

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

RAFAEL ROGÉRIO PEREIRA DA SILVA

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE GIRASSOL POR BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS**

**Uberlândia - MG
Junho – 2011**

RAFAEL ROGÉRIO PEREIRA DA SILVA

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE GIRASSOL POR BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Agronomia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Adão de Siqueira Ferreira

**Uberlândia - MG
Junho – 2011**

RAFAEL ROGÉRIO PEREIRA DA SILVA

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE GIRASSOL POR BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Agronomia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora em 04 de junho de 2011.

Bióloga Juliana Rainho Teixeira
Membro da Banca

Eng^a.Agr^a. Suélen Martins de Oliveira
Membro da Banca

Prof. Dr. Adão de Siqueira Ferreira
Orientador

Dedico aos meus pais, irmãs e namorada.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, por me iluminar por esse caminho, dando forças para lutar por meus objetivos. Por esta conquista e por todas as graças e bênçãos que Ele derramou sobre mim.

Aos meus pais, Maria Neide e Francisco, por terem sempre me apoiado, pela luta para que meus sonhos se tornassem possíveis, pelo alento, conselhos, amor incondicional e por serem para mim, exemplo de dignidade, retidão e caráter.

À minha namorada, pelo amor verdadeiro, alegrias, e pelas inúmeras vezes que me enxergou melhor do que eu, me dando força quando achei que não daria conta.

Às minhas irmãs pelo apoio e carinho.

Aos meus amigos de sempre, e também os Futurísticos, pelas conversas, risadas, horas de estudos, e todos os momentos memoráveis, vividos e compartilhados.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro à pesquisa.

Aos professores Jonas Jäger Fernandes, José Magno Queiroz Luz, Marcus Vinícius Sampaio e Maria Amelia dos Santos responsáveis pelos Laboratórios de Fitopatologia e Virologia Vegetal, de Biotecnologia Vegetal, de Entomologia-Controle Biológico e de Nematologia, da Universidade Federal de Uberlândia, que gentilmente cederam instalações e equipamentos para realização desse trabalho.

Ao meu orientador, Adão de Siqueira Ferreira, pelo ensinamento microbiológico e orientação durante estes 3 anos.

À Ana Paula de Oliveira Ribeiro, Juliana Rainho Teixeira, Suélen Martins de Oliveira, Márcia Regina Batistela Moraes e Glaicon Florisbello Alves pelo apoio, amizade e grande ajuda durante o decorrer do trabalho.

À todos aqueles que diretamente ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

RESUMO

O isolamento de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas é uma estratégia de grande importância na agricultura, devido ao potencial dessas em fixar nitrogênio, promover o crescimento de plantas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo testar e avaliar a capacidade de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em promover o crescimento vegetal de plântulas de girassol (*Helianthus annuus*) cultivadas *in vitro*. Após sucessivas repicagens em meios de cultura seletivos, 8 isolados foram selecionados para o teste de promoção de crescimento *in vitro*. Para a obtenção das plântulas, sementes previamente desinfestadas foram colocadas em tubos Falcon contendo meio MGC. Após 15 dias, as plântulas foram cortadas 2 cm abaixo dos cotilédones e transferidas para frascos com meio MS suplementado com 100 mg.L^{-1} de AIA, para manutenção das plântulas. Passados, 15 dias, procedeu-se repicagem dos explantes para meio MGC contendo os isolados. Após, 25 dias, avaliou-se o peso de matéria vegetal fresca total, assim como o número e tamanho foliar, além do crescimento radicular. Os isolados AZOSP e 11001BR apresentaram resultados satisfatórios quando comparados aos demais, levando-nos a inferir que bactérias diazotróficas podem ser utilizadas como modelo de estudo de interação planta-microrganismos em condições de Cerrado para o girassol.

Palavras-chave: *Helianthus annuus*, bactérias fixadoras de nitrogênio, cultura de tecidos vegetais.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Germinação e cultivo <i>in vitro</i> de girassol.....	13
3.2 Ensaio <i>in vitro</i> com os isolados.....	14
3.3 Análise estatística.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1 Germinação e cultivo <i>in vitro</i> de girassol.....	16
4.2 Ensaio <i>in vitro</i> com os isolados.....	18
5 CONCLUSÕES.....	24
REFERÊNCIAS.....	25
ANEXOS.....	30

1 INTRODUÇÃO

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é cultivado em todos os continentes, numa área aproximada de 18 milhões de hectares, e destaca-se como a quarta oleaginosa na produção de grãos e a quinta em área cultivada no mundo, correspondendo por 13% de todo o óleo vegetal produzido (SMIDERLE, 2002). Essa oleaginosa apresenta características agronômicas importantes, incluindo a resistência à seca, ao frio e ao calor (GOMES et al., 2008). Esses fatores conferem à cultura maior adaptabilidade às diferentes condições edafoclimáticas encontradas, principalmente, em solos tropicais, o que favorece sua expansão em regiões como a do Cerrado.

Esta oleaginosa apresenta diferentes potencialidades, podendo ser utilizada como óleo comestível, pois seus aquênios possuem elevado teor de óleo (40-45%), como grão para silagem ou farelo para alimentação animal, grão para confeitaria e como planta ornamental, já que existem diferentes híbridos de girassol colorido. Há relatos de seu uso na produção de mel (BRIGHENTI, 2003).

Atualmente, a utilização da biomassa vegetal para fornecer energia tem sido fundamental para o desenvolvimento da civilização com uma perspectiva futura otimista para o cenário energético mundial (VASUDEVAN et al., 2005). No Brasil, a cultura do girassol vem despertando o interesse de agricultores, técnicos e empresas, devido à possibilidade de se utilizar o óleo produzido pelos aquênios na fabricação de biodiesel (BACKES et al., 2008).

Quanto às exigências agronômicas, o girassol precisa ser cultivado em solo com alta fertilidade, e essa necessidade nutricional varia em função da fase de desenvolvimento em que se encontra, sendo que o período após a formação do botão floral até o final do florescimento coincide com o maior crescimento da planta e maior demanda de nutrientes (CASTRO; OLIVEIRA, 2005). Com o seu sistema radicular profundo e vigoroso, a absorção de nutrientes das camadas mais profundas é favorecida, ciclando e extraíndo grandes quantidades de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) do solo.

Castro e Oliveira (2005) afirmam que, para a cultura do girassol, o nitrogênio é o segundo nutriente mais requerido, absorvendo 41 kg de N para 1000 kg de grãos produzidos, podendo ser tanto fornecido via adubação quanto através de restos culturais, exportando 56 % do total absorvido. Blamey et al. (1997) afirma que o nitrogênio é o maior limitante

nutricional na produtividade do girassol, proporcionando redução de até 60 % de seu potencial de produção em decorrência da sua baixa disponibilidade no solo.

Entre os sistemas biológicos capazes de aproveitar o nitrogênio diretamente da atmosfera, um exemplo eficiente é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), ou seja, a redução enzimática de N_2 à amônia, que contrabalança a reação biológica de perda de N dos solos e ecossistemas sendo esta transformação realizada pela enzima nitrogenase (EADY; POSTGATE, 1974).

Um exemplo do sucesso de FBN é o que ocorre em plantas de leguminosas associadas com bactérias diazotróficas, com destaque ao sistema de produção da cultura da soja no Brasil. Os relatos na literatura, também, mostram a ocorrência da fixação de nitrogênio em plantas não-leguminosas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; RAVEN et al., 2001).

O nitrogênio fixado por bactérias assimbióticas pode não estar disponível imediatamente para o crescimento das plantas, porém estas podem se beneficiar a longo prazo. Contudo, alguns diazotróficos têm sido demonstrados com potencial considerável como microrganismo promotor de crescimento (PGPB) por outros mecanismos, tais como a síntese de fitohormônios ou competição com patógenos (DOBBELAERE et al., 2003).

Assim, o crescimento induzido nas plantas quando em contato com as bactérias, pode ser testado utilizando-se de cultura de tecidos vegetais. Esta técnica é uma ferramenta que permite a manipulação de explantes (fragmentos de tecidos vegetais) e indução de crescimento e/ou diferenciação dos tecidos em ambiente asséptico.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em promover crescimento vegetal de plantas de girassol cultivadas *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A área cultivada com girassol bem como o seu rendimento por hectare vem aumentando, sendo safra de verão no Rio Grande do Sul (julho-agosto) e no Paraná (agosto-outubro); ou “safrinha”, o que possibilitou uma maior expansão (fevereiro/março), no sudoeste de Goiás, no Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, no Norte e Oeste do Paraná e São Paulo e em Roraima (maio-junho). A região com potencial para expansão do girassol no país coincide com a área cultivada de soja já existente (CASTRO; OLIVEIRA, 2005).

De acordo com o levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento para a safra 2010/2011, o Estado de Mato Grosso é o maior produtor nacional de girassol, com uma área cultivada de 40,5 mil hectares e produtividade correspondente a 1407 kg. ha⁻¹ (CONAB, 2011).

Segundo Brighenti (2003), os principais entraves à produção recaem sobre a falta de tecnologia de produção de girassol sob pivô, escassez de híbridos precoces e com elevado teor de óleo, poucos estudos sobre o controle de insetos-pragas e doenças, destino dos subprodutos da produção de biodiesel na alimentação animal, falta de zoneamento agroclimático para risco de déficit hídrico e de doenças; as ações reduzidas em transferência de tecnologia; e as dificuldades no registro de produtos (herbicidas, fungicidas e inseticidas). Além disso, a escassez de estudos voltados para o uso de bactérias promotoras de crescimento, hormônios e o emprego de técnicas biotecnológicas impedem um pleno desenvolvimento e expansão da cultura.

No Brasil, os fertilizantes nitrogenados representam o maior custo entre os fertilizantes, já que sua compra não é subsidiada e a quantidade requerida pela planta é uma das maiores em relação aos outros macronutrientes, a exemplo do fósforo e potássio (TEIXEIRA et al., 2005). Além disso, o uso excessivo de fertilizantes nitrogenados representa risco de contaminação ambiental. Assim, o reconhecimento da importância da microbiologia do solo e a busca de alternativas para diminuir o consumo de fertilizantes nitrogenados, sem que haja diminuição da produção, levaram à intensificação de pesquisas quanto ao aproveitamento eficiente do nitrogênio atmosférico (GRAHAM; VANCE, 2000).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é, depois da fotossíntese, o processo mais importante no planeta, já que em alguns casos, a FBN pode suprir quase toda a demanda de nitrogênio necessária ao desenvolvimento da planta, considerando-se os padrões de produção

da plantas cultivadas. Na natureza, somente alguns microrganismos procariotos conhecidos como diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, são capazes de realizar este processo que é estimado por contribuir entre 90 e 130 Tg de N por ano em ecossistemas terrestres (CANUTO et al., 2003).

As bactérias fixadoras de nitrogênio em associação com gramíneas ganharam destaque, principalmente, com a descoberta de que dentre estas, o gênero *Azospirillum* colonizavam os tecidos internos das raízes, indicando que sua interação com a planta poderia resultar em um maior potencial de exploração agrícola (DÖBEREINER et al., 1995).

Baldani et al. (1997) constataram que as bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas podem ser agrupadas em três categorias: organismos rizosféricos, endofíticos facultativos e endofíticos obrigatórios. Na primeira categoria estão todas as espécies que colonizam as raízes superficialmente. Os microrganismos endofíticos facultativos são aqueles capazes de colonizar raízes interna e externamente e o terceiro grupo, tido como de maior importância, os que colonizam o interior de raízes e também a parte aérea das plantas não leguminosas.

Os organismos diazotróficos endofíticos podem contribuir para a nutrição da planta, seja através do processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico ou da produção de fitohormônios que atuam no aumento do sistema radicular das plantas (BARRAQUIO et al., 1997; KIRCHHOF et al., 1997; SUMAN et al., 2001). Assim, os mecanismos envolvidos na promoção do crescimento de plantas por bactérias endofíticas podem ser divididos em diretos e indiretos.

Quando o estímulo do crescimento das plantas é direto, o microrganismo produz fitormônios ou substâncias análogas destes reguladores capazes de estimular o desenvolvimento da planta (BASHAN; HOLGUIN, 1997). Quando o efeito é indireto, o crescimento é estimulado pela redução da população de microrganismos deletérios ou patogênicos às plantas, ou seja, pelo controle biológico de fitopatógenos (HALLMANN et al., 1997).

Outro fator que contribui para o crescimento das plantas é a capacidade de algumas bactérias endofíticas de melhorar a disponibilização e aumentar a absorção de nutrientes minerais e água (HALLMANN et al., 1997; LAZAROVITS; NOWAK, 1997). Schloter e Hartmann (1998) citam o gênero *Azospirillum*, como microrganismo capaz de secretar fitormônios, principalmente auxinas, e promover o aumento da absorção de nutrientes e água, com conseqüente crescimento da planta.

Algumas associações destacam-se pelas grandes perspectivas para a exploração biotecnológica, dentre elas citam-se *Frankia* – Angiospermas, *Azolla* – *Anabaena*, *Azospirillum* – gramíneas (cereais e forrageiras) e *Acetobacter* – cana de açúcar. A inoculação com *Azospirillum* pode reduzir a adubação nitrogenada em até 50% (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). Em culturas como as de trigo, arroz e milho, têm-se relatado o potencial de algumas bactérias diazotróficas endofíticas em fornecer parte da demanda nutricional de nitrogênio (KNAUTH et al., 2005).

Bactérias não-simbióticas dos gêneros *Azotobacter*, *Azotococcus*, *Beijerinckia* e *Clostridium* são capazes de fixar nitrogênio. Os três primeiros gêneros são formados por bactérias aeróbicas, enquanto *Clostridium* é uma bactéria anaeróbica. Todos esses gêneros são de bactérias saprófitas comumente encontradas no solo, onde realizam a oxidação da matéria orgânica para obtenção de energia empregada no processo de fixação. Estima-se que essas bactérias, provavelmente, adicionam cerca de 7 kg de N.ha⁻¹ de solo a cada ano (RAVEN et al., 2001).

A grande evolução nos estudos de taxonomia das bactérias diazotróficas levou à descrição de um grande número de novos gêneros e espécies. Em 2002, a Coleção de Culturas da EMBRAPA Agrobiologia era depositária de mais de 7.000 isolados provenientes de diversos estudos ecológicos, sendo que 71% eram estirpes de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium* isoladas de diversas espécies de leguminosas de grãos, forrageiras e espécies arbóreas, especialmente da Mata Atlântica e Amazônia; 25% com estirpes de *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, isoladas de trigo, arroz, sorgo, dendê, abacaxizeiro e bananeira e de *Acetobacter*, isoladas de cana-de-açúcar e batata-doce. Também, estão presentes culturas de *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Beijerinckia* e outras obtidas por intercâmbio com coleções de diversos países; e 4% com culturas modificadas geneticamente para estudos com diferentes finalidades (PITARD, 2002).

A possibilidade de se obter novas plantas a partir de explantes depende de diversos fatores como a composição do meio de cultura, e inclusive a parte da planta usada para obtenção dos explantes (FABIJAN et al., 1981). Já, a capacidade de regeneração de girassol *in vitro*, provenientes de diferentes partes de material vegetal, tem sido investigado por vários autores (CARRETO et al., 2002; CHARRIÈRE; HAHNE, 1998; CHARRIÈRE et al., 1999; GRECO et al., 1984; KRAUTER; FRIEDT, 1991; PATERSON; EVERETT, 1985).

Segundo Maciel et al. (2000), a propagação *in vitro* é uma técnica de cultura de tecidos bem sucedida e propicia vantagens sobre os métodos convencionais de propagação,

permitindo a obtenção em curto espaço de tempo e em qualquer época do ano, de um grande número de plantas de boa qualidade fitossanitária e autenticidade vegetal.

Raven et al. (2001) realizaram testes de promoção de crescimento vegetal utilizando o cultivo *in vitro* das plântulas, para verificar a capacidade dos isolados em promover o crescimento de determinadas gramíneas, de forma estéril, controlada, em qualquer época do ano e em pequenos espaços físicos. Além disso, o cultivo em meio artificial visa eliminar os fitopatógenos das plântulas e, assim, permite que as bactérias colonizem as plantas sem competição com outras bactérias (CASSELLS, 1991).

Martínez et al. (2003) a partir de plantas de banana cultivadas em campos do México, isolaram e caracterizaram bactérias endofíticas diazotróficas, e observaram a ocorrência de aumentos significativos dos pesos de folhas e de pseudocaule fresco ao inocular alguns isolados.

O mecanismo de promoção de crescimento vegetal por microrganismos endofíticos, ainda, necessita de mais estudos para melhor entendimento dos fatores das relações ecológicas envolvidas. Mas sabe-se que a interação entre o genótipo da planta e a comunidade endofítica promotora de crescimento, pode aumentar a produção da planta (AZEVEDO; ARAÚJO, 2008).

Na região do Triângulo Mineiro, onde se encontra uma parte do segundo maior bioma do país, o Cerrado do Brasil, ainda não se conhece por inteiro a ocorrência, distribuição e abundância de espécies de bactérias diazotróficas associativas com plantas cultivadas no cerrado. O conhecimento da ecologia das bactérias diazotróficas com plantas do cerrado pode gerar informações e produtos de interesse na agricultura e também na preservação do meio ambiente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Germinação e cultivo *in vitro* de sementes de girassol

Cinquenta gramas de sementes de girassol foram imersas durante toda a noite em solução de Benomyl (1 mg.mL^{-1}) sob agitação constante (Figura 1). Posteriormente, foram lavadas com água estéril e devidamente desinfestadas com etanol 70 % durante 1 min e hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5 % por 8 min. Após lavagem em água estéril por três vezes, as sementes foram transferidas assepticamente para tubos Falcon (50 mL) contendo meio nutritivo MGC (Anexo 1), em câmara de fluxo laminar. Em seguida, os tubos contendo as sementes, foram mantidos em sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sob irradiância de $35 \text{ mmol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas de 16 W (Figura 2).



Figura 1 - Sementes de girassol imersas em solução de água com fungicida Benomyl (1 mg. mL^{-1}), e deixadas sob agitação *overnight*.

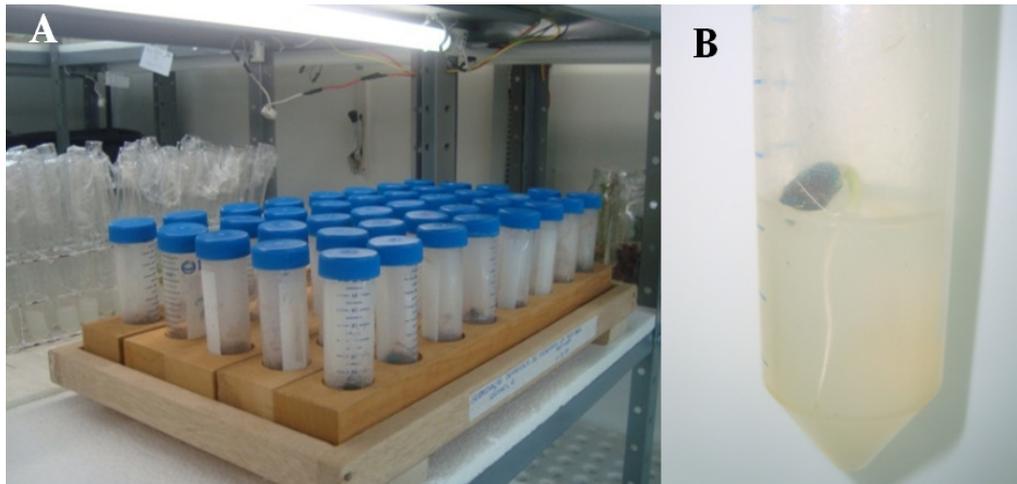


Figura 2 - Sementes de girassol submetidas ao cultivo *in vitro*, em meio MGC em sala de crescimento. A – Visão do material nas prateleiras da sala de crescimento; B – Detalhe do Tubo Falcon contendo semente germinando.

Após 2 semanas, visando à manutenção e obtenção de clones das plântulas de girassol, procedeu-se o manuseio de forma asséptica das mesmas em câmara de fluxo laminar. Assim, realizou-se o corte de cada indivíduo, aproximadamente 2 cm abaixo dos cotilédones, e posteriormente, os explantes foram transferidos para frascos contendo meio MS (Anexo 1) suplementado com 100 mg.L^{-1} de AIA (ácido indol-3-acético), e levados para sala de crescimento, sob condições controladas de luz e temperatura.

3.2 Ensaio *in vitro* com os isolados

O bioensaio seguiu o delineamento inteiramente ao acaso com dez tratamentos e cinco repetições. Os isolados foram 702, 703, L16.2, LP8, LP1, REC 14B, AZOSP da coleção do Laboratório de Microbiologia Agrícola, da Universidade Federal de Uberlândia (LAMIC/UFU), mantidos em glicerol 10% a -4°C e 11001 BR, pertencente à Coleção de Culturas da EMBRAPA Agrobiologia. Conforme descrito por Döbereiner et al. (1995), para a obtenção destes inóculos, colônias puras de bactérias diazotróficas foram isoladas de raízes desinfestadas superficialmente de plantas de algodão cultivadas no Cerrado. O ensaio continha também dois controles: negativo, sem AIA e/ ou isolados; e positivo, apenas com AIA (1 mg. L^{-1}).

Previamente, realizou-se a ativação dos isolados, repicando-os assepticamente para tubos contendo meio DYGS (Anexo 1), e incubado-os por 48 horas em BOD à 30°C. Após o crescimento da colônia, inoculou-se 100µl de suspensão bacteriana em frascos de vidro contendo meio MGC, ainda não solidificado.

Após inoculação dos isolados no meio de cultura, as plântulas cultivadas *in vitro* foram utilizadas para o teste de indução de crescimento com as bactérias selecionadas. Desse modo, em câmara de fluxo laminar, as mesmas sofreram a excisão do sistema radicular e foram transferidas para os meios.

Os frascos foram mantidos em BOD sob fotoperíodo de 12 h, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, e irradiância de $35 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ por aproximadamente 25 dias, sendo que avaliou-se de 7 em 7 dias, as características como: tamanho e quantidade de folhas emergentes; necrose e/ou oxidação; crescimento de raiz e contaminação. Foi realizada uma classificação para a avaliação do tamanho foliar, que variou de notas de 0 a 4, sendo 0 quando não houve crescimento foliar, 1 quando seu tamanho era pequeno (até 1cm), 2 quando era mediano (de 1 a 1,5 cm), 3 quando era grande (de 1,5 a 2 cm) e 4 quando era muito grande (acima de 2 cm). Realizou-se, também, a determinação da massa fresca vegetal total (incluindo os cotilédones).

3.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos a uma análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) com auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Germinação e cultivo *in vitro* de sementes de girassol

O teste de germinação com sementes de girassol apresentou resultados satisfatórios, uma vez que o protocolo escolhido para a desinfestação das sementes mostrou grande eficiência, sendo observada uma porcentagem de contaminação muito baixa, inferior a 1%. Resultados semelhantes foram observados por Silva et al.(2008) para germinação de sementes de algodão.

Segundo Silva et al. (2008) no processo de desinfestação de sementes, o etanol e os compostos à base de cloro são as substâncias com ação germicida mais utilizadas neste processo. Porém, no presente trabalho, a utilização de uma solução de água com Benomyl sob agitação “overnight”, antes do processo de desinfestação das sementes de girassol mostrou-se como um acréscimo importante à técnica, já que o tratamento das sementes com o fungicida proporciona uma menor contaminação do que apenas a utilização de etanol e hipoclorito de sódio.

Para desinfestação de sementes de sorgo cultivadas “*in vitro*”, Brandão et al. (2005) utilizaram etanol 50% durante 10 min e lavadas em água corrente por 30 min. Em seguida, foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio 50% acrescido de Tween 20 a 0,01% durante 30 min, e lavadas em água esterilizada por 5 min e 3 vezes.

Nos testes de germinação *in vitro* geralmente utiliza-se o meio MS (GOLLE, 2007; PINHEIRO et al., 2001; SILVA et al., 2005), já que o mesmo possui uma formulação rica em nutriente muito utilizada em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amônio (GUERRA; NODARI, 2008).

Porém, Silva et al. 2008, ao padronizar o cultivo de sementes de algodão *in vitro*, observou que as plântulas obtidas em meio MS não eram vigorosas como o desejado, e, optou pela utilização de um meio de cultura mais simples em sua composição, o Meio para Germinação de *Cotton* (MGC). Este meio apresenta como um de seus diferenciais a quantidade de sacarose disponibilizada e a sua menor concentração de sais quando comparado com o meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

O meio nutritivo MGC atendeu às necessidades para o desenvolvimento inicial das plântulas de girassol, sendo obtido excelente resultado quanto ao estabelecimento *in vitro* das plântulas, e um índice de germinação igual a 80%. Verificou-se um tempo médio de duas semanas para a obtenção das plântulas.

Camilo et al. (2009) em seu estudo com o cultivo de berinjela *in vitro*, observou uma diferença significativa entre a taxa de germinação de plântulas em meio MGC e meio MS, sendo que o meio MGC apresentou-se como o mais adequado para a germinação *in vitro* de berinjela cv. “Embú”, com índices de germinação semelhantes aos encontrados para as sementes de girassol.

Já os explantes transferidos para frascos contendo meio MS suplementado com 100 mg.L⁻¹ de AIA, desenvolveram-se de forma satisfatória. A alta concentração de fitohormônio acrescida ao meio nutritivo possibilitou a abundante emissão de pêlos absorventes (Figura 3), e rápida obtenção dos clones necessários para os bioensaios.

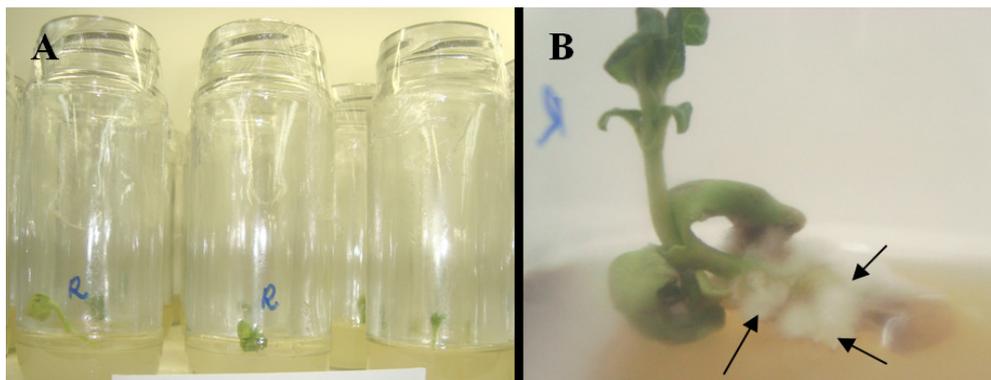


Figura 3 - Manutenção de plântulas de girassol *in vitro*. A – Explantes em frascos contendo meio MS suplementado com 100 mg.L⁻¹ de AIA; B – Detalhe da plântula emitindo pêlos absorventes (indicados pelas setas).

Os frascos foram verificados diariamente e os que apresentaram contaminação foram descartados. O meio MS se mostrou satisfatório para a manutenção das plântulas *in vitro*.

4.2 Ensaio *in vitro* com os isolados

Observou-se que após acondicionamento em BOD, alguns frascos do bioensaio em meio MGC (Figura 4) apresentavam um crescimento micelial (Figura 5), evidenciando a contaminação, possivelmente, durante o manuseio e/ou transferência ou dos explantes. Além disso, notou-se necrose de algumas plântulas que foram posteriormente descartadas.



Figura 4 - Plântulas de girassol transplantadas para meio MGC e mantidas em condições constantes de temperatura e iluminação.

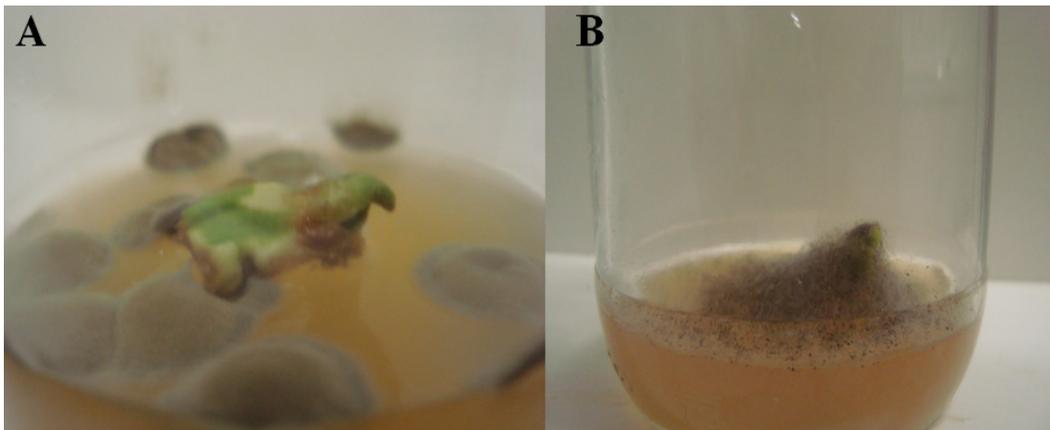


Figura 5 - Plântulas de girassol em meio nutritivo contaminado por fungos (A e B).

Analisando os dados obtidos e as figuras a seguir, podemos verificar que quanto ao número de folhas, enraizamento e tamanho foliar das plântulas os tratamentos apresentaram diferenças significativas entre si. Já em relação ao peso de massa fresca total os tratamentos

utilizados não diferiram entre si. Notou-se também que os melhores resultados foram obtidos com o controle positivo (AIA 1 mg.L⁻¹).

Observa-se na Figura 6, que para o número de folhas os valores apresentaram diferenças significativas entre si, destacando-se o tratamento controle positivo (AIA 1 mg.L⁻¹), que não diferiu estatisticamente dos tratamentos AZOSP (*Azospirillum* sp.), seguidos pelo isolado 11001 BR (*Azospirillum amazonenses*) e controle negativo (sem AIA e/ou isolado). Enquanto os que apresentaram piores resultados foram os tratamentos 703 e LP1.

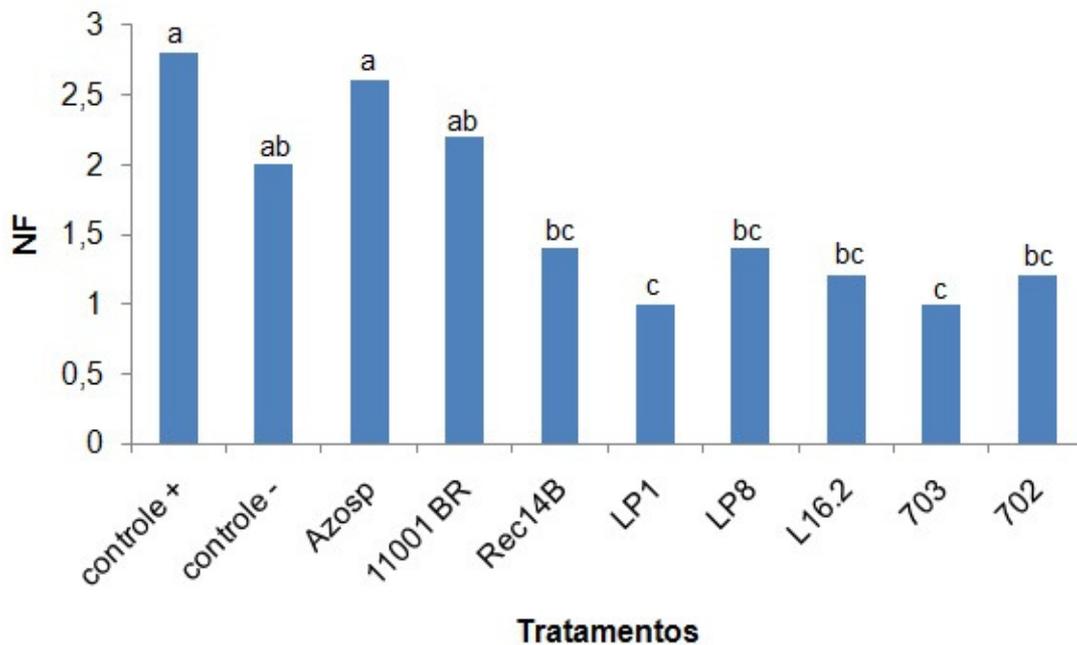


Figura 6 – Número médio de folhas (NF) das plântulas de girassol no bioensaio após 25 dias de incubação em câmara de crescimento, BOD. As médias seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Porém, dentre os isolados obtidos das raízes de algodão, e pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Agrícola – LAMIC/UFU, observou-se desempenho considerável dos isolados Rec14B, LP8, L16.2 e 702, que não diferiram entre si para a variável analisada.

Quanto ao tamanho foliar (Figura 7) os tratamentos diferiram entre si, sendo os maiores valores alcançados pelos controles: positivo (AIA 1 mg.L⁻¹) e o menor pelo isolado 702.

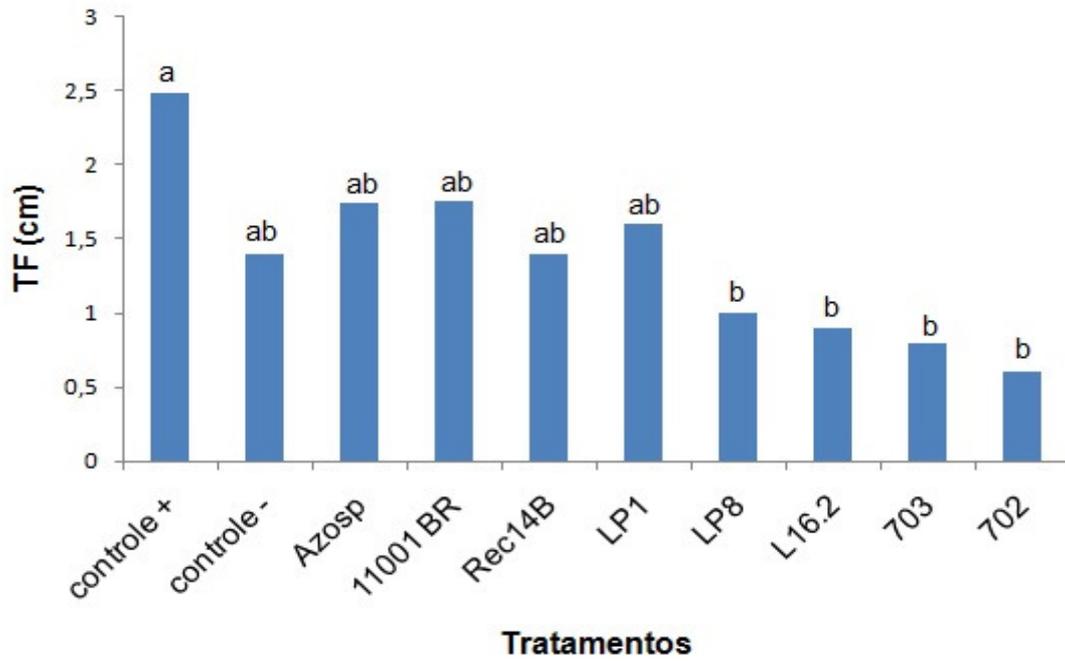


Figura 7 – Tamanho foliar (TF) médio das plântulas de girassol no bioensaio após 25 dias de incubação em câmara de crescimento, BOD. As médias seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Apesar de não terem diferido estatisticamente dos outros isolados, Rec14B e LP1 apresentaram considerável incremento ao tamanho de folhas de girassol frente aos demais isolados do LAMIC/UFU.

Já o enraizamento foi detectado em alguns tratamentos, destacando-se o controle positivo e o AZOSP (Figura 8 e 9).

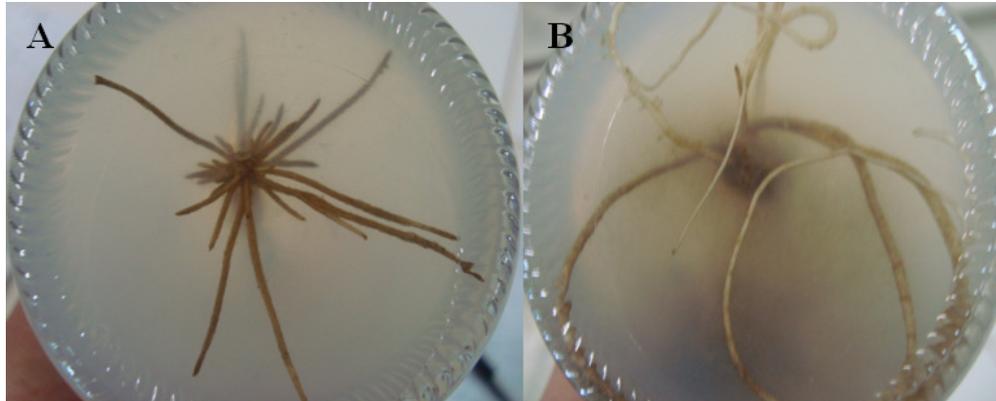


Figura 8 – Visão externa do fundo do frasco de vidro exibindo enraizamento da plântula de girassol. A – Enraizamento induzido por meio MGC suplementado com AIA (1 mg.L^{-1}); B – Enraizamento induzido por meio MGC inoculado com isolado AZOSP (*Azospirillum* sp.).

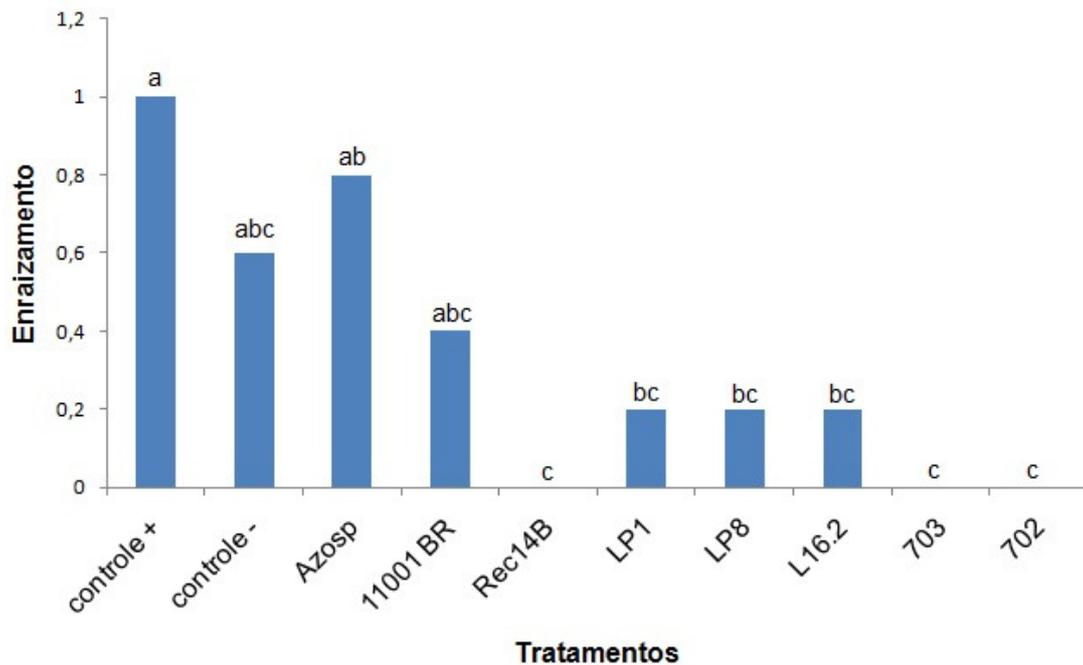


Figura 9 – Enraizamento dos explantes no bioensaio após 25 dias de incubação em BOD. As médias seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Pode-se inferir, portanto, que o aumento no comprimento das raízes, observado neste estudo, pode ter ocorrido em consequência da produção de AIA pelos isolados testados. Segundo Khalid et al. (2004), a produção de AIA em meio de cultura está positivamente correlacionada com o aumento radicular de plantas de trigo cultivadas em vasos.

Ainda que os resultados referentes ao peso de massa fresca total não tenham diferido entre si, os tratamentos controle positivo e os isolados AZOSP e 11001 BR apresentaram valores superiores aos demais (Figura 10).

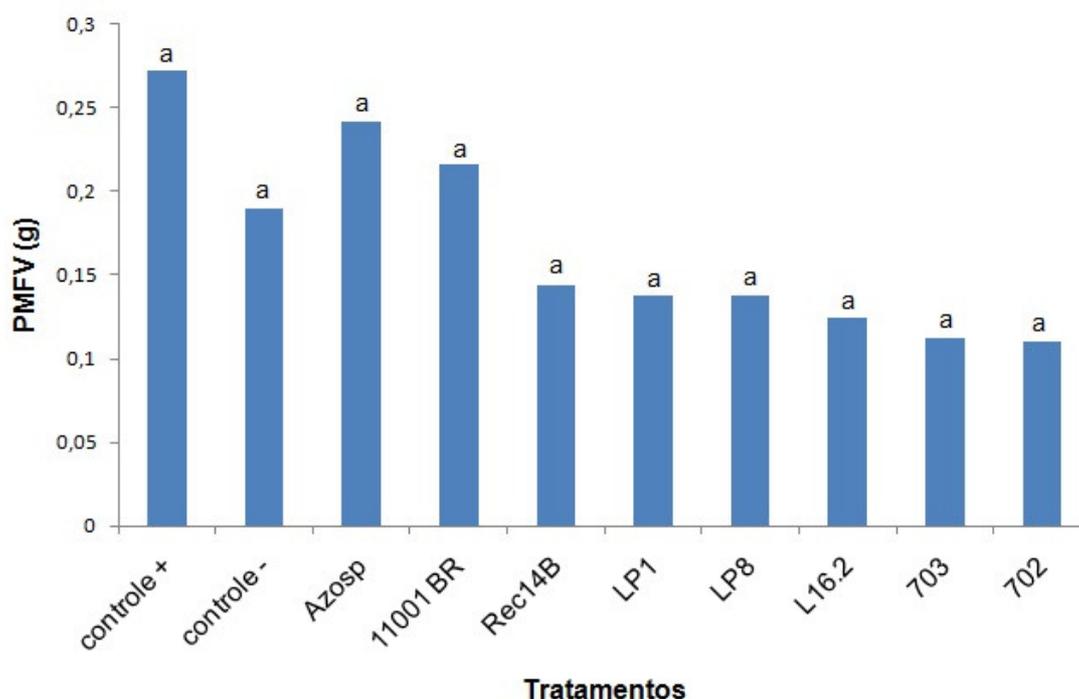


Figura 10 – Pesos de massa fresca vegetal total (PMFV) médios no bioensaio 1 após 4 semanas de incubação de plântulas de girassol em BOD. As médias seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Observou-se que para as variáveis analisadas o controle negativo (sem isolado e/ou AIA) mostrou-se muitas vezes com desempenho superior aos demais tratamentos. Podemos inferir que tal comportamento, se deve a uma competição estabelecida entre explantes e isolados em cada recipiente, o que possivelmente acarretou um desenvolvimento deficiente das plântulas. Já no controle negativo, não há qualquer tipo de competição, favorecendo o bom desenvolvimento da plântula em meio de cultura.

Os efeitos positivos da inoculação de alguns isolados de bactérias no crescimento de plantas podem estar associados ao processo de FBN, a síntese de hormônios de crescimento produzidos pelas bactérias ou mesmo a um efeito sinérgico destes fatores atuando nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta (CANUTO et al., 2003). Estudos de vários autores mostraram que a promoção de crescimento diretamente pela produção de fitormônios e aumento da disponibilidade de nutrientes pela fixação de nitrogênio ou solubilização de fósforo (KLOEPPER, 1993; NEHL et al. 1996; WHIPPS, 2000).

Teste de isolados de bactérias endofíticas em cafeeiro, comprovou para alguns desses isolados, que houve promoção de crescimento da planta. Diferentemente do presente trabalho, Sakiyama (2001) utilizou o reisolamento de isolados para a verificação de que os mesmos haviam promovido o crescimento.

Sala et al. (2005) em testes com genótipos de trigo, constataram a presença de bactérias diazotróficas endofíticas e concluíram que os benefícios causados poderiam ser devido à produção de fitormônios e não somente à fixação biológica do N₂.

Para a promoção de crescimento vegetal em eucalipto, os autores observaram em vários clones, que a multiplicação vegetativa já ocorre com condições suficientemente favoráveis para a expressão do máximo de enraizamento e crescimento, não sendo, portanto possível obter ganhos com o processo de aplicação de rizobactérias no substrato utilizado na produção de mudas (MAFIA et al., 2007).

Junior et al. (2000) após levantamento da ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a quatro diferentes genótipos de cultura de cana-de-açúcar, encontraram *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum* spp. e *Acetobacter diazotrophicus*, sendo que a maior frequência de isolamento ocorreu nas raízes das plantas. Pelo fato dos isolados selecionados também serem de raízes, há uma possibilidade de serem alguns dos gêneros citados. Contudo, esta análise ainda não foi realizada. A identificação dos isolados pelas características de tamanho e formas não permite realizar tal distinção quanto à taxonomia. Mais trabalhos de identificação dos isolados com o uso de técnicas de biologia molecular terão que ser realizados.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que: (1) o protocolo utilizado para desinfestação das sementes de girassol foi eficiente; (2) o meio MGC garantiu boa germinação de sementes de girassol *in vitro*; (3) os isolados AZOSP e Embrapa 11001 BR, foram eficientes na promoção do crescimento do girassol.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interações com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 29, p. 62-76, 2008.
- BACKES, L.R.; SOUZA, A.M.; BALBINOT JUNIOR, A.A.; GALLOTTI, G.J.M.; BAVARESCO, A. Desempenho de cultivares de girassol em duas épocas de plantio de safrinha no planalto norte catarinense. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.1, p.41-48, 2008.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, R. S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 922-928, 1997.
- BARRAQUIO, W.L.; REVILLA, L.; LADHA, J.K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 15-24, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum-plant relationships: Environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BLAMEY, F.P.C.; ZOLLINGER, R.K.; SCHNEITER, A. A. Sunflower production and culture. In: SCHNEITER, A.A. (Ed). **Sunflower technology and production**. Madison: American Society of Agronomy, 1997. p. 595-670, (Agronomy, 35).
- BRANDÃO, R. L.; GONÇALVES, A. C. A.; PETRILLO, C. P.; COELHO, G. T. C. P.; SCHARFFERT, R. E.; CARNEIRO, N. P. **Regeneração em cultura de tecido de cultivares de *Sorghum bicolor* através da organogênese**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 2005. 6 p.
- BRIGHENTI, A.M. **Girassol: perspectivas da cultura no Brasil**. Londrina: Embrapa-CNPSO, 2003. 36 p.
- CAMILO, J. S.; SILVA, R.R.P.; CARVALHO, G. R.; RIBEIRO, A. P. O. Efeito de diferentes meios de cultura sobre a germinação de sementes de berinjela (*Solanum melongena* L.) *in vitro*. In: CONGRESSO REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA, 2., 2009, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU, 2009. CD-ROM.
- CANUTO, E.L.; SALLES, J.F.; OLIVEIRA, A.L.M.; PERIN, L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, Seropédica, v. 37, n. 2, p. 67-72, 2003.

CARRETTO, S.; PARADISO, A.; D'AMICO, L.; GARA, L. Ascorbate and glutathione metabolism in two sunflower cell lines of differing α -tocopherol biosynthetic capability. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 509–513, 2002.

CASSELLS, A.C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht : Kluwer Academy, 1991. p. 31-44.

CASTRO, C. de.; OLIVEIRA, F.A. Nutrição e adubação do girassol. In: LEITE, R.M.V.B. de C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. (Ed.). **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja. 2005. p. 317-373.

CHARRIÈRE, F.; HAHNE, G. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on in vitro cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. **Plant Science**, Strasbourg, v. 137, p. 63–71, 1998.

CHARRIÈRE, F.; SOTTA, B.; MIGINIAC, E.; HAHNE, G. Induction of adventitious shoots or somatic embryos on *in vitro* cultures zygotic embryos of *Helianthus annuus*: Variation of endogenous hormone levels. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 37, p. 751-757, 1999.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, oitavo levantamento, maio 2011**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_06_02_10_59_38_graos_-_boletim_mai-2011..pdf>. Acesso em: 02 jun. 2011.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA:SPI, Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60 p.

EADY, R.R.; POSTGATE, J.R. Nitrogenase. **Nature**, London, v. 249, p. 805-810, 1974.

FABIJAN, D.; YEUNG, E.; MURHERJEE, I.; REID, D. M. Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. I. Correlative influence and developmental sequences. **Physiology Plantarum**, Alberta, v. 53, p. 578– 597, 1981.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** : sistema de análises de variância de dados balanceados: Programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Versão 4.3. Lavras: UFLA, 2000.

GOLLE, D.P. **Germinação *in vitro* de *Pinus taeda* L. a partir de sementes selecionadas**. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

GOMES, D.P.; LEITE, R.M.V.B.C.; MORAES, M.F.H.; KRONKA, A.Z.; TORRES, S.B. Sanidade de sementes de girassol provenientes de três municípios do estado do Maranhão. **Caatinga**, Mossoró, v. 21, n.1, p. 55-63, jan./mar. 2008.

GRAHAM, P.H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, Saint Paul, v. 65, p. 93–106, 2000.

GRECO, B.; TANZARELLA, O. A.; CARROZZO, G.; BLANCO, A. Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Science Letters**, Los Angeles, v. 36, p. 73–77, 1984.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de Biotecnologia** – CCA/UFSC; Edição da Steinmacher, 2006. 41p. Disponível em:
<<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2010.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F. & KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

REIS JUNIOR, F. B. dos; SILVA, L. G. da; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 5, p. 985-994, 2000.

KIRCHHOF, G.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; ECKERT, B.; DÖBEREINER, J.; HARTMANN, A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 45-55, 1997.

KHALID, A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield od wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96 p.473-480, 2004.

KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: **Soil microbial ecology, applications in agricultural and environmental management**. New York: Ed. FBJ Meeting, 1993. p. 255-274.

KNAUTH, S.; HUREK, T.; BRAR, D.; REINHOLD-HUREK, B. Influence of different *Oryza* cultivars on expression of *nifH* gene pools in roots of rice. **Environmental Microbiology**, Washington, DC, v.7, p.1725-1733, 2005.

KRAUTER, R.; FRIEDT, W. Propagation and multiplication of sunflower lines (*Helianthus annuus* L.) by tissue culture in vitro. **Helia**, Novi Sad, v. 14, p. 117–122, 1991.

LAZAROVITS, G.; NOWAK, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **Horticultural Science**, Alexandria, v. 32, p. 188-192, 1997.

LIMA, R. V.; LOPES, J. C.; SCHMILDT, E. R.; MAIA, A. R. Germinação *in vitro* de urucum. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n.1, p.171-177, 2007.

MACIEL, A.L.R.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Aclimatização de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.9-12, 2000.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; TEIXEIRA, D. do A.; ZAUZA, E. A. V. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 589-597, 2007.

MARTÍNEZ, L.; CABALLERO-MELLADO, J.; OROZCO, J.; ESPERANZA MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 257, p. 35-47, 2003.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: _____ **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. P. 399-471.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NEHL, D. B.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 5, p. 1-20, 1996.

PATERSON, K.E.; EVERETT, N.P. Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. **Plant Science**, Strasbourg, v. 42, p. 125-132, 1985.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gómez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Furticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, 2001.

PITARD, R.M. **Banco de germoplasma de bactérias diazotróficas e actinomicetos**. EMBRAPA Agrobiologia, 2002. Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/pesquisas/projetos/022000446.html>>. Acesso em: 29 fev. 2011.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

SAKIYAMA, C. C. H. **Colonização de *Coffea arabica* L. por bactérias endofíticas promotoras de crescimento**. 2001, 80 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 345-352, 2005.

SCHLOTTER, M.; HARTMANN, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 25, p. 159- 179, 1998.

SILVA, A.L.L., BISOGNIN, D.A., BARRIQUELLO, C.J. AND RITTER, C.E.L. Germinação *in vitro* de sementes de mogango (*Cucurbita pepo* L.) – cucurbitaceae. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 27, n.1, p. 19-28, 2005.

SILVA, P. C.; DIAS, J. M. M.; NEVES, J. C. L.; SALOMÃO, L. C. S.; COUCEIRO, M. A.; ROCHA, M. A. **Protocolo para desinfestação de sementes de tangerineira ‘Cleópatra’ (*Citrus resnyi* Hort. Ex Tan.)**. UFPEL, 2008. Disponível em: <http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/fitotecnia/317.htm>. Acesso em: 28 fev. 2011.

SILVA, R. R. P.; RIBEIRO, A. P. O. ; TEIXEIRA, J. R.; SANTOS, M. A.; FERREIRA, A. S. Padronização do cultivo de algodão (*Gossypium hirsutum*) *in vitro*. In: SEMANA ACADÊMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, 5., 2008, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU, 2008. Disponível em: <<http://www.ic-ufu.org/anaisufu2008/PDF/SA08-11024.PDF>> Acesso em: 03 jun. 2011

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotechnology do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 235 p.

SMIDERLE, O.J. **Potencial de girassol em duas épocas de semeadura em Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2002. 16 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2).

SUMAN, A.; SHASANY, A.K.; SINGH, M. ; SHAHI, H.N. ; GAUR, A.; KHANUJA, S.P.S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Lucknow, v. 17, p. 39-45, 2001.

TEIXEIRA, M.A.; MELO, I.S. de; VIEIRA, R.F. **Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas na mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 19 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 34).

VASUDEVAN, P.; SHARMA, S.; KUMAR, A. Liquid fuel from biomass: an overview. **Journal of Scientific and Industrial Research**, New Delhi, v. 64, p. 822-831, 2005.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 487-511, 2001.

ANEXO: Composição de meios de cultura utilizados no trabalho.

MEIO DE CULTURA MGC – MEIO PARA GERMINAÇÃO DE COTTON (SILVA; TEIXEIRA; FERREIRA, 2008)

- 14 g de sacarose ou açúcar cristal;
- 0,2 g de K_2HPO_4 ;
- 0,6 g de KH_2PO_4 ;
- 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;
- 0,02 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$;
- 0,002 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$;
- 0,01 g de FeEDTA;
- 1000 mL de água destilada;
- 10 g de ágar para meio sólido;
- pH ajustado em 5,5.

MEIO DE CULTURA MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)

- 1650 mg de NH_4NO_3 ;
- 1900 mg de KNO_3 ;
- 440 mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$;
- 370 mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;
- 170 mg de KH_2PO_4 ;
- 0,83 mg de KI;
- 6,2 mg de H_3BO_3 ;
- 22,3 mg de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$;
- 8,6 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$;
- 0,25 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$;
- 0,025 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$;
- 0,025 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$;
- 27,8 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$;
- 37,3 mg de $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$;
- 0,1 mg de tiamina HI;

- 0,5 mg de ácido nicotínico;
- 0,5 mg de piridoxina HCl;
- 2,0 mg de glicina;
- 30 g de sacarose;
- 0,1 g de inositol;
- 1000 mL de água destilada;
- 8 g de ágar;
- pH ajustado em 5,7-5,8.

MEIO DE CULTURA DYGS

- 2 g de glicose;
- 1,5 g de peptona bacteriológica;
- 2 g de extrato de levedura;
- 0,5 g de K_2HPO_4 ;
- 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;
- 1,5 g de ácido glutâmico;
- 1000 mL de água destilada;
- pH ajustado em 6,0.