

BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM ABACAXIZEIROS E BANANEIRAS



TÉCNICAS DE INOCULAÇÃO E MONITORAMENTO

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Marcos Vinícius Pratini de Moraes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Diretor-Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Elza Ângela B. Brito da Cunha

José Roberto Rodrigues Peres

Dante Daniel Giacomelli Scolari

Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical

Chefe-Geral

João Pratagil Pereira de Araújo

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Lucas Antônio de Sousa Leite

Chefe Adjunto de Administração

José Ednilson de Oliveira Cabral

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM ABACAXIZEIROS
E BANANEIRAS: TÉCNICAS DE INOCULAÇÃO E
MONITORAMENTO**

Olmar Baller Weber
José Ivo Baldani
Vera Lucia Divan Baldani
Johanna Döbereiner



© Embrapa-CNPAT, 1999

Embrapa-CNPAT. Documentos, 35

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Dra. Sara Mesquita 2270

Planalto Pici

Caixa Postal 3761

CEP 60511-110 Fortaleza, CE

Tel. (085)299-1800

Fax: (085)299-1803 / 299-1833

Endereço eletrônico: marketing@cnpat.embrapa.br

Tiragem: 500 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Raimundo Braga Sobrinho

Secretário: Marco Aurélio da Rocha Melo

Membros: Ervino Bleicher

Francisco das Chagas Oliveira Freire

Francisco Fábio de A. Paiva

Janice Ribeiro Lima

José Luís Mosca

Tânia da Silveira Agostini

Coordenação editorial: Marco Aurélio da Rocha Melo

Diagramação: Arilo Nobre de Oliveira

Normalização bibliográfica: Rita de Cássia Costa Cid

Revisão: Mary Coeli Grangeiro Ferrer

WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J.
Bactérias diazotróficas em abacaxizeiros e bananeiras: técnicas de inoculação e monitoramento. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 1999. 16p. (Embrapa-CNPAT. Documentos, 35).

Termos para indexação: Endófito; Ecologia microbiana; Microbiologia.

CDD: 571.72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO DE ABACAXIZEIROS E BANANEIRAS	6
3 INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓPICAS EM MUDAS MICROPROPAGADAS	8
4 MONITORAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓPICAS NO AMBIENTE	12
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	13
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13

BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM ABACAXIZEIROS E BANANEIRAS: TÉCNICAS DE INOCULAÇÃO E MONITORAMENTO

Olmar Baller Weber¹
José Ivo Baldani²
Vera Lucia Divan Baldani³
Johanna Döbereiner⁴

1 INTRODUÇÃO

As bactérias diazotróficas têm sido isoladas de várias culturas, além de leguminosas e gramíneas, que têm importância econômica e social. De plantas de tubérculos como a mandioca foram isoladas bactérias do gênero *Burkholderia*, entre outras (Balota, 1994). Já em plantas de batata-doce têm sido detectadas espécies de *Azospirillum* (Hill et al., 1983) e *Acetobacter diazotrophicus* (Paula, 1992). Esta última espécie também tem sido isolada de plantas de café (Jiménez- Salgado et al., 1998)

Na rizosfera de fruteiras tropicais têm sido isoladas espécies de *Azospirillum* (Subba Rao, 1983; Ghai & Thomas, 1989). Espécies deste gênero e bactérias diazotróficas do tipo *Herbaspirillum* e *Burkholderia* foram também isoladas de raízes e partes aéreas de abacaxizeiros e bananeiras (Weber, 1998). As bactérias do gênero *Azospirillum* também foram identificadas em raízes de palmeiras (Ferreira et al., 1995).

As bactérias diazotróficas podem estimular o crescimento de plantas, como, por exemplo, batata-doce (Paula, 1992), mandioca (Balota, 1994), abacaxi e banana (Weber, 1998). Não existe, porém, evidência da fixação bioló-

¹ Eng. Agr., D.Sc., Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical (CNPAT), Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Planalto Pici, Caixa Postal 3761, CEP 60511-110 Fortaleza, CE.

² Eng. Agr., Ph.D., Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), Km 47, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970 Seropédica, RJ.

³ Bióloga, Ph.D., Embrapa - CNPAB.

⁴ Enga. Agra., D.Sc., Embrapa - CNPAB.

gica de nitrogênio (FBN) nessas plantas, em contraste ao que ocorre com gramíneas. A contribuição principal das bactérias parece estar relacionada com a produção de substâncias reguladoras de crescimento. As bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de produzir hormônios de crescimento (Fayez & Daw, 1987; Bashan & Levanony, 1990; Bric et al., 1991; Okon & Landera Gonzalez, 1994), bem como outras bactérias diazotróficas (Balota, 1994; Bevivino et al., 1994; Malik et al., 1997).

A aplicação das bactérias diazotróficas em mudas de abacaxi e banana torna-se bastante facilitada, uma vez que as plantas são propagadas vegetativamente. A inoculação de mudas das fruteiras é particularmente importante com a micropropagação, sendo que as plantas podem ser colonizadas no laboratório pelas bactérias livres da concorrência com a microbiota indesejável do solo.

2 PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO DE ABACAXIZEIROS E BANANEIRAS

As mudas de bananeiras cv. Prata Anã (grupo AAB) e cv. Yangambi (grupo AAA) e de abacaxizeiros cv. Pérola (grupo Pernambuco) e cv. Perolera (grupo Maiporé) podem ser obtidas pelo cultivo de meristemas caulinares *in vitro*. O estabelecimento dos meristemas das plantas pode ser realizado no meio MS (Murashige & Skoog 1962), modificado pela suplementação com 30 g .L⁻¹ de açúcar, ajustando-se o pH final para 5,8 (Tabela 1).

O período de adaptação dos explantes é de aproximadamente 30 dias, e os frascos, no primeiro dia, devem ser colocados em ambiente sem luz para evitar o escurecimento e a oxidação dos meristemas. A proliferação do material de banana ocorre com este meio acrescido de 2,5 mg . L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e do de abacaxi, com o meio suplementado de 0,5 mg de BAP . L⁻¹ + 0,5 mg de ácido naftalenoacético (ANA) . L⁻¹. Nessa fase, os meristemas são inicialmente seccionados na posição longitudinal e, posteriormente, passam por até seis subcultivos sucessivos. O enraizamento de plântulas dá-se com 30 dias no meio de adaptação, quando as bactérias diazotróficas podem ser inoculadas. Os aspectos relacionados à propagação *in vitro* de bananeiras foram apresentados por Souza et al. (1997), e de abacaxizeiros por Fitchet (1990).

TABELA 1. Composição do meio de cultura utilizado para a micropropagação de abacaxizeiros e bananeiras.

Ingredientes	Meio de cultura ¹		
	Adaptação	Proliferação ²	Enraizamento
	Concentração (mg . L ⁻¹)		
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650
KNO ₃	1900	1900	1900
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	440	440
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	370	370
KH ₂ HPO ₄	170	170	170
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
NaEDTA . 2H ₂ O	37,3	37,3	37,3
KI	0,83	0,83	0,83
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3	22,3	22,3
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Tiamina – HCl	0,1	0,1	0,1
Piridoxina – HCl	0,5	0,5	0,5
Ácido nicotínico	0,5	0,5	0,5
Glicina	2	2	2
Inositol	100	100	100
Sacarose	30000	30000	30000
Agar	-	7000	7000
Faixas de pH	5,7 a 5,9		

¹ Meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

² Meio de proliferação de bananeiras: acrescentar 2,5 mg/L de 6-benzil-aminopurina no meio MS e, na multiplicação de abacaxizeiros, 0,5 mg/L de ácido naftaleno-acético + 0,5 mg/L de 6-benzil-aminopurina.

3 INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM MUDAS MICROPROPAGADAS

As mudas de abacaxizeiros e bananeiras micropropagadas podem ser inoculadas na fase de enraizamento *in vitro* no laboratório ou na fase de adaptação na casa de vegetação. A seguir são apresentadas as etapas que envolvem o preparo e a inoculação das bactérias diazotróficas, sob condições assépticas no laboratório.

- 1) Escolher estirpes eficientes na promoção do crescimento das plantas.
- 2) Ativar as estirpes selecionadas em meio semi-sólido e semi-específico (Tabela 2), incubando-as durante dois a três dias à temperatura de 30 °C.
- 3) Riscar as culturas, crescidas na forma de películas subsuperficiais no meio semi-sólido, sobre o meio sólido rico (Tabela 3), em placas.
- 4) Incubar as placas durante dois dias a 30 °C, para avaliar a morfologia das colônias e certificar-se das características morfológicas das estirpes selecionadas.
- 5) Repicar colônias isoladas de bactérias diazotróficas das placas para frascos contendo meio líquido Dygs modificado (Tabela 3) ou meio com sais de NFb, LGI ou JMV, acrescidos de 1 g . L⁻¹ de cloreto de amônio (Tabela 2), incubando-os durante um a dois dias a 30 °C sob agitação constante a \pm 100 rpm.
- 6) Medir a densidade ótica das culturas crescidas no meio líquido em espectrofotômetro a 550 - 600 nm de comprimento de onda, para uniformizar as populações de bactérias diazotróficas a serem inoculadas.
- 7) Transferir alíquotas (\pm 10⁸ células) da cultura bacteriana para frascos com capacidade para 80 a 100 mL (tampados com rolhas de algodão), contendo 5 a 10 mL da solução Hoagland sem nitrogênio (Tabela 4) autoclavada, ou a solução composta de ¼ da concentração dos sais de NFb (Tabela 3) esterilizada.
- 8) Transferir plântulas das fruteiras micropropagadas saudáveis e uniformes em tamanho e peso para os frascos com inóculos bacterianos.
- 9) Incubar durante cinco a sete dias os frascos com as mudas nas mesmas condições do cultivo de explantes no laboratório.

- 10) Proceder a transferência das mudas colonizadas pelas bactérias diazotróficas para sacos ou vasos de plástico, contendo um substrato desinfestado de solo e areia ou vermiculita na casa de vegetação ou telado.
- 11) Adequar os nutrientes e equilibrar a umidade do substrato para próximo da capacidade de campo, durante a fase de aclimação das mudas na casa de vegetação.

Na fase de pré-inoculação das mudas de abacaxizeiros e bananeiras (etapa 6), também pode ser utilizado um substrato agarizado (7 g/L) com 40 mL da solução Hoagland sem nitrogênio (Weber, 1998). Este procedimento de inoculação foi inicialmente desenvolvido para inocular bactérias diazotróficas em plantas de arroz (Baldani, 1996).

Por sua vez, a inoculação de mudas de abacaxizeiros e bananeiras micropropagadas durante sua fase de aclimação na casa de vegetação envolve as etapas apresentadas a seguir.

- 1) Seguir os procedimentos apresentados até a etapa 5.
- 2) Misturar a cultura líquida ou as populações de bactérias diazotróficas suspensas em solução contendo $\frac{1}{4}$ dos sais de NFb (Tabela 3) com turfa esterilizada. Esta última suspensão de bactérias pode ser obtida com uma centrifugação da cultura líquida durante 30 min ou mais a 5.000 rpm e o descarte do meio líquido.
- 3) Aplicar as amostras de turfa contendo as bactérias diazotróficas (10^8 células/planta) nos vasos, em camada subsuperficial do substrato desinfestado ou esterilizado.
- 4) Repicar mudas das fruteiras micropropagadas sadias e uniformes em tamanho e peso para pequenas covas nos vasos.
- 5) Adequar os nutrientes e equilibrar a umidade do substrato para próximo da capacidade de campo, durante a fase de aclimação das mudas na casa de vegetação.

A inoculação das mudas na casa de vegetação requer maior controle das condições do ambiente, uma vez que o estabelecimento de bactérias diazotróficas na rizosfera ou parte aérea das plantas tem influência direta de fatores bióticos, como a competição, a predação, o antagonismo e a planta hospedeira, e fatores abióticos, a exemplo de umidade, oxigênio, temperatura, pH, nutrientes inorgânicos e presença de altos níveis de nitrogênio no substrato.

TABELA 2. Composição de meios semi-sólidos e semi-específicos utilizados para o cultivo de bactérias diazotróficas associadas às plantas não leguminosas.

Ingredientes	Concentração	Meio de cultura ¹				
		NFb	JNFb	JMV	LGI	LGI-P
Sacarose	g . L ⁻¹	-	-	-	5	100
Malato	g . L ⁻¹	5	5	-	-	-
Manitol	g . L ⁻¹	-	-	5	-	-
K ₂ HPO ₄	mg . L ⁻¹	500	600	600	200	200
KH ₂ PO ₄	mg . L ⁻¹	-	1.800	1.800	600	600
MgSO ₄ . 7H ₂ O	mg . L ⁻¹	200	200	200	200	200
CaCl. 2H ₂ O	mg . L ⁻¹	20	20	20	20	20
NaCl	mg . L ⁻¹	100	100	100	-	-
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	mg . L ⁻¹	-	-	-	2	2
FeCl ₃ . 6H ₂ O	mg . L ⁻¹	-	-	-	10	10
Azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N de KOH)	mL . L ⁻¹	2	2	2	5	5
Solução de micronutrientes ²	mL . L ⁻¹	2	2	2	-	-
Solução de ferro ³	mL . L ⁻¹	4	4	4	-	-
KOH	g . L ⁻¹	4,5	4,5	-	-	-
Solução de vitaminas ⁴	mL . L ⁻¹	1	1	1	1	1
Agar	g . L ⁻¹	1,8	1,8	2,1	1,8	1,8
Faixa de pH ⁵	-	6,5	5,8	4,2 - 4,5	6,0 - 6,2	5,5

¹ Meios JMV (Baldani, 1996), NFb, JNFb, LGI e LGI-P (Döbereiner et al., 1995).

² Solução de micronutrientes: pesar 1.000 mg de Na₂MoO₄. 2H₂O + 1.175 mg de MnSO₄. H₂O + 1.400 mg de H₃BO₃ + 40 mg de CuSO₄. 5H₂O + 120 mg de ZnSO₄. 7H₂O e completar para 1.000 mL.

³ Solução de FeEDTA: pesar 1.210 mg de Na₂H₂EDTA + 600 mg de FeCl₃. 6H₂O e completar para 100 mL.

⁴ Solução de vitaminas: pesar 10 mg de biotina + 20 mg de piridoxina - HCl e completar para 100 mL.

⁵ Ajuste de pH: utilizar ácido acético (10%) para o meio LGI-P e soluções de KOH (10%) ou H₂SO₄ (5%) para os demais meios de cultura.

TABELA 3. Composição de meios ricos sólidos utilizados para o cultivo de bactérias diazotróficas isoladas de plantas não leguminosas.

Ingredientes	Meio de cultura			
	Concentração	Batata ¹	Dygs ²	King B ³
Batata	g . L ⁻¹	200	-	-
Peptona bacteriológica	mg . L ⁻¹	-	1.500	10.000
Glucose	mg . L ⁻¹	-	2.000	-
Glicerina	mg . L ⁻¹	-	-	10
Sacarose	mg . L ⁻¹	2.500	-	-
Ácido málico	mg . L ⁻¹	2.500	2.000	-
Extrato de levedura	mg . L ⁻¹	-	2.000	-
Ácido glutâmico	mg . L ⁻¹	-	1.500	-
K ₂ HPO ₄	mg . L ⁻¹	-	500	1.500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	mg . L ⁻¹	-	500	1.500
Solução de micronutrientes ⁴	mL . L ⁻¹	2	-	-
Solução de vitaminas ⁵	mL . L ⁻¹	1	-	-
Agar	g . L ⁻¹	15	15	15
Faixa de pH	-	6,5 a 7,0	6,0 a 6,5	6,8 a 7,0

¹ Meio batata: pesar a batata inglesa, lavar e ferver durante 30 min. Em seguida, filtrar em funil com algodão. Misturar as quantidades de sais em 50 mL, ajustando com KOH o pH para 6,5 a 7,0. Misturar o filtrado, as soluções e o agar e completar para 1.000 mL (Döbereiner et al., 1995).

² Meio Dygs modificado (Rodrigues Neto et al., 1986).

³ Meio B de King et al. (1954) modificado.

⁴ Solução de micronutrientes: pesar 1.000 mg de Na₂MoO₄·2H₂O + 1.175 mg de MnSO₄·H₂O + 1.400 mg de H₃BO₃ + 40 mg de CuSO₄·5H₂O + 120 mg de ZnSO₄·7H₂O e completar para 1.000 mL.

⁵ Solução de vitaminas: pesar 10 mg de biotina + 20 mg de piridoxina - HCl e completar para 100 mL.

TABELA 4. Composição de solução nutritiva¹ utilizada para a nutrição de plantas colonizadas pelas bactérias diazotróficas.

Ingredientes	Concentração
KH_2PO_4	136 mg . L ⁻¹
K_2HPO_4	174 mg . L ⁻¹
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	172 mg . L ⁻¹
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250 mg . L ⁻¹
Micronutrientes ²	1 mL . L ⁻¹
Solução de ferro ³	1 mL . L ⁻¹
Faixa de pH	6,0 - 6,2

¹ Solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950), sem nitrogênio.

² Solução de micronutrientes: pesar 2,86 mg de H_3BO_3 + 1,81 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 0,22 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,08 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0,02 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e completar para 1.000 mL.

³ Solução de ferro: pesar 1.210 mg de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ + 600 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e completar com água destilada para 100 mL.

4 MONITORAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NO AMBIENTE

Nos trabalhos de inoculação das plantas com bactérias diazotróficas há necessidade de discriminar as bactérias introduzidas para se conhecer a sua dispersão e a sua função, bem como identificar as mudanças provocadas sobre as amostras inoculadas. As espécies de bactérias podem ser diferenciadas com base na morfologia das células e na fisiologia de crescimento em meios semi-sólidos e semi-específicos (Döbereiner et al., 1995), meio com sais de JNFb (Tabela 3), acrescido de diferentes fontes de carbono (Weber,

1998). Os aspectos fisiológicos, ecológicos, genéticos, moleculares e de ultra-estrutura das interações de bactérias diazotróficas com as plantas constituem-se num requisito básico para a manipulação dessas associações.

O uso de sondas oligonucleotídicas direcionadas para acoplamento em regiões definidas nas subunidades 16S ou 23S de rRNA também tem sido enfatizado na identificação das espécies de bactérias diazotróficas associadas às plantas. As sondas podem ser marcadas com corantes fluorescentes, o que permite a detecção *in vivo* das bactérias nas amostras (Manz et al., 1992; Hartmann et al., 1995), o estabelecimento das relações entre grupos e espécies (Amann et al., 1995), bem como a identificação das espécies de bactérias diazotróficas (Kirchhof et al., 1997 a e b; Weber, 1998).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As bactérias diazotróficas têm amplo espectro de ocorrência, sendo detectadas também em culturas não leguminosas e não gramíneas. Em associação com fruteiras como bananeiras e abacaxizeiros têm sido identificadas espécies de *Azospirillum*, bactérias do tipo *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Contudo, estirpes dos últimos gêneros de bactérias diferem na promoção do crescimento de mudas micropropagadas. Isso sugere que as bactérias devem passar por um processo seletivo antes da sua aplicação nas fruteiras. No presente trabalho são apresentadas técnicas de inoculação de bactérias diazotróficas em mudas de abacaxizeiros e bananeiras micropropagadas, e discutidas as formas de monitoramento delas no ambiente. Neste contexto, a aplicação prática das bactérias promotoras de crescimento pode ser aliada à preservação dos sistemas de cultivo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, p.143-169, 1995.
- BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** Seropédica: UFRRJ, 1996. 238p. Tese de Doutorado.

- BALOTA, E.L. **Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crants).** Itaguaí: UFRRJ, 1994. 281p. Tese de Doutorado.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.36, p.591-608, 1990.
- BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; CARUSI, M.V.; DEL-GALLO, M.; VISCA, P. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. **Microbiology**, New York, v.140, p.1069-1077, 1994.
- BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid in-situ assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied of Environmental of Microbiology**, Washington, v.57, p.535-538, 1991.
- 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. 60p.
- FAYEZ, D.; DAW, Z.Y. Effect of inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense* on cotton (*Gossipum barbadense*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.4, p.91-95, 1987.
- FERREIRA, A.C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A.R.V.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis, RJ. **Abstracts...** Angra dos Reis: Embrapa – CNPAB / UFRRJ / The Brazilian Academy of Sciences, 1995. p.210.
- FITCHET, M. Clonal propagation of Queen and Smooth cayenne pineapples. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.275, p.261-266, 1990.
- GHAI, S.K.; THOMAS, G.V. Occurrence of *Azospirillum* spp. in coconut-based farming systems. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.114, p.235-241, 1989.
- HARTMANN, A.; BALDANI, J.I.; KIRRHOF, G.; ASMUS, B.; HUTZLER, P.; SPRINGER, N.; LUDWIG, W.; BALDANI, V.L.; DÖBEREINER, J. Taxonomic and ecological studies of diazotrophic rhizosphere bacteria phylogenetic probes. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M.de (Ed). ***Azospirillum* VI and related microorganisms:**

- genetic, physiology and ecology.** New York: Springer-Verlag, 1995. p.416-427. (NATO Serie G. Ecological Sciences, v.37).
- HILL, W.A.; BACON-HILL, P.; CROSSMAN, S.M.; STEVENS, C. Characterization of N₂-fixing bacteria associated with sweet potato roots. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.860-862, 1983.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.T. **The water culture method for growing plants without soil.** Berkely: California Agriculture Experiment Station, 1950. 32p. (University of California. Circular 347).
- JIMÉNEZ-SALGADO, T.; FURNTESS-RAMIREZ, L.E.; TAPIA-HERNANDES, A.; MASCARÚA-ESPERZA, M.A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, O. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of the nitrogen-fixing-acetobacteria. **Applied of Environmental of Microbiology**, Washington, v.63, p.3676-3683, 1998.
- KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Sant Louis, v.44, p.301-307, 1954.
- 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, 1997a.
- KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, Berlin, v.29, p.853-862, 1997b.
- KIRSCHTEIN, J.D.; PAERL, H.W.; ZEHR, J. Amplification, cloning, and sequencing of a nifH segment from aquatic microorganisms and natural communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.2645-2650, 1991.
- MALIK, K.A.; BILAL, R.; MEHNAZ, S.; RASUL, G.; MIRSA, M.S.; ALI, M.S. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.194, p.37-44, 1997.
- MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; WAGNER, M. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. **Systematic Applied Microbiology**, New York, v.15, p.593-600, 1992.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- OKON, Y.; LANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.26, p.1591-1601, 1994.
- PAULA, M.A. **Interação micorrizas vesículo-arbusculares - bactérias diazotróficas em batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.** Itaguaí: UFRRJ, 1992. 168p. Tese de Doutorado.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA Jr., V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Tipo B. **Summa Phytopatológica**, São Paulo, v12, p.16, 1986.
- SOUZA, A.S.; DANTAS, J.L.L.; SOUZA, F.V.D.; CORDEIRO, Z.J.M.; SILVA NETO, S.P.S. Propagação. In: ALVES, E.J. (Ed.) **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: Embrapa - SPI/ Cruz das Almas: Embrapa – CNPMF, 1997. p.151-195.
- SUBBA RAO, N.S. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.863-866, 1983.
- WEBER, O.B. **Ocorrência e caracterização de bactérias diazotróficas em bananeiras (*Musa* spp.) e abacaxizeiros (*Ananas comosus* (L.) Merrill) e seus efeitos no crescimento de mudas micropropagadas**. Seropédica: UFRRJ, 1998. 192p. Tese de Doutorado.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270 Pici 60511-110 Fortaleza - Ceará
Telefone (0--85) 299.1800 Fax (085) 299.1833
www.cnpat.embrapa.br



**MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E DO
ABASTECIMENTO**

