

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPÔS JABOTICABAL

PRODUÇÃO DE UM INOCULANTE BIOLÓGICO PARA A CULTURA
DO ALGODÃO

DANIEL MANDETTA DE SOUZA JÚNIOR

Jaboticabal - SP

2º Semestre de 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPÔS JABOTICABAL

PRODUÇÃO DE UM INOCULANTE BIOLÓGICO PARA A CULTURA
DO ALGODÃO

DANIEL MANDETTA DE SOUZA JÚNIOR

Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –
UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para graduação em ENGENHARIA
AGRONÔMICA.

Jaboticabal - SP

2º Semestre de 2022

S729p Souza Júnior, Daniel Mandetta de
Produção de um inoculante biológico para a cultura do algodão / Daniel Mandetta de Souza Júnior. -- Jaboticabal, 2022
52 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Everlon Cid Rigobelo

1. Microbiologia agrícola. 2. Nitrogenio Fixação. 3. Microorganismos do solo. 4. Cotonicultura. 5. Inoculação. I. Título.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO: CIÊNCIAS DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO
TRABALHO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICATÍTULO: PRODUÇÃO DE UM INOCULANTE BIOLÓGICO PARA A CULTURA DO
ALGODÃO

ACADÊMICO: DANIEL MANDETTA DE SOUZA JÚNIOR

CURSO: ENGENHARIA AGRONÔMICA

ORIENTADOR (ES): PROF. DR. EVERLON CID RIGOBELLO

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

(Nomes)

Presidente	Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo
Membro	Dr. Carlos Henrique Barbosa Santos
Membro	Edvan Teciano Frezarin

(Assinaturas)

Jaboticabal 03 / 08 / 2022

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 25 / 11 / 2022

Chefe do Departamento
Prof. Dr. Leonardo Bianco de Carvalho
Chefe do Depto. de Ciências da Produção Agrícola
FCAV/UNESP

AGRADECIMENTOS

A **Deus** primeiramente, pelo sustento, provisão, graça e misericórdia que são diárias. E por demonstrar seu cuidado conosco desde as coisas mais simples da vida.

A **minha avó** Ana, por todo seu carinho e amor, por todo o suporte e apoio que nunca faltaram.

A **minha namorada Ana Lígia**, por sua companhia, sua paciência e pelo seu amor que me são vitais.

A **minha família**, meus pais Eliana e Daniel por toda a educação e por todo amor que nunca faltou. E minha irmã Isabella que sempre me apoiou.

A **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, onde tive o privilégio de adquirir técnicas e conhecimento e me aprimorar.

Ao **Professor Doutor Everlon Cid Rigobelo**, pela orientação, paciência e conhecimento passado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)**

Aos membros da banca examinadora **Doutor Carlos Henrique
Barbosa e Edvan Frezarin**

Aos meus colegas de graduação João Pedro, Matheus e Bruno
Zunfrilli por todo o companheirismo durante esta jornada.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho consiste no isolamento de bactérias com potencial para produção de inoculante para a cultura do algodão, para tanto, foi realizado o isolamento de microrganismos provenientes dos órgãos vegetais (raiz, caule e folha) do algodoeiro. O isolamento resultou na obtenção de 356 isolados. Estes isolados foram testados em laboratório para avaliação de atividades-chave para a promoção do crescimento vegetal tais quais, solubilização de fosfato inorgânico, fixação biológica de nitrogênio e produção de ácido indolacético (AIA). Ao final dos testes um total de 6 isolados foram selecionados com base nos seus resultados positivos em laboratório. Após isso foram montados dois experimentos em casas de vegetação. Os experimentos contaram com 6 tratamentos inoculados (isolados: 17, 21, 71, 84, 140 e 312) e um controle, sem inoculação. No primeiro experimento avaliou-se a massa seca de parte aérea e de raiz, e teor de N e P da parte aérea. O isolado 312 foi superior ao isolado 17 em relação a massa seca da parte de área, nenhum tratamento inoculado diferiu do controle. No entanto, o isolado 312 apresentou valores maiores que o controle. O segundo experimento foi montado utilizando os mesmos isolados em duas condições distintas de adubação, com 50 e 100% da adubação recomendada. Não foi observada diferença significativa entre as variáveis (massa seca de parte aérea e massa seca da raiz) e isso se deve possivelmente a má qualidade da semente empregada. Apesar dos resultados promissores *in vitro* os isolados não foram superiores ao tratamento controle em condições de casa de vegetação. É sugerido que se realize a identificação do isolado 312, e que este seja testado em campo, em diferentes concentrações, bem como, em solos mais pobres em N e P, para averiguar sua real capacidade na promoção de crescimento vegetal.

Palavras chave: Microbiologia agrícola, nitrogênio fixação, microrganismos do solo, cotonicultura, inoculação

ABSTRACT

The objective of the present study is the isolation of bacteria with potential for the production of inoculants for the cotton crop. For this, microorganisms were isolated from the plant organs (root, stem and leaf) of the cotton plant. The isolation resulted in 356 isolates. These isolates were tested in the laboratory to evaluate key activities for plant growth promotion, such as inorganic phosphate solubilization, biological nitrogen fixation and indoleacetic acid (IAA) production. At the end of the tests a total of 6 isolates were selected based on their positive results in the

laboratory. After that, two experiments were set up in greenhouses. The experiments had 6 inoculated treatments (isolates 17, 21, 71, 84, 140, and 312) and one control, without inoculation. In the first experiment, the dry mass of aerial part and root, and N and P content of the aerial part were evaluated. The isolate 312 was superior to isolate 17 with respect to area dry mass, and no inoculated treatment differed from the control. The isolate 312, however, showed higher values than the control. The second experiment was set up using the same isolates in two different fertilization conditions, with 50 and 100% of the recommended fertilization. No significant difference was observed between the variables (aboveground dry mass and root dry mass) and this is possibly due to the poor quality of the seed used. Despite the promoting in vitro results, the isolates were not superior to the control treatment under greenhouse conditions. It is suggested that isolate 312 be identified and tested in the field at different concentrations, as well as in soils poorer in N and P, to verify its real capacity to promote plant growth.

Key words: Agricultural microbiology, nitrogen fixation, soil microorganisms, cotton farming, inoculation.

SUMÁRIO	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO LITERÁRIA	3
2.1 Sobre o Algodão	3
2.2 Sobre as Bactérias Promotoras de Crescimento das Plantas	4
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio	5
2.4 Solubilização de Fosfato Inorgânico	7
2.5 Produção de Ácido Indolacético	9
3 OBJETIVO	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Isolamento bacteriano	12
4.1.2 Isolamento de bactérias epífitas	13

4.1.3 Isolamento de bactérias endofíticas	13
4.2 Seleção de bactérias Solubilizadoras de Fosfato Inorgânico	14
4.2.1 Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio	16
4.2.2 Seleção de bactérias produtoras de AIA	16
4.3 Primeiro Experimento em Casa de Vegetação	16
4.4 Acúmulo de Fósforo na Parte Aérea.	19
4.5 Acúmulo de Nitrogênio na Parte Aérea.	19
4.6 Segundo Experimento em Casa de Vegetação	20
4.7 Análise estatística de dados	22
5 RESULTADOS	22
5.1 Resultados do Isolamento	22
5.2 Teste de Solubilização de Fosfato Inorgânico	24
5.2.3 Determinação da Solubilização de Fosfato Inorgânico pelos isolados	26
5.3 Fixação Biológica de Nitrogênio	27
5.4 Teste de Produção de Ácido Indolacético (AIA)	27
5.5 Determinação do Matéria Seca	28
5.6 Acúmulo de Fósforo e na Parte Aérea.	29
5.7 Acúmulo de Nitrogênio na Parte Aérea.	30
5.8 Segundo Experimento em Casa de Vegetação	30
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÕES	31
LITERATURA CITADA	33

1 INTRODUÇÃO

O algodoeiro em especial o *Gossypium hirsutum* L. raça latifolium Hutch. é uma das dez principais espécies domesticadas pelo ser humano entre mais de 230 mil espécies de plantas superiores. O algodoeiro é a única espécie domesticada, tida em termos econômicos como trina, por produzir fibra – seu principal produto – que atualmente ainda veste quase metade da humanidade, óleo que serve para alimentação humana e para produção de energia (biodiesel) (BELTRÃO & AZEVEDO 2008.)

Nos últimos anos, o Brasil tem se mantido entre os cinco maiores produtores mundiais de algodão ao lado de países como China, Índia, EUA e Paquistão. Ocupa o primeiro lugar em produtividade e o cenário interno é promissor, pois está entre os maiores produtores mundiais de algodão em pluma. Após a produção de 2,5 milhões de toneladas de pluma na safra 2021/2022, a produção de pluma deverá voltar a subir em 2022/2023 no Brasil. A produção foi projetada em 2,9 milhões de toneladas pela Associação Brasileira de Produtores de Algodão (ABRAPA, 2022).

A pobreza química e a acidez dos solos do Cerrado podem reduzir a produtividade do algodoeiro se medidas adequadas de correção e adubação não forem adotadas. O conteúdo de fósforo (P) é limitado em solos ácidos, como os de Cerrado, tornando-se indisponível às plantas, pela rápida formação de complexos insolúveis com cátions, especialmente Al e Fe (Vance et al. 2003). E no algodoeiro, a demanda por P é alta do início da formação dos botões florais até a maturação (FRYE & KAIRUZ, 1990).

A produção de algodão envolve a utilização de grande quantidade de insumos agrícolas e fertilizantes. Nesse contexto, várias pesquisas têm apresentado o uso de microrganismos promotores de crescimento de plantas como alternativa para melhorar a eficiência de absorção de nutrientes pelas plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2002), e também como mitigadoras de estresses abióticos (PORTO, 2004) e estresses bióticos como resistência a fitopatógenos (THULER & BORTOLI, 2006). O uso de microrganismos tem grande impacto no cultivo pois diminui os custos de produção e os impactos ambientais causados pelo uso indiscriminado de fertilizantes na agricultura (PEDRAZA *et al.*, 2010).

Os microrganismos presentes no solo desempenham um papel fundamental no agroecossistema. A rizosfera é a área do solo que fica adjacente às raízes da planta, com isso, a interação entre os microrganismos do solo e as raízes das plantas são intensas (PÉREZ-JARAMILLO, MENDES, RAAIJMAKERS, 2016).

A utilização de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) é uma alternativa que se difunde cada vez mais na agricultura. Essas bactérias, encontradas principalmente na região da rizosfera, podem atuar como agentes protetores contra patógenos, sintetizar fitormônios, atuar na melhoria do aporte de nutrientes pelas plantas e induzir mudanças na fisiologia, permitindo melhores processos de floração, germinação e estabelecimento das plantas (EGAMBERDIYEVA & HÖFLICH, 2004; KENNEDY, CHOUDHURY & KECSKÉS, 2004; COMPANT *et al.*, 2005; HAYAT *et al.*, 2010).

As BPCPs utilizadas como inoculantes biológicos são uma ótima alternativa para o enfrentamento de grandes desafios da produção agrícola brasileira, incluindo a produção de algodão. Entretanto, não há no mercado nenhum inoculante registrado para algodão. Neste sentido, o trabalho objetivou selecionar isolados bacterianos de plantas de algodão com potencial para inoculante nesta cultura.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Sobre o Algodão

O algodão (*Gossypium* L.) é originário da península Arábica, do Paquistão, África Central e das Américas. É uma planta da família Malvaceae, com porte médio, herbáceo/arbóreo, anual/perene, ciclo de 165-180 dias, C3 e com uma arquitetura cônica (CEPEA, 2020).

O algodão é uma das principais culturas produzidas do Brasil sendo este um dos maiores produtores mundiais dessa cultura. A colheita é realizada com 140 a 200 dias de idade, variando conforme a cultivar e as condições climáticas e ambientais. Quando o capulho do algodoeiro amadurece, mostra então a matéria fibrosa que envolve as sementes. Depois de colhido, o algodão é levado às algodoeiras, onde se separa a fibra do caroço. A fibra é matéria-prima para a indústria têxtil e de fiação (NEVES & PINTO, 2012).

O algodoeiro é uma cultura altamente exigente quanto à qualidade do solo, portanto áreas acentuadamente ácidas ou pobres em nutricionalmente, excessivamente úmidas ou sujeitas a encharcamento e os solos rasos ou compactados não favorecem o cultivo desta cultura (CARVALHO, 1996)

O uso do solo de forma intensiva e o aumento da produtividade agrícola esgotam os nutrientes do solo, a reposição de nutrientes é extremamente necessária para atingir uma boa produtividade (GWATHMEY, 2005).

O alto consumo de fertilizantes é justificado pelo fato da produção estar concentrada nas regiões do Cerrado, onde os solos dessas regiões não fornecem condições nutricionais ideais, gerando maiores custos para a produção da cultura (BUENO et. al 2004).

2.2 Sobre as Bactérias Promotoras de Crescimento das Plantas

Plantas são seres holobiontes, hospedam diversos microrganismos associados, dentro e fora de seus tecidos, estes constituem então o microbioma vegetal. Microrganismos estes que podem estabelecer relações mutualísticas, comensalistas e/ou parasitárias com as plantas (SCHLAEPPPI & BULGARELLI, 2015).

As bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) são aquelas que apresentam a capacidade de colonizar as raízes das plantas e estimular o crescimento e rendimento das plantas cultivadas (CHANWAY et al., 1989).

Estas bactérias colonizam o interior das plantas e estabelecem uma relação mutualística entre planta e bactéria. O início desta relação ocorre com a estimulação à colonização vegetal por sinalizações radiculares liberadas pelas plantas (exsudatos). Além disso, a colonização pode ocorrer através da entrada de bactérias pelas aberturas naturais, como os estômatos nas folhas, ou por ferimentos presentes nas

plantas. Uma vez presente no interior da planta, as bactérias podem colonizar demais estruturas como folhas e caule (AFZAL et al., 2019).

As (BPCPs) estão presentes no solo naturalmente e frequentemente são isoladas da rizosfera de diversas plantas. Os gêneros mais estudados são: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium* e *Bacillus*. Os benefícios diretos gerados por estes microrganismos sobre o desenvolvimento das plantas são amplos, como na germinação de sementes, emergência de plântulas e crescimento das plantas (LAZARETTI & BETTIOL, 1997) como a fixação biológica de nitrogênio (Baldani et. al, 2000), solubilização de fosfato (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; GULATI et. al, 2009) produção de fitohormônios (MARIANO & KLOEPPER, 2000). E também existem os benefícios indiretos antagonismo contra patógenos ou resistência a drogas, podendo assim então, favorecer o aumento da produtividade de plantas cultivadas comercialmente (PEDRINHO, 2009).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

Após o carbono, oxigênio e hidrogênio, o nitrogênio (N) aparece como quarto elemento mais abundante nas plantas, além disso ele é o primeiro nutriente fundamental para o desenvolvimento vegetal, e está presente na formação de proteínas, ácidos nucleicos, clorofila e hormônios exigidos pelas plantas. No algodão, o nitrogênio está diretamente relacionado ao metabolismo, produtividade e qualidade da fibra produzida (WILD & RUSSELL, 1992).

Apesar de haver uma abundância de N_2 na atmosfera terrestre, os organismos eucariotos (plantas e animais) são incapazes de utilizar este elemento de forma direta. Apenas uma porção dos organismos procariotos é capaz de converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera em amônia, esta pode ser incorporada para o crescimento e manutenção das células vegetais. A fixação biológica de nitrogênio é a maior responsável pelo aporte de nitrogênio nos sistemas biológicos, contribuindo com cerca de 65% do nitrogênio fixado. (NEWTON, 1999)

Os organismos capazes de realizar esta conversão são denominados diazotróficos e o mecanismo responsável pela incorporação de N à biomassa é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MARIN et.al, 1999).

Espécies dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* apresentam a capacidade de fixar nitrogênio biologicamente sendo dominantes na rizosfera vegetal em que habitam. As espécies do gênero *Azospirillum* são amplamente encontradas nos solos de regiões tropicais. A espécie *Azospirillum brasilense* apresenta resultados satisfatórios quando inoculadas em milho, trigo e sorgo. (CHEN et al., 1994; DOBEREINER & DEPOLLI, 1980; MILANI, 2016; FERREIRA et al., 1987)

Na fixação industrial do N_2 , cujo processo é chamado de Haber-Bosch, utiliza-se temperaturas por volta de $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressões em torno de 200 atm, sendo dispendiosa do ponto de vista energético.

Já no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), organismos procariotos são capazes de assimilar o N_2 atmosférico e convertê-lo a forma assimilável (NH_3). A fixação biológica de nitrogênio

FBN acontece pela ação da enzima nitrogenase, o que do ponto de vista energético é dispendioso para o organismo que a realiza, a reação pode ocorrer à temperatura ambiente e pressão atmosférica graças a um sistema enzimático apropriado.

O processo industrial converte cerca de 80×10^{12} g ano⁻¹ de Nitrogênio molecular em amônia, enquanto, em processos de fixação naturais a conversão é de cerca de 190×10^{12} g ano⁻¹. Deste total fixado por processos naturais, os relâmpagos são responsáveis por cerca de 8%, as reações fotoquímicas, entre óxido nítrico gasoso (NO) e o ozônio (O₃), produzindo o ácido nítrico (HNO₃), por cerca de 2% e a fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias ou algas azuis responsáveis por aproximadamente 90%. Por isso se faz necessário o estudo destes organismos tão importantes para a agricultura (TAIZ & ZEIGER, 2004; REIS et al., 2006; PEDRINHO, 2009).

2.4 Solubilização de Fosfato Inorgânico

O fósforo é o segundo nutriente mais importante para o desenvolvimento de plantas, ficando atrás somente do nitrogênio. Este elemento é o principal constituinte de combinações vitais como nucleotídeos, lecitina, e também é o constituinte do ATP, molécula de armazenamento e transferência de energia na planta (FORNASIERI FILHO, 1992).

O solo possui uma grande reserva de fósforo porém, a maior parte está na forma insolúvel, pois está associado aos fosfatos de cálcio e de magnésio em solos alcalinos e ao fosfato de ferro e de alumínio em solos

ácidos, que não podem ser absorvidos pelas plantas, sendo assim, em tais situações, apesar de presente o fósforo não está disponível para as plantas. As maiores reservas de P são as rochas e outros depósitos, como as apatitas e outros minerais primários formados durante a era geológica (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999; PRINSEN et al., 1999; CHAUHAN et al., 2017; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; LÓPEZ-BUCIO et al., 2002).

Em sua forma solúvel, o fósforo aparece em baixa concentração nos solos, em níveis de até 1 ppm (H_2PO_4). Os solos agrícolas em sua maioria, contém grandes reservas de fósforo acumulado como consequência de aplicações regulares de fertilizantes fosfatados. Porém, uma grande porção é rapidamente imobilizada após a aplicação, pois, em determinadas condições do pH e do tipo de solo, torna-se indisponível às plantas. Uma solução a isto, é a utilização de processos microbiológicos para aproveitar o fosfato de rochas. Vários estudos têm examinado a habilidade de diferentes espécies bacterianas em solubilizar compostos de fosfato inorgânico. Entre os gêneros que apresentam esta capacidade são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999; ZAPATA & AMANN, 1995)

Ainda que a diversidade de bactérias solubilizadoras de P no solo seja grande, os níveis populacionais observados normalmente são baixos para que ocorra uma competição com bactérias comumente associadas à rizosfera. Para que a quantidade de P liberada por estes organismos seja suficiente para promover o crescimento vegetal, deve-se promover a

inoculação destes organismos em concentrações elevadas. A co-inoculação de espécies solubilizadoras de P juntamente com espécies diazotróficas, bem como o uso conjunto de fungos micorrízicos arbusculares pode prover uma nutrição vegetal equilibrada e apresentar efeitos sinérgicos na promoção do crescimento (BERG et al., 2009; BELIMOV et al., 1995; KUNDU & GAUR, 1984).

O mecanismo de ação na solubilização de P mineral é através dos ácidos orgânicos sintetizados por os microrganismos, o que também promove a acidificação do ambiente ao redor da célula microbiana e também da mesma. O ácido glucônico aparece como o ácido mais frequente na solubilização. Outros ácidos presentes na solubilização de fosfatos são os ácidos isovalérico, isobutírico, 2-cetoglucônico, láctico e acético. A liberação de prótons H^+ para a superfície celular externa nos processos de absorção de cátions ou através do auxílio das ATPases, a produção de substâncias quelantes ou a produção de ácidos inorgânicos (sulfídrico, nítrico e carbônico), podem constituir mecanismos alternativos na solubilização de fosfatos inorgânicos. (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999; PEDRINHO, 2009).

2.5 Produção de Ácido Indolacético

Os hormônios vegetais atuam como reguladores naturais de crescimento nas plantas, em baixas concentrações, influenciando os processos fisiológicos. Algumas espécies de microrganismos endofíticos têm apresentado a capacidade de estimular o crescimento das plantas por mecanismos indiretos como o antagonismo contra patógenos ou resistência a drogas e por mecanismos diretos por meio da fixação

biológica de nitrogênio, produção de fitohormônios vegetais (SOUZA, 2001).

Auxina é o nome dado a um grupo de compostos que estimulam o crescimento. A origem do termo auxina, cujo significado em grego é “crescer”, se dá quando, cientistas examinaram substâncias de crescimento da planta na urina de humanos, nomeadas de auxinas A e B, estas quais foram gradualmente descartadas. Um composto estrutural isolado de fungos recebeu o nome de heteroauxina, atualmente classificada como heteroauxina bioativa, a qual foi determinada mais tarde como 3-ácido indol acético (AIA) (THIMANN, 1977; KÖGL & HAAGEN SMIT, 1931).

O ácido indol acético (AIA) é a forma predominante das auxinas. Evidências sugerem que existem outras auxinas indólicas naturais nas plantas, além do AIA, outros compostos sintéticos também favorecem o crescimento das células: o ácido indenoacético, o ácido 2-benzofuranacético, o ácido 3-benzofuranacético, o ácido naftalenacético. Posteriormente, se observou que outros compostos que possuem anel indólico também promovem o crescimento, como o ácido 3-indolpirúvico, o ácido indolbutírico derivados do naftaleno como o ácido naftil-1-acético e o ácido naftoxi-2-acético.

Por último, alguns ácidos fenoxiacéticos como o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), o ácido 2-metil, 4-cloro fenoxiacético (AMCP) e o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5- T), todos possuindo com propriedades herbicidas quando empregados em concentrações elevadas

e utilizados como armas químicas na guerra do Vietnã. A principal auxina encontrada nas plantas é o ácido indol acético, conhecido pela sigla AIA. Essa substância é produzida no meristema apical (gema) do caule e transportada através das células do parênquima até as raízes. O transporte do AIA é unidirecional, e depende de energia para ocorrer.

O efeito principal das auxinas é promover o crescimento de caules e raízes, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas. Esse efeito depende, no entanto, da concentração do hormônio. Em alguns tecidos as auxinas controlam a divisão celular. O cultivo de tecidos vegetais foi possível graças à ação das auxinas sobre a divisão celular. Em altas concentrações a auxina inibe o alongamento celular e o crescimento do órgão. A sensibilidade das células de diferentes partes da planta a auxina pode variar, o caule, por exemplo, é menos sensível à auxina que a raiz (PEDRINHO, 2009)

3 OBJETIVO

Isolar bactérias oriundas de plantas de algodão com habilidade de promoção de crescimento em plantas desta mesma cultura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

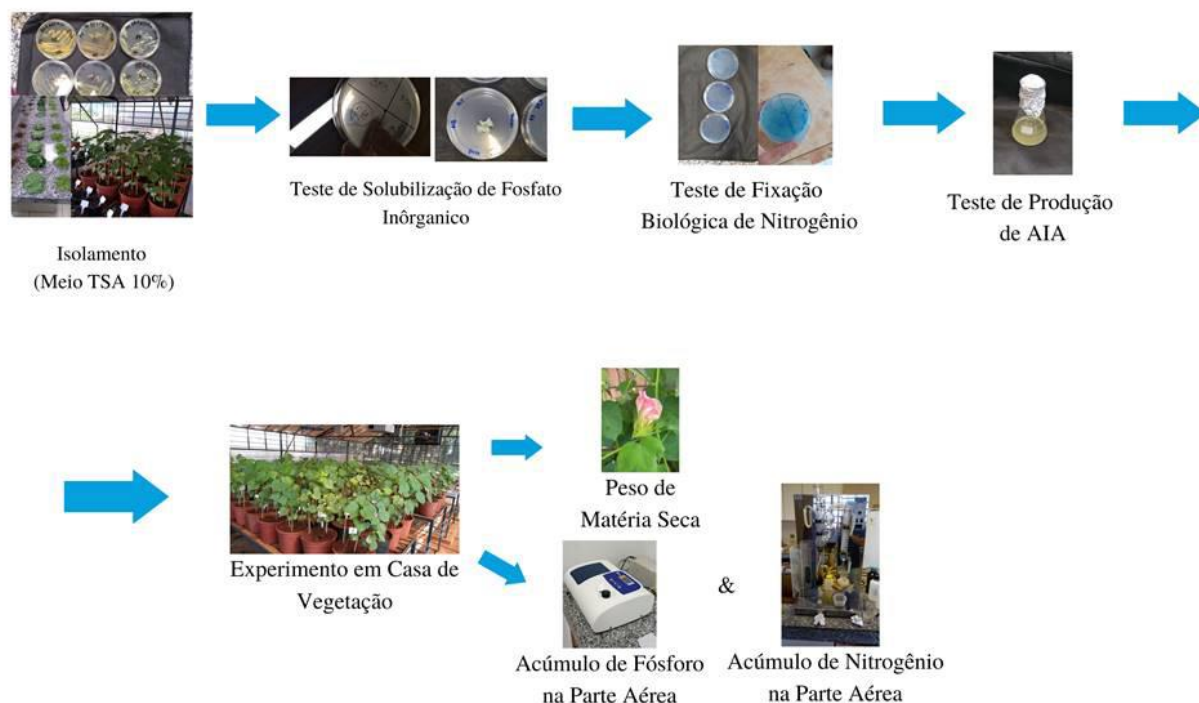


Figura 1: Esquema das etapas de isolamento bacteriano até teste em casa de vegetação.

4.1 Isolamento bacteriano

O isolamento dos microrganismos foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Kuklinsky-Sobral *et al.* (2004). No presente estudo não foi adicionado o fungicida Imazil ao meio TSA 10%. Vinte plantas de algodão (10 plantas com a tecnologia Glytol[®] x Libertylink[®] e 10 plantas da cultivar IMA 7501 WS) foram cultivadas em casa de vegetação. As plantas de algodão foram cultivadas em vasos de 5 dm³ preenchidos com latossolo Vermelho, no período de setembro a novembro de 2020. Trinta dias após a semeadura, as plantas em estágio fenológico V4 foram coletadas e separadas em raízes, caule e folhas. Todo o material vegetal foi lavado em água corrente (para retirar o excesso de solo) e posteriormente acondicionado em sacos de papel.

Posteriormente, o material vegetal foi levado ao laboratório para as análises correspondentes.

4.1.2 Isolamento de bactérias epífitas

As bactérias epífitas foram isoladas do caule, folhas e raízes das plantas de algodão. Pesou-se três gramas de material vegetal de cada cultivar. O material foi colocado em frascos de Erlenmeyer contendo 25 gramas de esferas de vidro de 0,1 cm de diâmetro e 50 mL de solução salina tamponada com fosfato estéril (Na_2HPO_4 : 1,44 g; KH_2PO_4 : 0,24 g; KCl: 0,20 g; NaCl: 8,00 g por litro; pH: 7,4), agitando-se na frequência de 150 rpm a 28 °C por 1 hora. Após a agitação, foram plaqueados 5 mL do conteúdo do frasco Erlenmeyer em 10% de ágar de triptona de soja (TSA). As placas foram mantidas a 28 °C por 15 dias. As colônias foram isoladas e repicadas em duplicata em tubos inclinados de TSA, mantidas a 28 °C por 2 dias e, em seguida, armazenadas a 4 °C.

4.1.3 Isolamento de bactérias endofíticas

As bactérias endofíticas foram isoladas após a desinfecção de 3 g de caule, folhas e raízes usando lavagem serial com hipoclorito. O processo de desinfecção procedeu da seguinte forma: lavagem em água destilada por um (1) minuto, Etanol 70% por um (1) minuto, Hipoclorito a 2% por quatro (4) minutos, Etanol 70% por trinta (30) segundos e por fim enxaguados em água destilada. A eficiência do processo de desinfecção foi verificada por plaqueamento de alíquotas de água destilada esterilizada usadas na lavagem final das plantas. Essas alíquotas foram

colocadas em 10% de ágar de triptona de soja e mantidas a 28 °C por 15 dias. Após a desinfecção, o material vegetal foi cortado e triturado em 10 mL de solução salina estéril tamponada com fosfato. A solução resultante foi transferida para frascos de 50 mL, mantidos sob agitação constante a 28 °C e 150 rpm por 1 hora. Posteriormente, 5 mL da solução foi colocada em 10% de TSA e mantido a 28 °C por 15 dias. As colônias foram isoladas e mantidas em tubos inclinados de TSA (10%) a 28°C por 48 horas e, após esse período, armazenadas em geladeira a 4 °C.

4.2 Seleção de bactérias Solubilizadoras de Fosfato Inorgânico

A seleção das bactérias epífitas e endofíticas solubilizadoras de fosfato inorgânico foi realizada de acordo com Verma, Ladha e Tripathi (2001). Os isolados foram cultivados em meio ágar contendo fosfato inorgânico (15g ágar; 10g glicose; 5g NH_4Cl ; 1g NaCl ; 1g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,8g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; pH 7,2), sendo inoculadas cinco colônias por placa mantidas a 28 °C por 48 horas.

A capacidade de solubilizar fosfato inorgânico foi observada pela presença de halo claro em volta das colônias. Após isso, foi verificada a capacidade de solubilização de Fosfato Inorgânico destes isolados com a presença de outras fontes de fósforo no meio. Estas fontes foram: Apatita de Araxá e Fosfato de Ferro, 36 isolados foram selecionados por apresentarem um halo em volta da colônia.

Foi realizada uma seleção a partir da avaliação do halo formado por colônias bacterianas capazes de solubilizar fósforo em meio ágar.

Este meio continha fosfato inorgânico sólido: fosfato de cálcio (0,8 g L⁻¹) a avaliação foi realizada até o décimo quinto (15º) dia após a inoculação utilizando 2 repiques no centro por placa. No décimo quinto (15º) dia foi calculado o índice de solubilização (IS) por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (BERRAQUEIRO et al., 1976). E de acordo com Silva Filho e Vidor (2000), a solubilização pode ser classificada em baixa solubilização (IS < 2), média solubilização (2 < IS < 3) e alta solubilização (IS > 3). Foram selecionados os isolados que obtiveram um índice maior ou igual a 2,5 no 15º dia após a inoculação. Um isolado de *B. subtilis* da coleção do laboratório foi utilizado como controle positivo quanto à solubilização de fosfato de cálcio

Foi feita a quantificação de Fósforo através do método Colorimétrico do Molibdato-Vanadato (BEZERRA & BARRETO, 2011), utilizou-se meio de cultura segundo NAHAS (1994), a saber: 0,1g NaCl; 1g NH₄Cl; 0,2g KCl; 0,5g CaCl₂.2H₂O; 1,2g MgSO₄.7H₂O; 10g Glicose; 0,5g Extrato de levedura; 5g de Ca₃(PO₄)₂; 1000 mL H₂O destilada; pH: 7,0.

Após isso foram adicionados 30 mL de meio em cada Erlenmeyer, foram inoculados cada um com um isolado, e incubados por 48 horas a 120 rpm em 28°C. Em seguida 5 mL da cultura incubada foi colocada em centrífuga por 10.000 rpm durante 10 minutos. Foram inseridos em tubos de ensaio 1 mL do sobrenadante + 4 mL de H₂O + 2 mL da solução de Molibdato-Vanadato. A leitura foi realizada no espectrofotômetro com o comprimento de onda a 420 nm.

4.2.1 Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio

A seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio ocorreu segundo a capacidade de crescimento em meio semissólido livre de nitrogênio, em meio NFb (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI,1995). Foram repicadas 4 colônias em cada placa e posteriormente mantidas a 28°C por 48 horas. A capacidade de fixação de nitrogênio foi identificada pela presença de um halo em volta da colônia.

4.2.2 Seleção de bactérias produtoras de AIA

Para determinação da produção de AIA, utilizou-se e adaptou-se o meio de cultura DYGS (2g Glicose; 1,5g Peptona; 2g Extrato de levedura; 2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; L- triptofano 5mM- 0,5106; 1000 mL H_2O ; pH: 6,8; RODRIGUES NETO *et al.*, 1986). Onde 20 mL de meio foram colocados em Erlenmeyer de 125mL, posteriormente a isso os isolados foram inoculados e incubados por 48 horas a 120 rpm a 28°C. Em seguida, 5 mL da cultura incubada foi colocada em centrífuga por 10.000 rpm durante 10 minutos. Retirou-se 2 mL do sobrenadante e adicionou-se 2 mL do reagente Salkovski e posteriormente, foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após este período ocorreu a leitura em espectrofotômetro a 530 nm.

4.3 Primeiro Experimento em Casa de Vegetação

Foi realizado um experimento em casa de vegetação, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP FCAV coordenadas (-21.242931161734884, -48.29845001250984), em

Jaboticabal no nordeste paulista, nos meses de setembro a novembro de 2021, para avaliação da capacidade de promoção de crescimento de cada isolado obtido nos testes laboratoriais. O experimento foi realizado com temperatura, umidade e irrigação controladas. Os isolados foram nomeados segundo a ordem em que foram isolados e estes foram: 17, 21, 71, 84, 140 e 312. O experimento foi realizado com a cultivar com tecnologia Glytol ® x Libertylink ®, com semeadura de plantio de 3 cm de profundidade e o delineamento foi em blocos ao casualizados com 6 tratamentos inoculados e o controle, sem inoculação. A saber:

Tratament o	Isolado Testado
Tratamento 1	Isolado 17
Tratamento 2	Isolado 21
Tratamento 3	Isolado 71
Tratamento 4	Isolado 84
Tratamento 5	Isolado 140
Tratamento	Isolado

6	312
Tratamento	Sem
7	inoculação

Tabela 1: Tabela de tratamentos do primeiro experimento em casa de vegetação

Cada tratamento contou com 4 repetições e em cada repetição havia 2 plantas por vaso, a adubação ocorreu de acordo com análise química do solo, seguindo a recomendação de Malavolta *et al.* (2006). Os isolados foram crescidos em caldo nutriente a 28°C por 24 horas. A aplicação de cada isolado ocorreu num volume de 5mL, durante a semeadura, quinze dias após a emergência (DAE) e com a última aplicação aos 45 dias DAE, totalizando assim 3 aplicações.

As plantas foram coletadas aos 60 DAE em estágio fenológico R1, coletando-se parte aérea e raiz. Após a coleta das amostras estas foram lavadas, devido a presença de moscas-branca, o procedimento da lavagem da parte aérea ocorreu da seguinte forma: Foram colocadas 4 bandejas para uma lavagem serial. A 1° bandeja contou com água e 1% do volume de detergente neutro, a 2° bandeja continha todo o volume em água, a 3 ° e 4° continham água deionizada. Cada amostra foi levemente esfregada durante 30 segundos em cada bandeja seguindo a ordem da 1° até a 4° bandeja. Após a lavagem, cada amostra foi seca e colocada em uma estufa (a 65°C) de ventilação forçada durante 72 horas. Após a secagem, cada amostra foi pesada em balança semi-analítica para obtenção da massa de matéria seca da parte aérea e raiz. Os parâmetros

avaliados foram: massa seca da parte aérea e da parte radicular e o acúmulo de fósforo e nitrogênio da parte aérea.

4.4 Acúmulo de Fósforo na Parte Aérea.

Após a secagem e pesagem, cada amostra de parte aérea foi triturada em moinho tipo Wiley e armazenada em sacos de papel. Após isso, foram pesadas 0,25g de amostra em cadinhos, após a pesagem, os cadinhos foram levados a mufla onde foram incineradas. Após a incineração, cada amostra foi diluída em ácido nítrico (HNO_3) 0,1N em balões volumétricos de 25 mL.

A determinação do acúmulo de Fósforo na Parte Aérea realizou-se segundo o método Colorimétrico do Molibdato-Vanadato (BEZERRA & BARRETO, 2011). Foram inseridos em tubos de ensaio 1 mL da amostra, 4 mL de H_2O e 2 mL da solução de Molibdato-Vanadato. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 420 nm.

4.5 Acúmulo de Nitrogênio na Parte Aérea.

Após a secagem e trituração das amostras, o nitrogênio foi determinado empregando o procedimento de destilação a vapor direta (N-DVD), proposto por Roberts et al. (2009) com modificações, como descrito a seguir: pesou-se 0,01g de amostra de parte aérea em tubos macro (25 cm X 17cm de altura, 5 cm de diâmetro e volume de 500 mL), o qual foi conectado ao destilador (Tecnal TE 036/1) e recebeu 15 mL de solução de NaOH 10 mol L^{-1} . A mistura foi submetida à destilação até obtenção de 35-40 mL do destilado, o qual foi recebido em 10 mL de solução de H_3BO_3 20 g L^{-1} . O N-NH_4^+ foi quantificado por titulação do

destilado com solução de H_2SO_4 0,0097223044 N em titulador automático.

4.6 Segundo Experimento em Casa de Vegetação

Foi realizado um segundo experimento em casa de vegetação utilizando a cultivar Glytol ® x Libertylink ®, o delineamento foi em blocos casualizados com 4 repetições por tratamento, com esquema fatorial duplo, onde um fator é constituído por dois níveis de adubação (50% e 100%) e o outro fator, pela inoculação. A adubação ocorreu de acordo com a recomendação de Malavolta et al., (2006). Os tratamentos utilizados foram os seguintes:

Tratamento	Isolado	Adubação
o	Testado	
Tratamento 1	Isolado 17	Recomendada
Tratamento 2	Isolado 21	Recomendada
Tratamento 3	Isolado 71	Recomendada
Tratamento 4	Isolado 84	Recomendada
Tratamento 5	Isolado 140	Recomendada

Tratamento	Isolado	Recomend
6	312	ada
Tratamento		Metade da
7	Isolado 17	recomenda
		da
Tratamento		Metade da
8	Isolado 21	recomenda
		da
Tratamento		Metade da
9	Isolado 71	recomenda
		da
Tratamento		Metade da
10	Isolado 84	recomenda
		da
Tratamento	Isolado	Metade da
11	140	recomenda
		da
Tratamento	Isolado	Metade da
12	312	recomenda
		da
Controle	Nenhuma	Recomend
	inoculação	ada

Controle 2	Nenhuma inoculação	Metade da recomenda da
------------	-----------------------	------------------------------

Tabela 2: Tabela de tratamentos do segundo experimento em casa de vegetação

A inoculação foi realizada da seguinte forma: Foi realizada a aplicação de 5 mL de meio de cultura contendo cada isolado no sulco de semeadura. Quinze dias após a emergência, foi realizada uma nova aplicação (5mL) no sulco da planta. As plantas foram coletadas aos 30 DAE em estágio fenológico R1. Os parâmetros avaliados foram: Altura de plantas, volume radicular, massa seca de parte aérea e raiz.

4.7 Análise estatística de dados

As premissas de normalidade e heterogeneidade de variância dos resíduos foram analisadas para cada variável por análise gráfica e pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett. Todas as variáveis foram submetidas à ANOVA e teste de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados do Isolamento

No total, foram isoladas 356 bactérias, das quais 151 foram isoladas da cultivar Glytol ® x Libertylink ® e 205 isolados da cultivar IMA 7501 WS (Tabela 1). Na cultivar Glytol ® x Libertylink ®, o 94,7% foram isolados da raiz e na cultivar IMA 7501 WS, o 65,36% e 33,17% das bactérias foram isoladas da raiz e da folha, respectivamente.

Cultivar	Endofítica s (nº de isolados)	Epífitas (nº de isolados)	Total de isolados
Glytol ® x Libertylink ®			
Caule	3	0	3
Folha	0	5	5
Raíz	92	51	143
Total			151
IMA 7501 WS			
Caule	3	0	3
Folha	3	65	68
Raíz	58	67	134
Total			205
Total geral			356

Tabela 3. Total de microrganismos isolados.

5.2 Teste de Solubilização de Fosfato Inorgânico

Dos 74 isolados com capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, a maior quantidade foi isolada da raiz e esse grupo abrange bactérias endofíticas e epífitas.

Cultivar	Endofíticas (nº de isolados)	Epífitas (nº de isolados)	Total
Glytol ® x Libertylink ®			
Caule	1	0	1
Folha	0	0	0
Raíz	22	15	37
Total			38
IMA 7501 WS			
Caule	0	0	0
Folha	0	4	4
Raíz	13	19	32
Total			36
Total geral			74

Tabela 4: Isolados selecionados com base na solubilização de fosfato inorgânico.

5.2.1 Avaliação do halo de Solubilização de Fosfato Inorgânico

Os resultados da avaliação do halo de solubilização de fosfato inorgânico foram os seguintes:

Isolado	Índice de Solubilização de Fosfato Inorgânico (IS)
17	2,625
21	2,500
71	2,500
84	2,644
140	3,061
312	5,357
4	2,526
1	2,578
3	2,678
7	2,548
<i>B. subtilis</i>	1,489

Tabela 5. Resultado da avaliação do halo de solubilização de fosfato inorgânico, através do índice de solubilização de fosfato inorgânico.

Dos 36 isolados anteriormente selecionados, somente 10 apresentaram resultados positivos no teste

5.2.3 Determinação da Solubilização de Fosfato Inorgânico pelos isolados

Após os testes realizados em placa, onde 10 isolados apresentaram resultados positivos, foi realizada a determinação de fósforo solubilizado por cada isolado, onde os 6 isolados que foram selecionados apresentaram os seguintes resultados.

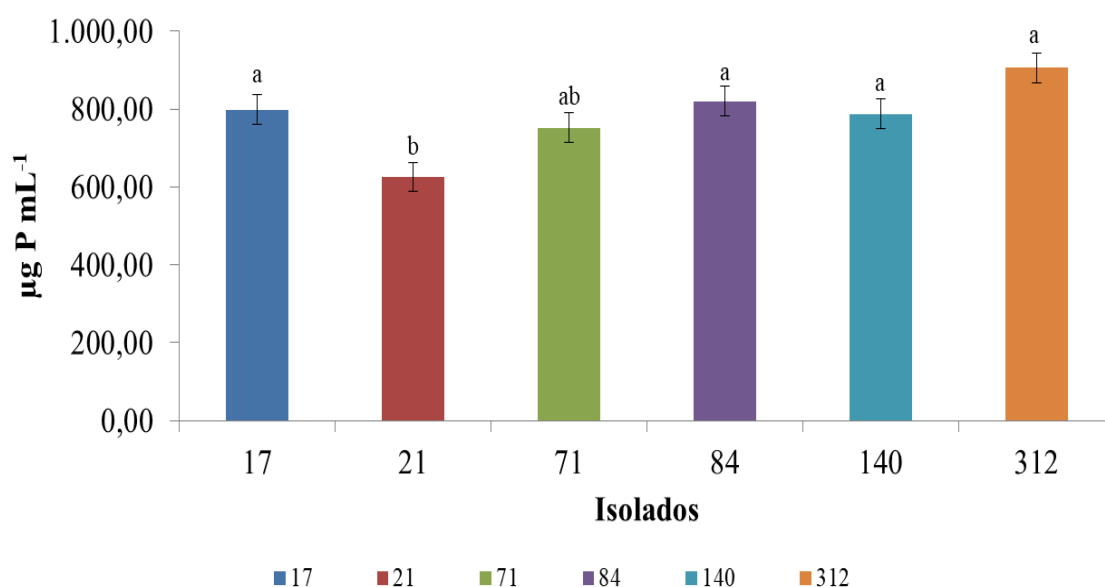


Figura 2. teste de Solubilização de fosfato inorgânico de diferentes isolados oriundos de algodão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os isolados 312, 140, 17 e 84 apresentaram um desempenho satisfatório em comparação ao isolado 21.

5.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

Os 6 isolados que foram solubilizadores de Fosfato Inorgânico foram testados para avaliação de sua capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio. Todos os isolados 6 foram positivos para este teste, sendo que 5 isolados foram oriundos da raiz e endofíticos e 1 oriunda da raiz e epifítico.

Identificação	Origem
Isolado 17	Endofítico (Raiz)
Isolado 21	Endofítico (Raiz)
Isolado 71	Endofítico (Raiz)
Isolado 84	Endofítico (Raiz)
Isolado 140	Endofítico (Raiz)
Isolado 312	Epifítico (Raiz)
Total	6

Tabela.6 Isolados selecionados com capacidade de fixação biológica de nitrogênio e suas características.

5.4 Teste de Produção de Ácido Indolacético (AIA)

Os resultados apresentados pelos isolados no teste de produção de AIA foram os seguintes:

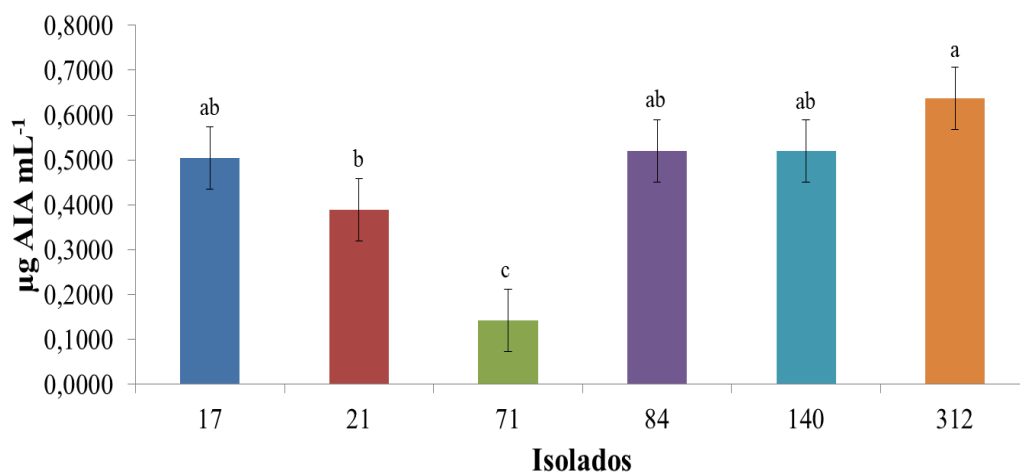


Figura 3. Produção de Ácido Indolacético de diferentes isolados bacterianos oriundos de algodão.

O isolado 312 apresentou maior produção de AIA que os isolados 21 e 71. Em relação aos demais isolados, o isolado 71 produziu a menor concentração de AIA em comparação aos demais isolados. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.5 Determinação do Matéria Seca

A matéria seca das raízes não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Já a matéria seca da parte aérea apresentou os seguintes resultados:

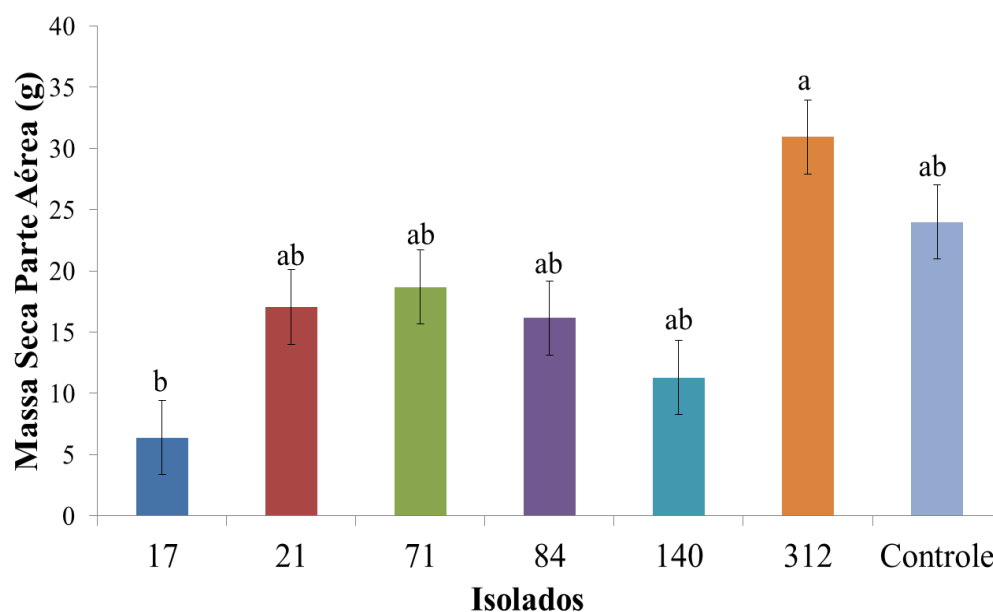


Figura 4. Matéria seca da parte aérea de plantas de algodão inoculadas com diferentes isolados 17, 21, 71, 84, 140, 312 e o controle, sem inoculação. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Como pode ser observado na figura 3, o isolado 312 não diferiu do controle, porém apresentou resultados satisfatórios. O isolado 17 apresentou o pior desempenho em comparação ao isolado 312.

5.6 Acúmulo de Fósforo e na Parte Aérea.

Os resultados de acúmulo de fósforo na parte aérea do experimento em casa de vegetação não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos, apesar de nos testes de solubilização de fosfato inorgânico *in vitro* os isolados terem apresentado resultados promissores, isto não se refletiu no experimento em casa de vegetação.

5.7 Acúmulo de Nitrogênio na Parte Aérea.

Os resultados de acúmulo de Nitrogênio não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, ao contrário dos resultados apresentados pelos isolados no teste de fixação biológica de nitrogênio *in vitro*, no experimento em casa de vegetação isto não se refletiu.

5.8 Segundo Experimento em Casa de Vegetação

Não houve diferença significativa nos parâmetros avaliados neste experimento, nem em relação a adubação e nem em relação a inoculação.

6 Discussão

Apesar dos isolados terem apresentado bons resultados *in vitro* no que tange a solubilização de P, produção de AIA e fixação de N, eles não apresentaram ganhos significativos em massa vegetal, quando empregados em casa de vegetação. Resultados similares já foram relatados por Leoncio (2015).

Isso ocorre, pois, as condições *in vitro* são mais controladas do que no solo, e neste ambiente há mais adversidades ambientais bem como competição com bactérias nativas do solo pela colonização das raízes das plantas, nutrientes, água, entre outros (BECKER et al., 2012). Apesar disso, o isolado 312 mostrou tendências promissoras para a promoção de crescimento vegetal. Em relação ao incremento de massa seca de parte aérea, o isolado 312 foi superior ao isolado 17.

O segundo experimento apresentou resultados contrastantes com o esperado, uma vez que, não foi observada diferença entre os tratamentos com 100% e 50% da adubação. Tais dados podem ser explicados pela perda do vigor das sementes, já que no segundo experimento as sementes estavam mais antigas e se desenvolveram muito lentamente. Possivelmente, no primeiro experimento as sementes ainda apresentavam vigor, e conseguiram expressar toda sua genética, respondendo então, a adubação e a inoculação.

7 Conclusões

O isolado que apresentou melhores resultados em grande parte dos parâmetros avaliados, foi o isolado 312 (epífita). Os isolados 17, 21, 71, e 140 apresentaram excelentes resultados laboratoriais, porém no experimento em casa de vegetação, estes não apresentaram resultados superiores ao controle.

Como visto anteriormente, o isolado 312 apresentou resultados bem expressivos e parece ter potencial para promoção de crescimento vegetal. Por isto, este isolado poderia ser identificado e posteriormente testado novamente em casa de vegetação e em campo.

A maior parte dos microrganismos que foram isolados, são oriundos da raiz das plantas de algodão. Os microrganismos que chegaram até o fim da seleção são oriundos da raiz, porém possuem

características distintas, os isolados 17, 21, 71, e 140 são endofíticos e o isolado 312 , epifítico.

LITERATURA CITADA

ABRAPA- Associação Brasileira dos Produtores de algodão, Disponível em: <<https://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-brasil.aspx>>

Acesso em: 23:23 23/01/2022

ABRAPA - Associação Brasileira dos Produtores de algodão, Brasília DF, 22 de setembro de 2021. Acesso em 05/01/2022

AFZAL, I.; SHINWARI, Z. K.; SIKANDAR, S.; SHAHZAD, S. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, v. 221, p. 36-49, 2019

BALDANI, J.I.; SALLES, J.F.; OLIVARES, F.L. Bactérias endofíticas como vetores de genes de resistência a insetos. In: NASS, L.L., VALOIS, A.C.C., DE MELO, I.S., VALADARES-INGLIS, M.C. (eds). *Recursos Genéticos e Melhoramento*. Campinas, 2000. 589 - 602.

BELIMOV, A.A.; KOJEMIAKOV, A.P.; CHUVARLIYEVA, C.V. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil*. v. 173, p. 29 – 37, 1995.

BECKER, J.; EISENHAUER, F.; SCHEU, S.; JOUSSET, A. Increasing antagonistic interactions cause bacterial communities to collapse at high diversity. *Ecology Letters*, v. 15, n. 5, p. 468-474, 2012. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2012.01759.x.

BELTRÃO NEM, AZEVEDO DMP. O Agronegócio do Algodoeiro no Brasil. Prefácio p3. In: Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2008.

BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 84, p. 11 – 18, 2009.

BERRAQUEIRO, F.R.; BAYA, A.M. & CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilizacion de fosfatos por bacterias del suelo. *ARS Farmacéutica*, v.17, p.399-406,1976.

BEZERRA NETO, E.; BARRETO, L. P. Análises químicas e bioquímicas em plantas. Recife: Editora Universitária da UFRPE, 2011. p 165-168.

BUENO, M.; COSTA, S.; FERREIRA, J. L. (ed.). A saga do algodão: das primeiras lavouras à ação na OMC. Brazil: ABRAPA, Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2004.

CARVALHO, P. P. Manual do algodoeiro. Lisboa: Ministério da Ciência e da Tecnologia, Instituto de Investigação Científica Tropical, 1996.

CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Análise Retrospectiva do Mercado de Algodão. Piracicaba, SP, 2020. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/>. Acesso: 24/08/2022

CHANWAY, C. P.; HYNES, R. K.; NELSON, L. M. Plant growth-promoting rhizobacteria: Effects on growth and nitrogen fixation of lentil (*Lens esculenta* moench) and pea (*Pisum sativum* L.). *Soil Biology and Biochemistry*, v. 21, n. 4, p. 511–517, 1 jan. 1989.

CHAUHAN, A.; GULERIA, S.; BALGIR, P.P.; WALIA, A.; MAHAJAN, R.; MEHTA, P.; SHIRKOT, C.K. Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 48, p. 294 – 304, 2017.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E. A. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 9, p. 4951–4959, 1 set. 2005.

LAZZARETTI, E e BETTIOL, WTRATAMENTO DE SEMENTES DE ARROZ, TRIGO, FEIJÃO E SOJA COM UM PRODUTO FORMULADO À BASE DE CÉLULAS E DE METABÓLITOS DE *Bacillus subtilis*. *Scientia Agricola* [online]. 1997, v. 54, n. 1-2 [Acessado 30 Agosto 2022] , pp. 89-96. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-90161997000100013>>. Epub 04 Fev 1999. ISSN 1678-992X. <https://doi.org/10.1590/S0103-90161997000100013>.

EGAMBERDIYEVA, D.; HÖFLICH, G. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. *Journal of Arid Environments*, v. 56, n. 2, p. 293–301, 1 jan. 2004.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, Brasil.

FORNASIERI, FILHO D. A cultura do milho. Jaboticabal:FUNEP, 1992.

FRYE, I. A. A.; KAIRUZ, I. A. G. Manejo de suelos y uso de fertilizantes. In: FEDERACIÓN NACIONAL DE ALGODOEIRO. Bases técnicas para el cultivo del algodón en Colombia. Bogotá: Guadalupe, 1990. p. 133-202.

GULATI, A.; VYAS, P.; RAHI, P.; KASANA, R.C. Plant growth promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the 37 cold deserts of the Himalayas. *Current Microbiology*. v. 58, p. 371 – 377, 2009.

GWATHMEY, C. O. Do Contemporary Cotton Cultivars Respond Differently to Potassium Fertilization? *Better Crops*, v. 89, p. 8–10, 2005.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil Beneficial Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion: A Review. *Annals of Microbiology*, v. 60, n. 4, p. 579–598, 1 dez. 2010.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? Soil Biology and Biochemistry, Nitrogen Fixation in Australian Agricultural Systems: 13th Australian Nitrogen Fixation Conference. v. 36, n. 8, p. 1229– 1244, 1 ago. 2004.

KÖGL, F.; SMIT, A.J.. Über die Chemie des Wuchsstoffs. K. Akad. Wetenschap Amsterdam Proceedings. Section Science 34: 1411–1416, 1931.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, 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

KUNDU, B. S.; GAUR, A. C. Rice response to inoculation with N₂-fixing and P-solubilizing microorganisms. Plant and Soil, v. 79, n. 2, p. 227-234, 1984.

LEÔNCIO, M. R. Isolamento e caracterização de rizobactérias do alho (*Allium sativum*) e promoção de crescimento do milho (*Zea mays*). 2015. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Universidade Federal

de Santa Catarina, Curitiba, 2015. Disponível em Acesso em 20 Janeiro de 2022

LÓPEZ-BUCIO, J.; HERNADÉZ-ABREU, E.; SÁNCHEZ-CALEDERÓN, L.; NIETOJACOBO, M.F.; SIMPSON, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root systems. *Plant Physiology*, v.129, p.244-256, 2002.

MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo, Agronômica Ceres, 2006.

MARIANO R.L.R.; KLOEPPER, J.W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. v. 8, p. 121 – 137, 2000

Marin, V. A., Baldani, V. L. D., Teixeira, K. D. S., & Baldani, J. I. (1999). Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical.

NAHAS, E.; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Microrganismos solubilizadores de fosfatos e produtores de fosfatases de vários solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.18, p.43-48, 1994.

NEVES, F. N.; PINTO, M. J. A. A CADEIA DO ALGODÃO BRASILEIRO: DESAFIOS E ESTRATÉGIAS ABRAPA, 2012.

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY, 12th, 1999, Foz do Iguaçu. Proceeding. Dordrecht: Klumer Academic Publishers, p. 3-8, 2000.

OLIVEIRA, A. A. de; TORRES, F. E.; SANTOS, Élcio F. dos; RODRIGUES, A. M. .; SILVA, R. A. da; SILVA, G. N. .; GARCIA, F. P. .; MAGRI, T. A. Nitrogen and forms of application of *Azospirillum brasilense* in corn cultivated in sandy soil. Research, Society and Development, [S. l.], v. 11, n. 13, p. e56411335819, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i13.35819. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/35819>. Acesso em: 10 nov. 2022.

PATTEN, C.L. e B.R. GLICK. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can. J. Microbiol. 42(3), 207-230. Doi: 10.1139/m96-032

PEDRAZA, Raúl O. et al. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 26, n. 2, p. 265-272, 2010.

PEDRINHO, Eliamar Aparecida Nascimbém. Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays*). 2009.

PÉREZ-JARAMILLO J, MENDES R, RAAIJMAKERS JM. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Mol Biol*. 2016 Apr;90(6):635-44. doi: 10.1007/s11103-015-0337-7. Epub 2015 Jun 18. PMID: 26085172; PMCID: PMC4819786.

PORTO, Edson Marcos Viana et al. Microrganismos promotores de crescimento de plantas como mitigadores do estresse hídrico em pastagens: uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, p. e514111134029-e514111134029, 2022.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate acquisition. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. v. 50, p. 665 – 693, 1999.

ROBERTS, T. L.; NORMAN, R. J.; SLATON, N. A.; WILSON JUNIOR, C. E.; ROSS, W. J.; BISHONG, J. T. Direct steam distillation as an alternative to the Illinois Soil Nitrogen Test. *Soil Science Society of American Journal*, v. 73, n. 4, p. 1268- 1275, 2009.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR., V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16. 1986.

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

REIS, V.M.; O, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L. & BALDANI, J.I. Fixação Biológica de Nitrogênio Simbiótica e Associativa. In: FERNANDES, M.S. (Ed) Nutrição Mineral de Plantas. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa-MG,. p. 153- 174, 2006.

REMANS, R.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin signaling in plant defense. *Science*. v. 313, p. 171, 2006

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, v. 21, n. 1, p. 1–15, 2011.

SCHLAEPPI, K.; BULGARELLI, D. The plant microbiome at work. *Molecular Plant-microbe Interactions*, v. 28, n. 3, p. 212-217, 2015.

SILVA FILHO, G.N., VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.24, p.311- 319, 2000.

SOUZA, M. L. de. Utilização de microrganismos na agricultura. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, n. 21, p. 28-31, 2001.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. Assimilação de Nutrientes. In: TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3a edição. Porto Alegre-RS, ed. Artmed, p. 286-298, 2004.

THIMANN, K.V. Hormone action in the whole life of plants. Amherst: University of Massachusetts Press. 1977.

THULER, R.T. & BORTOLI S.A, & GUIDELLI THULER, ANA & LEMOS M. (2006). Tratamento de sementes de repolho com Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP) para resistência contra *Plutella xylostella*.. Horticultura Brasileira. 25.

VANCE, C. P.; STONE, C. U.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. New Phytologist, Lancaster, v. 157, n. 1, p. 423-447, 2003.7

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. Journal of Biotechnology. v. 91, p. 127 – 141, 2001.

WILD, A.; RUSSELL, E. J. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas de Russell. Madrid: Mundi-Prensa, 1992.

ZAPATA, F.; AMANN, H. ³²P isotopic techniques for evaluating the agronomic effectiveness of rock phosphate materials. Fertilizer Research, v.41, p.189-195, 1995.