillus* sp. e *Stenotrophomonas* sp. apresentaram maiores médias em relação aos demais para massa da raiz. Para o massa da parte aérea, destacou-se o tratamento contendo *Rhizobium* sp. Os resultados estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Médias de comprimento, massa fresca e seca de raiz e parte aérea de plantas de milho inoculadas com diferentes gêneros bacterianos aos 45 dias de cultivo.

Código	Tratamento	Massa Fresca (g)		Massa Seca (g)		Comprimento (cm)	
		Raiz	P. Aérea	Raiz	P. Aérea	Raiz	P. Aérea
UAGC62	<i>Pantoea</i> sp.	66,83 a	55,90 a	49,00 c	8,29 c	43,50 a	125,30 a
UAGC 982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	73,47 a	50,70 a	63,78 b	8,54 c	38,40 a	122,90 a
UAGC 738	<i>Rhizobium</i> sp.	64,14 a	59,69 a	44,26 d	26,98 a	46,10 a	125,90 a
UAGC 863	<i>Bacillus</i> sp.	77,20 a	52,31 a	67,79 a	8,40 c	39,10 a	124,50 a
	Mix*	65,91 a	57,79 a	44,13 d	9,43 b	39,80 a	122,80 a
	CV (%)	18,21	17,00	2,42	4,82	16,33	5,93

Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

A tabela 6 apresenta a avaliação dos tratamentos com inóculo bacteriano comparado com a adubação química. Os parâmetros altura, diâmetro de colmo, clorofila a, b e total não apresentaram diferença estatística, o que demonstra que as linhagens obtiveram valores equivalentes ao NPK nas condições estudadas. Já quando avaliado número de folhas observou-se que o tratamento com adubação química foi superior aos demais

Tabela 6. Médias de altura, número de folhas, diâmetro do colmo, clorofila a, b e total de plantas de milho inoculadas com diferentes gêneros bacterianos comparadas com tratamento contendo adubação química aos 45 dias de cultivo.

Código	Tratamentos	Altura (cm)	Número Folhas	Diâmetro Colmo	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila Total
-	NPK	73,8	6,8	12,518	25,24	4,97	30,21
UAGC62	<i>Pantoea</i> sp.	69,45 ^{NS}	5,6*	12,401 ^{NS}	28,12 ^{NS}	5,54 ^{NS}	33,66 ^{NS}
UAGC 982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	71,35 ^{NS}	6*	12,433 ^{NS}	25,34 ^{NS}	4,77 ^{NS}	30,11 ^{NS}
UAGC 738	<i>Rhizobium</i> sp.	73,1 ^{NS}	5,3*	12,068 ^{NS}	26,88 ^{NS}	5,3 ^{NS}	32,18 ^{NS}
UAGC 863	<i>Bacillus</i> sp.	70,1 ^{NS}	5,2*	12,416 ^{NS}	25,33 ^{NS}	4,75 ^{NS}	30,08 ^{NS}
-	Mix*	70,8 ^{NS}	5,4*	11,917 ^{NS}	26,2 ^{NS}	4,73 ^{NS}	30,93 ^{NS}
DMS		11.684	0.7735	1.4691	3.6104	1.3899	4.7358

(*) Significativo superior ou inferior ao NPK, pelo teste de Dunnett, em nível de 5,0% de probabilidade; (NS) Não significativo, pelo teste de Dunnett, em nível de 5,0% de probabilidade.

Massa fresca de raiz e comprimento de raiz de milho não diferiram estatisticamente entre os tratamentos com inoculação de BPCV e do NPK. A massa fresca da parte aérea no tratamento com adubo químico obteve melhor média, para a massa seca de raiz os tratamentos com *Rhizobium* sp. e o mix de todas as linhagens se mostraram equivalentes ao NPK, e todos os outros se apresentaram superiores ao mesmo. Na avaliação da massa seca da parte aérea todos os tratamentos contendo inóculo foram superiores ao controle, com destaque para o tratamento com *Rhizobium* sp. que apresentou média de 26,981 g, massa quase 50% superior em relação ao NPK, como mostra a tabela 7.

Tabela 7. Médias de comprimento, massa fresca e seca de raiz e parte aérea de plantas de milho inoculadas com diferentes gêneros bacterianos comparadas com tratamento contendo adubação química aos 45 dias de cultivo.

Código	Tratamentos	Massa Fresca (g)		Massa Seca (g)		Comprimento (cm)	
		Raiz	P. Aérea	Raiz	P. Aérea	Raiz	P. Aérea
UAGC62	NPK	66,681	71,052	43,921	13,676	38,9	123,9
	<i>Pantoea</i> sp.	66,826 ^{NS}	55,901*	49,005*	8,292*	43,5 ^{NS}	125,3 ^{NS}
UAGC 982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	73,466 ^{NS}	50,7075 ^{9*}	63,782*	8,549*	38,4 ^{NS}	122,9 ^{NS}
UAGC 738	<i>Rhizobium</i> sp.	64,144 ^{NS}	59,696 ^{Ns}	44,264 ^{NS}	26,981*	46,1 ^{NS}	125,9 ^{NS}
UAGC 863	<i>Bacillus</i> sp.	77,201 ^{NS}	52,313*	67,79*	8,406*	39,1 ^{NS}	124,5 ^{NS}
	Mix*	65,91 ^{NS}	57,788*	44,131 ^{NS}	9,431*	39,8 ^{NS}	122,8 ^{NS}
DMS		13.408	11.498	1.4976	0.71	7.8346	8.694

(*) Significativo superior ou inferior ao NPK, pelo teste de Dunnett, em nível de 5,0% de probabilidade; (NS) Não significativo, pelo teste de Dunnett, em nível de 5,0% de probabilidade.

A tabela 8 apresenta a comparação de altura, número de folhas, diâmetro do colmo e clorofila a, b e total dos tratamentos com inóculo e controle (sem inóculo). A altura do controle foi inferior a altura dos demais tratamentos, o número de folhas não apresentou diferença estatística.

Tabela 8. Médias de altura, número de folhas, diâmetro do colmo, clorofila a, b e total de plantas de milho inoculadas com diferentes gêneros bacterianos comparados ao tratamento sem inóculo aos 45 dias de cultivo.

Código	Tratamentos	Altura (cm)	Número Folhas	Diâmetro Colmo	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila Total
UAGC62	Sem inóculo	54	5,3	10,917	32,96	9,46	42,42
	<i>Pantoea</i> sp.	69,45*	5,6 ^{NS}	12,401*	28,12*	5,54*	33,66*
UAGC 982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	71,35*	6 ^{NS}	12,433*	25,34*	4,77*	30,11*
UAGC 738	<i>Rhizobium</i> sp.	73,1*	5,3 ^{NS}	12,068 ^{NS}	26,88*	5,3*	32,18*
UAGC 863	<i>Bacillus</i> sp.	70,1*	5,2 ^{NS}	12,416*	25,33*	4,75*	30,08*
	Mix*	70,8*	5,4 ^{NS}	11,917 ^{NS}	26,2*	4,73*	30,93*
DMS	DMS	11.684	0.7735	1.4691	3.6104	1.3899	4.7358

(*) Significativo superior ou inferior à testemunha, pelo teste de Dunnett, em nível de 5% de probabilidade; (NS) Não significativo, pelo teste de Dunnett, em nível de 5% de probabilidade.

Para o diâmetro do colmo, *Rhizobium* sp e o mix das linhagens bacterianas não diferiram estatisticamente do controle, mas *Pantoea* sp., *Bacillus* sp., e *Stenotrophomonas* sp. foram todos superiores ao controle. Para a clorofila *a*, *b* e total o controle se mostrou superior a todos os tratamentos com inóculos bacterianos.

A tabela 9 apresenta dados de comprimento, massa fresca e seca de raiz e parte aérea, foi observado que todos os tratamentos com inóculo apresentaram dados superiores ao tratamento sem inóculo para massa fresca e seca de raiz, para massa fresca e comprimento de parte aérea não houve diferença significativa, no entanto para massa seca de raiz o tratamento (UAGC738) *Rhizobium* sp. apresentou ótimos valores em relação aos demais tratamentos.

Tabela 9. Médias de comprimento, massa fresca e seca de raiz e parte aérea de plantas de milho inoculadas com diferentes gêneros bacterianos comparadas ao tratamento sem inóculo aos 45 dias de cultivo.

Código	Tratamentos	Massa Fresca		Massa Seca		Comprimento	
		Raiz	P. Aérea	Raiz	P. Aérea	Raiz	P. Aérea
-	Sem inóculo	40,605	51,836	32,276	11,671	37,5	120,6
UAGC62	<i>Pantoea</i> sp.	66,826*	55,901 ^{NS}	49,005*	8,292*	43,5 ^{NS}	125,3 ^{NS}
UAGC 982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	73,466*	50,709 ^{NS}	63,782*	8,549*	38,4 ^{NS}	122,9 ^{NS}
UAGC 738	<i>Rhizobium</i> sp.	64,144*	59,696 ^{NS}	44,264*	26,981*	46,1*	125,9 ^{NS}
UAGC 863	<i>Bacillus</i> sp.	77,201*	52,313 ^{NS}	67,79*	8,406*	39,1 ^{NS}	124,5 ^{NS}
-	Mix*	65,91*	57,788 ^{NS}	44,131*	9,431*	39,8 ^{NS}	122,8 ^{NS}
DMS		13.408	11.498	1.4976	0.71	7.8346	8.694

(*) Significativo superior ou inferior à testemunha, pelo teste de Dunnett, em nível de 5,0% de probabilidade;

(NS) Não significativo, pelo teste de Dunnett, em nível de 5,0% de probabilidade.

A altura da planta foi medida do colo até a inserção da folha “bandeira” (Muller, 2013; Kappes, 2013). O tratamento 3, no qual foi usado *Rhizobium* sp., mesmo não diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, contendo inóculo bacteriano, apresentou o melhor resultado em relação aos demais, obtendo média de altura entre as repetições de até 73 cm. Diversos são os trabalhos que mostram a associação entre rizóbios e o feijoeiro enfatizando principalmente o incremento deste gênero bacteriano na fixação biológica de nitrogênio. Roesch et al (2008) perceberam esta associação ao

aplicar a técnica de sequenciamento do nifH em linhagens encontradas em colmos e raízes de milho.

Ao avaliar a quantidade de folhas completamente desenvolvidas, foi observado que não houve diferença estatística independente do tratamento ou quando comparados a ambos os controles. Segundo Weismann et al. (2008) todos os tratamentos encontram-se num mesmo estado fenológico, o V3 que é caracterizado por três folhas completas, ou seja, totalmente desenvolvidas. Tais resultados caracterizam certo retardo no desenvolvimento da cultura, uma vez que o estágio V3 é apresentado já aos 15 dias após a emergência da planta, no entanto, tal resultado não é atribuído aos tratamentos com linhagens bacterianas uma vez que os tratamentos sem bactéria encontram-se na mesma situação, mas sim a fatores intrínsecos da variedade ou das condições utilizadas.

Quando avaliado o diâmetro do colmo de plantas de milho aos 15 dias após a emergência não houve diferença estatística quando comparados os tratamentos com inóculo bacteriano, nem quando avaliado em comparação ao controle químico. Já quando comparados os tratamentos com inóculo em relação ao controle sem inóculo, três dos cinco tratamentos foram superiores ao controle (*Pantoea* sp., *Stenotrophomonas* sp. e *Bacillus* sp.). Castro et al. (2008) afirmam que está intimamente relacionada a capacidade de acumular e transferir carboidratos do colmo para o enchimento de grãos com sua capacidade produtiva. Demonstrando a importância do diâmetro do colmo que quanto mais espesso mais carboidrato irá transferir para o enchimento dos grãos aumentando assim a produção da cultura e, conseqüentemente, a interação com bactérias promotoras de crescimento vegetal irá estimular esta característica.

Para avaliação de massa fresca das raízes do milho, não houve diferença estatística quando realizada comparação dentre os tratamentos inoculados e dos tratamentos inoculados em relação ao NPK, no entanto quando comparados tratamentos inoculados com o controle (sem inóculo) todos os tratamentos com inóculo bacterianos apresentaram médias superiores, merecendo destaque o tratamento inoculado com *Bacillus* sp. que obteve a maior média e o mesmo foi mantido na avaliação de massa seca, desta vez em todos os testes aplicados. Tais resultados corroboram com os de

Araujo, (2013), que conseguiu implemento de matéria seca ao inocular *Bacillus subtilis* também em milho.

Na avaliação de massa fresca da parte aérea das plantas de milho, quando a comparação foi feita entre os inóculos não houve diferença estatística, na comparação dos inóculos em relação ao NPK apenas o tratamento com *Rhizobium* sp. apresentou média equivalente e quando comparados inóculos e controle não houve diferença estatística. Para a massa seca da parte aérea, observou-se que *Rhizobium* sp. apresentou os melhores resultados em todas as análises, sendo superior inclusive em relação ao NPK, com incremento de quase 50% a mais que este.

A avaliação de comprimento de raiz não diferiu estatisticamente entre os tratamentos inoculados, nem entre inóculos em comparação ao NPK, já quando avaliado em relação ao controle (sem inóculo) o tratamento *Rhizobium* sp. obteve média superior que os demais. O comprimento de parte aérea não diferiu estatisticamente em qualquer das situações apresentadas.

Foram analisados ainda os teores de clorofila *a* e *b* e clorofila total, este parâmetro não diferiu estatisticamente dentre os inóculos e dentre inóculos versus NPK, sendo que quando comparado ao controle (sem inóculo) este apresentou maior produção de clorofila *a*, *b* e total. Tais resultados diferem de Garcia et al., (2013) e Biachet et al., (2013) que ao inocular diferentes linhagens bacterianas em cana-de-açúcar e arroz, respectivamente, observaram maiores teores de clorofila nas plantas com inóculo. As clorofilas são pigmentos que convertem radiação luminosa em energia, sob a forma de ATP e NADPH. Estando assim estreitamente relacionadas com a eficiência 53 fotossintética das plantas e, em consequência, ao seu crescimento e adaptabilidade a diferentes ambientes. Estão presentes nos vegetais superiores nas formas *a* e *b*, e são constantemente sintetizadas e destruídas em processos influenciados por fatores internos e externos às plantas. Entre os fatores externos, o N se destaca por integrar a estrutura molecular das plantas e também por atuar em alguma etapa das reações que levam à síntese desses pigmentos (Taiz & Zeiger, 2002;).

A concentração de clorofila das folhas correlaciona-se positivamente com a concentração foliar de N uma vez que 70,0% do N contido nas folhas estão nos

cloroplastos que participam da síntese e da estrutura das moléculas de clorofila e influenciam o desenvolvimento e a produção das culturas (Nogueira et al., 2013).

3.2 Avaliação em milho com 75 dias de cultivo após a inoculação

A avaliação da altura, número de folhas, clorofila *a*, *b* e total aos 75 dias de cultivo após a inoculação bacteriana, os tratamentos contendo inóculo bacteriano não apresentaram diferença significativa (Tabela 10).

Tabela 10. Médias de altura, número de folhas, diâmetro do colmo, clorofila *a*, *b* e total de plantas de milho inoculadas com diferentes gêneros bacterianos aos 75 dias de cultivo.

Código	Tratamento	Altura (cm)	Número Folhas	Diâmetro Colmo	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila Total
UAGC62	<i>Pantoea</i> sp.	129,400a	8,100 a	13,945 a	29,940 a	5,140 a	35,080 a
UAGC 982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	121,400 a	7,900 a	14,927 a	28,250 a	4,640 a	32,890 a
UAGC 738	<i>Rhizobium</i> sp.	123,600 a	8,100 a	113,442 a	28,420 a	4,780 a	33,200 a
UAGC 863	<i>Bacillus</i> sp.	120,600 a	7,800 a	14,939 a	28,320 a	4,730 a	33,050 a
-	Mix*	124,200 a	7,70750 a	13,726 a	26,460 a	4,380 a	30,840 a
CV (%)		10,84	12,20	16,24	9,99	21,61	11,34

Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de tukey a 5,0% de probabilidade.

A massa fresca e seca das de raízes e parte aérea de plantas de milho demonstrou que quando comparados os tratamentos com diferentes gêneros bacterianos e um mix dos gêneros não houve diferença estatística para massa fresca, e para massa seca apenas a raiz apresentou diferença significativa apresentando a melhor média o tratamento contendo o mix das linhagens.

Tabela 11. Médias de massa fresca e seca de raiz e parte aérea de plantas de milho inoculadas com diferentes gêneros bacterianos aos 75 dias de cultivo.

Código	Tratamento	Massa Fresca (g)		Massa Seca (g)	
		Raiz	P. Aérea	Raiz	P. Aérea
UAGC62	<i>Pantoea</i> sp.	129,643 a	143,568 a	51,052 b	26,032 a
UAGC 982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	173,431 a	145,690 a	62,576 ab	27,822 a
UAGC 738	<i>Rhizobium</i> sp.	176,975 a	143,423 a	60,546 ab	26,315 a
UAGC 863	<i>Bacillus</i> sp.	125,740 a	145,507 a	50,038 b	28,353 a
-	Mix*	177,755 a	141,759 a	78,733 a	28,353 a
CV (%)		42,908	22,362	34,675	23,414

Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de tukey a 5,0% de probabilidade.

Quando comparados tratamentos com apenas um inóculo e mix com o tratamento adicionado de NPK altura e número de folhas não diferiram estatisticamente o que demonstra que as linhagens bacterianas promoveram incremento equivalente ao insumo químico para estas características nas condições apresentadas. Para as variáveis diâmetro de colmo, clorofila *a*, *b* e total o tratamento NPK apresentou resultados superiores (Tabela 12).

Tabela 12. Médias de altura, número de folhas, diâmetro do colmo, clorofila *a*, *b* e total de plantas de milho inoculadas com diferentes gêneros bacterianos comparadas com tratamento contendo adubação química aos 75 dias de cultivo pelo teste de Dunnett a 5,0% de probabilidade.

Código	Tratamentos	Altura (cm)	Número Folhas	Diâmetro Colmo	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila Total
UAGC62	NPK	124,20	8,20	18,14	36,03	8,66	44,69
	<i>Pantoea</i> sp.	129,40 ^{NS}	8,10 ^{NS}	13,95*	29,94*	5,14*	35,08*
UAGC 982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	121,40 ^{NS}	7,90 ^{NS}	14,93*	28,25*	4,64*	32,89*
UAGC 738	<i>Rhizobium</i> sp.	123,60 ^{NS}	8,10 ^{NS}	13,44*	28,42*	4,78*	33,20*
UAGC 863	<i>Bacillus</i> sp.	120,60 ^{NS}	7,80 ^{NS}	14,94*	28,32*	4,73*	33,05*
	Mix*	124,20 ^{NS}	7,75 ^{NS}	13,73*	26,46*	4,38*	30,84*
DMS		14.668	1.1595	2.8456	3.5054	1.3723	4.6988

(*) Significativo inferior ou superior, pelo teste de Dunnett, em nível de 5,0% de probabilidade;(NS) Não significativo, pelo teste de Dunnett, em nível de 5,0% de probabilidade.

Na avaliação de massa fresca e seca de raiz todos os tratamentos com inóculo bacteriano foram superiores ao NPK, para massa fresca e seca de parte aérea o NPK foi superior aos demais tratamentos contendo inóculos bacterianos.

Tabela 13. Médias de massa fresca e seca de raiz e parte aérea de plantas de milho inoculadas com diferentes gêneros bacterianos comparadas ao tratamento contendo adubação química aos 75 dias de cultivo.

Código	Tratamentos	Massa Fresca		Massa Seca	
		Raiz	P. Aérea	Raiz	P. Aérea
-	NPK	77,32	192,10	23,65	39,79
UAGC62	<i>Pantoea</i> sp.	129,64 ^{NS}	143,57*	51,05*	26,03*
UAGC 982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	173,43*	145,69*	62,58*	27,82*
UAGC 738	<i>Rhizobium</i> sp.	176,97*	143,42*	60,55*	26,32*
UAGC 863	<i>Bacillus</i> sp.	125,74 ^{NS}	145,51*	50,04*	28,35*
-	Mix*	177,76*	141,71*	78,73*	28,35*
DMS		71.792	39.56	22.028	8.0863

(*) Significativo inferior ou superior pelo teste de Dunnett, em nível de 5,0% de probabilidade;
(NS) Não significativo, pelo teste de Dunnett, em nível de 5,0% de probabilidade.

Quando realizada comparação entre tratamentos com inóculo e controle não houve diferença estatística para os parâmetros altura, número de folhas, clorofila *a*, *b* e total (Tabela 14).

Tabela 14. Médias de altura, número de folhas, diâmetro do colmo, clorofila *a*, *b* e total de plantas de milho inoculadas com diferentes gêneros bacterianos comparadas com tratamento sem inóculo aos 75 dias de cultivo pelo teste de Dunnett a 5,0% de probabilidade.

Código	Tratamentos	Altura (cm)	Número Folhas	Diâmetro Colmo	Clorofila A	Clorofila b	Clorofila Total
-	Sem inóculo	115,75	8,30	14,37	29,73	5,16	34,89
UAGC62	<i>Pantoea</i> sp.	129,40 ^{NS}	8,10 ^{NS}	13,95 ^{NS}	29,94 ^{NS}	5,14 ^{NS}	35,08 ^{NS}
UAGC982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	121,40 ^{NS}	7,90 ^{NS}	14,93 ^{NS}	28,25 ^{NS}	4,64 ^{NS}	32,89 ^{NS}
UAGC738	<i>Rhizobium</i> sp.	123,60 ^{NS}	8,10 ^{NS}	13,44 ^{NS}	28,42 ^{NS}	4,78 ^{NS}	33,20 ^{NS}
UAGC863	<i>Bacillus</i> sp.	120,60 ^{NS}	7,80 ^{NS}	14,94 ^{NS}	28,32 ^{NS}	4,73 ^{NS}	33,05 ^{NS}
-	Mix*	124,20 ^{NS}	7,75 ^{NS}	13,73 ^{NS}	26,46 ^{NS}	4,38 ^{NS}	30,84 ^{NS}
DMS		14.668	1.1595	2.8456	3.5054	1.3723	4.6988

(*) Significativo inferior ou superior, pelo teste de Dunnett, em nível de 5% de probabilidade;
(NS) Não significativo, pelo teste de Dunnett, em nível de 5% de probabilidade.

Para massa fresca de raiz, os tratamentos 3 (*Stenotrophomonas* sp), 4 (*Rhizobium* sp.) e 5 (mix de linhagens) foram superiores ao controle. Na avaliação da massa seca da raiz o tratamento 5 (mix de linhagens) foi superior estatisticamente a todos os tratamentos. Para parte aérea fresca e seca não houve diferença estatística (Tabela 13).

Tabela 15. Médias de comprimento, massa fresca e seca de raiz e parte aérea de plantas de milho inoculadas com diferentes gêneros bacterianos comparados ao tratamento sem inóculo aos 75 dias de cultivo.

Código	Tratamentos	Massa Fresca		Massa Seca	
		Raiz	P. Aérea	Raiz	P. Aérea
-	Sem inóculo	127,34	132,89	48,66	27,32
UAGC62	<i>Pantoea</i> sp.	129,64 ^{NS}	143,57 ^{NS}	51,05 ^{NS}	26,03 ^{NS}
UAGC 982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	173,43 *	145,69 ^{NS}	62,58 ^{NS}	27,82 ^{NS}
UAGC 738	<i>Rhizobium</i> sp.	176,97 *	143,42 ^{NS}	60,55 ^{NS}	26,32 ^{NS}
UAGC 863	<i>Bacillus</i> sp.	125,74 ^{NS}	145,51 ^{NS}	50,04 ^{NS}	28,35 ^{NS}
-	Mix*	177,76 *	141,71 ^{NS}	78,73*	28,35 ^{NS}
DMS		21.792	39.56	22.028	8.0863

(*) Significativo inferior ou superior, pelo teste de Dunnett, em nível de 5,0% de probabilidade;

(NS) Não significativo, pelo teste de Dunnett, em nível de 5,0% de probabilidade.

A utilização de apenas uma linhagem bacteriana como inóculo é feita a critério experimental como forma de selecionar bactérias que além de apresentar características de promoção de crescimento de planta em ambiente de laboratório, possa colonizar o vegetal e expressar tais características, como observado no trabalho de Kim et al., (2012) ao inocularem bactérias *Burkholderia phyfirmans* em sementes de *Panicum virgatum* cultivar Alamo, e Chagas Junior et al., (2014) ao inoculando rizóbios em diferentes variedades de feijão caupi.

Por outro lado a co-inoculação (inóculos com mais de uma linhagem bacteriana), visa aumentar as possibilidades de sucesso na inoculação, como demonstrado por Kelemu et al. (2011), ao inocularem BPCV em plantas de *B. brizantha* CIAT 6294, cultivar Marandu, observando incremento na massa de raiz e parte aérea e Bécquer et al. (2013), investigando a inoculação de diferentes bactérias promotoras de crescimento vegetal sob a germinação e o crescimento inicial da gramínea forrageira *Sporobolus cryptandrus* (Torr.) cultivar Gray, observaram aumento na germinação, além do incremento de 40,0% no comprimento de raiz. Além disso, é a formulação mais comum encontrado nos inoculantes comerciais (Oliveira et al., 2014). Tais resultados

corroboram com este trabalho, uma vez que o tratamento 5, contendo o mix de quatro linhagens de diferentes gêneros, foi o que apresentou maior incremento de massa seca para raízes de milho quando comparado com os tratamentos contendo apenas uma linhagem.

4 CONCLUSÕES

Linhagens bacterianas oriundas de cana – de - açúcar pertencentes a diferentes gêneros bacterianos podem atuar na promoção de crescimento vegetal de plantas de milho, apresentando melhores resultados quando utilizado o mix de gêneros bacterianos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIZADEH, H.; BEHBOUDI, K.; AHMADZADEHA, M.; JAVAN-NIKKHAHA, M.; ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. **Biological Control**. v.65, p.14-23, 2013.
- ARAÚJO, F. F.; PEDROSO, R. A. B. Interação de *Bacillus* sp. com a rizosfera de três espécies de plantas forrageiras. *Bioscience Journal*, v.29, n.1, p.152-158, 2013.
- BÉCQUER, C.J.; SALAS, B.; SLASKI, J.; ARCHAMBAULT, D.; ANYA, A. Influence of rhizospheric bacteria on germination and initial growth of *Sporobolus cryptandrus* (Torr.) A. Gray. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v.47, p.431-436, 2013.
- BIACHET, P., SANGOI, L., KLAUBERG FILHO, O., MIQUELLUTI, D. J., FERREIRA, M. A., VIEIRA, J. Formulações simples e mista de inoculantes com bactérias diazotróficas, sob diferentes doses de nitrogênio na cultura do arroz irrigado. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.6, p.2655-2666, 2013.
- BRITO, L. T.; CAVALCANTI, N. B.; SILVA, A. S.; PEREIRA, L. A. Produtividade da água de chuva em culturas de subsistência no semiárido pernambucano. **Engenharia Agrícola**, v.32, n.1, p.102-109, 2012.
- CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; SESTARI, I. **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia de cultivos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2008. 864p.
- CHAVES, D. P.; ZUCARELI, C.; OLIVEIRA JUNIOR, A. Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desenvolvimento e produtividade do milho. **Semina: Ciências Agrárias**. v.34, n.1, p. 57-72, 2013.
- COMPANT, S., CLÉMENT, 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, 2010.
- COSTA, D. P. **Mecanismos de interação entre bactérias endofíticas e plantas de cana-de-açúcar**. Garanhuns: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2010. 98p. Monografia de conclusão de curso.

- DUBEUX JÚNIOR, J.C.B.; OLIVEIRA, J.T.C.; MIRANDA, K.R. Isolation of root endophytic bacteria in elephant grass (*Pennisetum purpureum*) cultivars. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v.2, p.40-41, 2014.
- FANG-BO, Y.; ALI, S. W.; JING-YA, S.; LIN-PING, L. Isolation and Characterization of an Endosulfan-Degrading Strain, *Stenotrophomonas* sp. LD-6, and its Potential in Soil Bioremediation. **Journal of Microbiology**. v.61, n.4, p. 257-262, 2012.
- FARIAS, A. R. B.; LIMA, D. R. M.; LIRA-CADETE, LUANA.; RAMOS, A. P. S.; SILVA, M. C. de B., FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRA, J. Promoção de crescimento vegetal de feijão comum por bactérias isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v.17, p.101-104, 2012.
- FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Produção de milho. 2a Edição. Guaíba: Agropecuária, 2004. 360p.
- FERREIRA, Paulo Vanderlei, 1991 - Estatística Experimental Aplicada à Agronomia. 3. ed. ./ Paulo Vanderlei Ferreira - Maceió : EDUFAL, 2000. 430 p., tab. Bibliografia: p. 383 - 386
- FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; FERNANDES, A. R. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid Caatinga. **Jornal of Arid Environments**, v.74, p.344-349, 2010.
- GARCIA, J. C., VITORINO, R., AZANIA, C. A. M., SILVA, D. M., BELUCI, L. R. Inoculação de bactérias diazotróficas no desenvolvimento inicial de cana-de-açúcar, variedade RB 867515. **Nucleos**, v.10, n.1, p.99-108, 2013.
- HANASHIRO, R. K.; MINGOTTE, F. L. C.; FORNASIERI FILHO, D. Desempenho fenológico, morfológico e agrônômico de cultivares de milho em Jaboticabal-SP. **Científica**, v.41, n.2, p.226-234, 2013.
- JALONEN, R.; NYGREN, P.; SIERRA, J. Transfer of nitrogen from a tropical legume tree to an associated fodder grass via root exudation and common mycelial networks. **Plant Cell Environ**, v.32, p.1366-1376, 2009.
- KAPPES, C.; ARF, O.; ARF, M. V.; FERREIRA, J. P.; DAL BEM, E. A.; PORTUGAL, J. R.; GONÇALVES, R. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.2, p.527-538, 2013.

- KELEMU, S.; FORY, P.; ZULETA, C.; RICAURTE, J.; RAO, I.; LASCANO, C. Detecting bacterial endophytes in tropical grasses of the *Brachiaria* genus and determining their role in improving plant growth. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p.965-976, 2011.
- KIM, S.; LOWMAN, S.; HOU, G.; NOWAK, J. et al. Growth promotion and colonization of switch grass (*Panicum virgatum*) cv. Alamo by bacterial endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. **Biotechnology for Biofuels**, v.5, p.1-10, 2012.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J. ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANIKLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, p.1244-1251. 2004.
- LADEIRA, S. A.; DELATORRE, A. B.; ANDRADE, M. V. V. Utilização da pectina, proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho para a produção de proteases por *Bacillus* sp. termofílico. **Brazilian Journal. Food Technology**, v.15, n.1, p.92-98, 2012.
- LI, J. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology & Biochemistry**. v.40, p.238-246, 2008.
- LIMA, D. R. M. **Bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012. 106p. Dissertação de mestrado.
- LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A. R. B.; RAMOS, A. P. S. ; COSTA, D. P.; FREIRE, F. J. ; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. **Bioscience Journal**, v.28, p.122-129, 2012.
- LOPEZ, B. R.; TINICO-OJANGUREN, C.; BACILIO, M.; MENDOZA, A., & BASHAN, Y. Endophytic bacteria of the rock-dwelling cactus *Mammillaria fraileana* affect plant growth and mobilization of elements from rocks. **Environmental and Experimental Botany**, v.81, p.26-36, 2012.

- LYRA, M. C. C. P.; SANTOS, D. C.; MONDRAGON-JACOBO, C.; DA SILVA, M. L. R. B., MERGULHÃO, A. C. E. S., & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Isolation and molecular characterization of endophytic bacteria associated with the culture of forage cactus (*Opuntia* spp.). **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v.1, p.11-16, 2013.
- MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ L.M.; PICHETH, C. F., PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetic Molecular Research**, v.9, p.250-258, 2010.
- MARTÍNEZ, J.; CAJAS, Y. S.; LEÓN, J. D. OSORIO, N. W. Silvopastoral Systems Enhance Soil Quality in Grasslands of Colombia. **Applied and Environmental Soil Science**, v.34, p.1-8, 2014.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.
- MULLER, T. M. Inoculação de *Azospirillum brasiliense* associada a níveis crescentes de adubação nitrogenada e o uso de bioestimulante vegetal na cultura do milho. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual do Centro – Oeste, 97f, 2013.
- OLIVEIRA, M. A.; ZUCARELLI, C.; SPOLAOR, L. T.; DOMINGUES, A. R.; FERREIRA, A. S. Composição química dos grãos de milho em resposta à adubação mineral e inoculação com rizobactérias. *Revista Ceres*, v.59, n.5, p.759-715, 2012.
- OLIVEIRA, A. L. M.; COSTA, K. R.; FERREIRA, D. C.; MILANI, K. M. L.; SANTOS, O. J. A. P.; SILVA, M. B.; ZALUAGA, M. Y. A. Biodiversidade bacteriana do solo e agricultura sustentável. **Biochemistry and Biotechnology reports**, v.3, n.1, p. 56-77, 2014.
- PATIL, S. M.; PATIL, D. B.; PATIL, M. S.; GAIKWAD, P. V.; BHAMBURDEKAR, S. B.; PATIL, P. J. Isolation, characterization and salt tolerance activity of *Rhizobium* sp. from root nodules of some legumes. **International Journal of Current Microbiology Applied Sciences**, v.3, n.5, p.1005-1008, 2014.
- PEREIRA, A. P. A.; SILVA, M. C. B.; OLIVEIRA, J. R. S.; RAMOS, A. P. S.; FREIRE, M. B. G. S.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAI, J. Influência da

- salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia* spp. endofíticas de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal** v.28, p.112-121, 2012.
- RAMOS, A. P. S. **Bactérias associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco: Diversidade genética e produção de ácido indol acético**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2011. 128p. Dissertação de Mestrado.
- REIS JUNIOR, F.B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.32, p.1139-1146, 2008.
- ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant and Microorganisms Interactions**, v.8, p.827-837, 2006.
- ROESCH, L.F.W.; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.; TRIPLETT, E.W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant Soil**, v. 302, p.91-104, 2008.
- SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 142-149, 2012.
- SCHINEIDER, T. C.; CRUZ-SILVA, C. T. A. Potencial alelopático do nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) sobre o crescimento do milho (*Zea mays* L.) e aveia preta (*Avena strigosa* Schreb). **Revista Thêma et Scientia**. v.2, n. 1, p. 151-156, 2012.
- SILVA, M. O. **Bactérias associadas a cana-de-açúcar: Isolamento e potencial promoção do crescimento vegetal**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2011. 69p. Tese de Doutorado.
- SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S; CROONENBORGH, A. et al. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant Soil**, v.312, p.15-23, 2008.
- SZILAGYI-ZECCHIN, Vivian Jaskiw et al. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 26, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. 792p.

- TELKE, A. A.; GHODAKE, G. S.; KALYANI, D. C.; DHANVE, R. S.; GOVINDWAR, S. P. Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus* sp. *ADR.* . v. 102, p. 1752–1756, 2011.
- VITORAZI FILHO, J. A.; LIMA, K. B.; FREITAS, M. S. M.; MARTINS, M. A.; OLIVARES, F. L. Crescimento de mudas de maracujazeiro-doce inoculadas com fungos micorrizicos arbusculares e bacterias diazotroficas sob diferentes doses de fosforo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, n. 2, p. 442-450, 2012.
- WEISMANN, M. Tecnologia e Produção: Milho safrinha e culturas de inverno. *Boletim Informativo*. 38p, EMBRAPA, 2008.