

Crescimento de girassol em função da inoculação de sementes com bactérias endofíticas¹

Juliana Fernandes dos Santos², Bárbara Lima do Sacramento²,
Katia Nubia Azevedo Barros Mota², Jorge Teodoro de Souza², André Dias de Azevedo Neto³

ABSTRACT

Sunflower growth according to seed inoculation with endophytic bacteria

The sunflower crop has a great importance worldwide, due to the oil of excellent quality extracted from its seeds and *in natura* grains that are consumed in various ways. However, drought is one of the main environmental factors that limit its yield. An experiment was carried out under controlled greenhouse conditions, in a completely randomized experimental design, in order to determine the effect of endophytic bacteria inoculation (*Bacillus* sp. and *Enterobacter cloacae*) on the growth and contents of nutrients and organic solutes, in sunflower leaves and roots under water deficit. Plant height, stem diameter, fresh and dry biomass of shoot and roots, as well as contents of N, P, K, soluble carbohydrates, free proline, free amino acids and soluble proteins, were determined at 35 days after the plant emergence. The water deficit reduced plant growth regardless inoculation. However, under optimum conditions of soil moisture, the combination of both endophytic bacteria increased the sunflower growth. The water deficit also increased the N and K contents in leaves, as well as the organic solutes content in shoots, especially in inoculated plants. These results suggest that the inoculation of endophytic bacteria may increase the capacity of drought stressed plants to perform the osmotic adjustment through a higher accumulation of organic solutes, when compared to plants not inoculated.

KEY-WORDS: *Helianthus annuus* L.; *Bacillus* sp.; *Enterobacter cloacae*; mineral nutrition; water deficit.

INTRODUÇÃO

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é cultivado em várias partes do mundo, atingindo, em 2012, a produção mundial de 37 milhões de toneladas, em área de, aproximadamente, 25 milhões de hectares (Factfish 2013).

RESUMO

O girassol é uma cultura de grande importância mundial, devido ao óleo de excelente qualidade que se extrai de suas sementes e aos grãos *in natura* que são consumidos de diversas formas. No entanto, a seca é um dos principais fatores ambientais que limitam sua produtividade. Conduziu-se um experimento em condições controladas de casa-de-vegetação, em delineamento experimental inteiramente casualizado, para determinar o efeito da inoculação de bactérias endofíticas (*Bacillus* sp. e *Enterobacter cloacae*) sobre o crescimento e teores de nutrientes e de solutos orgânicos, em folhas e raízes de girassol sob déficit hídrico. Aos 35 dias após a emergência, foram avaliados a altura, diâmetro do caule e biomassas fresca e seca da parte aérea e das raízes, bem como os teores de N, P, K, carboidratos solúveis, prolina livre, aminoácidos livres e proteínas solúveis. O déficit hídrico reduziu o crescimento do girassol, independentemente de inoculação. Entretanto, em condições ideais de umidade do solo, a combinação de ambas as bactérias endofíticas incrementou o crescimento do girassol. O déficit hídrico também aumentou os teores de N e K, nas folhas, bem como o teor de solutos orgânicos, na parte aérea, sendo este aumento mais pronunciado nas plantas inoculadas. Os dados sugerem que a inoculação de bactérias endofíticas pode aumentar a capacidade de as plantas sob estresse hídrico realizarem o ajustamento osmótico pelo maior acúmulo de solutos orgânicos, quando comparadas com as plantas não inoculadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Helianthus annuus* L.; *Bacillus* sp.; *Enterobacter cloacae*; nutrição mineral; déficit hídrico.

A importância da cultura do girassol, no mundo, deve-se ao óleo de excelente qualidade que se extrai de suas sementes e aos grãos *in natura* que são consumidos na alimentação humana, de diversas formas. Além disto, o girassol pode ser utilizado para outras finalidades, como a produção de flores ornamentais, farelo para a alimentação de animais, forragem e si-

1. Trabalho recebido em maio/2013 e aceito para publicação em maio/2014 (nº registro: PAT 24430).

2. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mails: agr.fernandes1@hotmail.com, barbara.lima_@hotmail.com, azevedoknbnm@yahoo.com.br, jgeteodoro@gmail.com.

3. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mail: andre@ufrb.edu.br.

lagem, bem como matéria-prima para a produção de biodiesel (Dickman et al. 2005, USDA 2012).

O Brasil apresenta grande potencial para a produção de girassol, no entanto, o País não se destaca entre os grandes produtores, participando com apenas 0,3% da produção mundial (Lazzarotto et al. 2005, USDA 2012, Factfish 2013).

O déficit hídrico é o principal fator que contribui para a baixa produtividade do girassol, em solos agricultáveis, pois, de acordo com Castro & Oliveira (2005), esta planta apresenta baixa eficiência no uso da água. Este fato constitui-se na maior causa de variabilidade dos rendimentos de grãos, de um ano para outro (Leite et al. 2005).

A deficiência hídrica limita a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, reduz a germinação das sementes, abertura dos estômatos, atividade fotossintética, transpiração, atividade enzimática e vários outros processos fisiológicos e metabólicos, reduzindo o rendimento e/ou a qualidade do produto (Castro & Oliveira 2005, Seyed et al. 2012). No entanto, as plantas têm desenvolvido, evolutivamente, mecanismos adaptativos complexos, muitos destes somente possíveis graças às interações com micro-organismos benéficos.

Bactérias que promovem o crescimento de plantas estão associadas com a maioria das espécies vegetais, sendo capazes de estabelecer populações endofíticas nos diferentes tecidos e órgãos das plantas, sem causar qualquer sintoma visível de sua presença (Gray & Smith 2005, Hayat et al. 2010).

Quando o estímulo ao crescimento das plantas é direto, o micro-organismo produz fitormônios, ou substâncias análogas, capazes de estimular o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Bandara et al. 2006, Guo et al. 2008, Pérez-García et al. 2011). Quando o estímulo é indireto, o crescimento pode ser induzido pela melhoria da disponibilização e absorção de nutrientes minerais e água (Pérez-García et al. 2011, Zhang et al. 2011). Adicionalmente, o crescimento também pode ser beneficiado pelo controle biológico de fitopatógenos (Aravind et al. 2010, Melnick et al. 2008).

Por suas aplicações práticas, as bactérias promotoras de crescimento de plantas são, frequentemente, aplicadas pela inoculação em sementes (Mastretta et al. 2009). Assim sendo, micro-organismos benéficos podem melhorar o desempenho de plantas sob condições de estresse e, conseqüentemente, aumentar a produtividade das culturas.

O presente estudo avaliou dois isolados de bactérias endofíticas, como agentes de promoção de crescimento em plantas de girassol sob déficit hídrico, visando a identificar efeito promotor de crescimento e, eventualmente, melhorar a performance desta cultura sob restrição hídrica.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre abril e maio de 2012, no município de Cruz das Almas (BA) (12°40'39"S, 39°06'23"W e 226 m de altitude), em casa-de-vegetação.

Foi utilizada uma amostra da camada 0-20 cm, de um Latossolo Amarelo de textura argilosa, com as seguintes características químicas (Silva 1999): pH (H₂O) = 6,2; P = 10 mg dm⁻³; K⁺ = 0,14 cmol_c dm⁻³; Ca²⁺ = 2,8 cmol_c dm⁻³; Mg²⁺ = 1,7 cmol_c dm⁻³; H⁺ + Al³⁺ = 1,32 cmol_c dm⁻³; e matéria orgânica = 7,35 g kg⁻¹.

A capacidade de pote (CP) foi adotada como o conteúdo de água retida pela amostra de terra, após sofrer saturação e conseqüente ação da gravidade, até o cessamento da drenagem (Souza et al. 2000).

Foram testados dois isolados de bactérias endofíticas (*Bacillus* sp. e *Enterobacter cloacae*), isolados de cacauzeiros e pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Genética Microbiana (LabGem) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Ensaios preliminares demonstraram o potencial destes isolados de bactérias como agentes de promoção de crescimento, em algumas espécies vegetais (Leite et al. 2013).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x4 (umidade do solo x inoculação), com seis repetições.

Os tratamentos utilizados foram: 1) Plantas a 100% CP não inoculadas; 2) Plantas a 100% CP inoculadas com *Bacillus* sp.; 3) Plantas a 100% CP inoculadas com *E. cloacae*; 4) Plantas a 100% CP inoculadas com *Bacillus* sp. + *E. cloacae*; 5) Plantas a 30% CP não inoculadas; 6) Plantas a 30% CP inoculadas com *Bacillus* sp.; 7) Plantas a 30% CP inoculadas com *E. cloacae*; 8) Plantas a 30% CP inoculadas com *Bacillus* sp. + *E. cloacae*.

As bactérias foram multiplicadas em placas de Petri contendo meio de cultura Luria-Bertani (LB) solidificado e mantidas em câmara de crescimento tipo B.O.D, a 25°C, por 24 horas. Colônias de bactérias foram transferidas para o meio de cultura LB líquido

e incubadas por 24 horas, a 25°C, em agitador orbital, a 120 rpm. Após este período, 2,0 mL da suspensão foram centrifugados a $10.000 \times g$, por 3,5 minutos. O precipitado foi ressuspensão em solução salina (NaCl 0,85%). As concentrações das suspensões de células bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro, para obtenção de 10^5 UFC mL⁻¹ de *Bacillus* sp. ou *E. cloacae*.

Sementes do híbrido triplo de girassol Olisun 3 foram desinfestadas superficialmente, por meio de lavagem com detergente líquido neutro, seguida de imersão em etanol a 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1% por 2 minutos e água destilada estéril, por três vezes consecutivas.

As sementes de girassol foram inoculadas, por seis horas, com suspensão de *Bacillus* sp. e *E. cloacae*, ou uma combinação de igual concentração de ambas as bactérias. Sementes embebidas, por seis horas, em solução salina constituíram o tratamento testemunha. Em seguida, as sementes foram semeadas em vasos contendo 3,75 kg de solo a 100% CP. Dez dias após a emergência, a irrigação dos vasos dos tratamentos sob déficit hídrico foi suspensa, até a umidade do solo atingir 30% CP. A água perdida por evapotranspiração foi repostada diariamente, por meio da pesagem dos vasos.

Aos 35 dias após a emergência, foram determinados a altura das plantas, diâmetro de caule (DC) e as massas frescas da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFR). Amostras de folhas e raízes foram coletadas, congeladas, liofilizadas em nitrogênio líquido e utilizadas para análises bioquímicas. As massas secas da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR) foram determinadas após secagem do material vegetal em estufa de aeração forçada, a 65°C, por 72 horas.

Para preparo do extrato, foi pesado cerca de 0,1 g de tecido vegetal seco e triturado em moinho. Procedeu-se, em seguida, à digestão ácida das amostras, sendo utilizada uma mistura de ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogênio a 30% (Jones Junior 2001). Em seguida, o digerido foi diluído para 100 mL, com água desionizada, para as posteriores determinações espectrofotométricas de nitrogênio (Faithfull 2002) e de fósforo (Weatherburn 1967) e determinação fotométrica de potássio.

O extrato bruto foi obtido conforme descrito por Azevedo Neto et al. (2010). Foi macerado cerca de 1,0 g de tecidos liofilizados de folhas e raízes com 5,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo EDTA 0,1 mM. O homogeneizado foi

filtrado em musselina e centrifugado a $12.000 \times g$, por 15 minutos. O sobrenadante foi armazenado em ultrafreezer (-80°C) e utilizado para as determinações de carboidratos solúveis, prolina livre, aminoácidos livres e proteínas solúveis.

Os carboidratos solúveis foram determinados colorimetricamente a 430 nm, em uma alíquota de 0,5 mL do extrato, pelo método fenol-ácido sulfúrico, utilizando-se D-(+)-glicose como padrão (Dubois et al. 1956); a prolina livre colorimetricamente a 520 nm, em uma alíquota de 1,0 mL do extrato, utilizando-se ninhidrina como reagente específico e prolina como padrão (Bates et al. 1973); os aminoácidos livres totais colorimetricamente pelo método da ninhidrina (570 nm), em uma alíquota de 0,5 mL do extrato, utilizando-se L-leucina como padrão (Yemm & Cocking 1955); e as proteínas solúveis colorimetricamente (595 nm) pelo método de ligação ao corante, em uma alíquota de 0,1 mL do extrato, utilizando-se albumina de soro bovina como padrão (Bradford 1976).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5%, utilizando-se o *software* estatístico Statistical Analysis System (SAS Institute 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O déficit hídrico a 30% CP reduziu, significativamente, a MFPA, MSPA, MFR e a altura das plantas de girassol, em relação ao controle com 100% CP, independentemente de terem sido ou não inoculadas (Figura 1). As plantas cultivadas em 100% CP e inoculadas com ambas as bactérias apresentaram aumento da MFPA (31%), MSPA (33%), MFR (85%), MSR (450%) e DC (29%), quando comparadas com as não inoculadas. Não foram observadas diferenças substanciais no crescimento das plantas, quando inoculadas com as bactérias isoladamente.

Possivelmente, durante o déficit hídrico, como mecanismo para evitar a perda de água, ocorreu o fechamento dos estômatos, reduzindo a fotossíntese e, conseqüentemente, a produção de fotoassimilados, resultando em menor desenvolvimento vegetativo.

Souza et al. (2001), trabalhando com mudas de videira, relataram que uma das primeiras respostas das plantas ao déficit hídrico é o fechamento estomático, que causa a diminuição da difusão de CO₂ para o mesófilo foliar, reduzindo a fotossíntese. Além disto, ocorre a redução do potencial hídrico

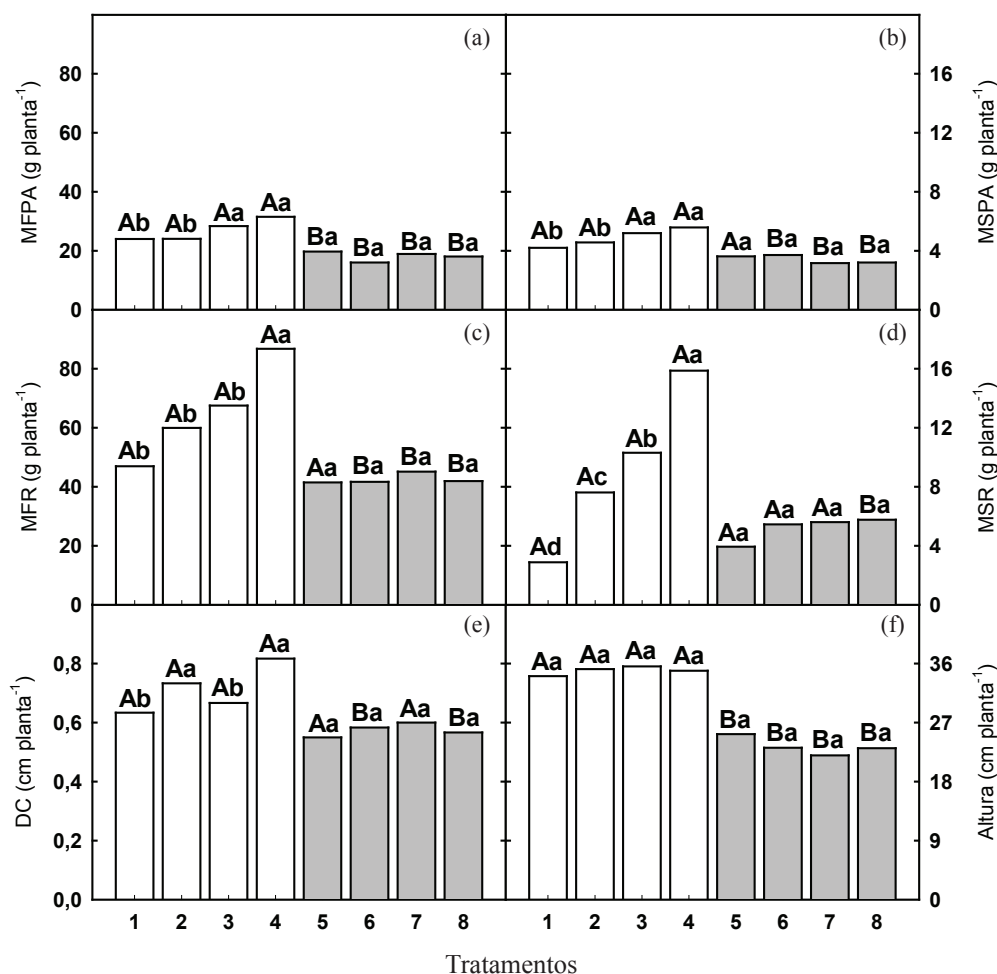


Figura 1. Massa fresca da parte aérea (a), massa seca da parte aérea (b), massa fresca das raízes (c), massa seca das raízes (d), diâmetro do caule (e) e altura (f) de plantas de girassol cultivadas por 35 dias, em casa-de-vegetação, com e sem restrição hídrica (Cruz das Almas, BA, 2012). Tratamentos: 1) Plantas não inoculadas a 100% da capacidade de pote (CP); 2) Plantas inoculadas com *Bacillus* sp. a 100% CP; 3) Plantas inoculadas com *E. cloacae* a 100% CP; 4) Plantas inoculadas com *Bacillus* sp. + *E. cloacae* a 100% CP; 5) Plantas não inoculadas a 30% CP; 6) Plantas inoculadas com *Bacillus* sp. a 30% CP; 7) Plantas inoculadas com *E. cloacae* a 30% CP; 8) Plantas inoculadas com *Bacillus* sp. + *E. cloacae* a 30% CP. Médias seguidas da mesma letra maiúscula (entre níveis de umidade no solo, em cada tratamento de inoculação) e mesma letra minúscula (entre tratamentos de inoculação, em cada nível de umidade no solo) não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5%.

das folhas, afetando o crescimento e produtividade da planta. Paiva Sobrinho et al. (2011) concluíram que a menor disponibilidade de água no solo reduziu, significativamente, a massa seca da parte aérea de duas cultivares de girassol. Paixão (2012), testando 27 genótipos de girassol, quanto à tolerância ao estresse hídrico, observou que a biomassa seca total das plantas foi afetada negativamente pelo estresse hídrico, sendo apenas dois genótipos considerados tolerantes, por apresentarem redução na massa seca total inferior a 35%.

Diversos autores relatam que as bactérias promotoras de crescimento de plantas colonizam

diferentes órgãos e exercem efeitos benéficos sobre as mesmas, promovendo aumentos na taxa de germinação de sementes, no desenvolvimento de órgãos, na produção de flores e no rendimento das culturas, tanto em casa-de-vegetação como no campo. Assis et al. (2005) concluíram que a combinação de isolados bacterianos em helicônias promoveu aumentos significativos em todas as variáveis de crescimento analisadas. Silveira et al. (2004) observaram aumentos significativos no crescimento de plantas de pepino inoculadas com os isolados *Bacillus amyloliquefaciens* e *Enterobacter cloacae*. Hanada & Romeiro (1998) relataram que,

de um total de 88 rizobactérias nativas presentes na rizosfera de girassol, apenas uma foi capaz de promover o crescimento desta planta. Goes (2012) avaliou a diversidade genética de micro-organismos associados ao girassol e encontrou bactérias com potencial para promover o crescimento das plantas em diversos tecidos do vegetal, bem como na rizosfera. Entretanto, em condições de estresses ambientais, a relação entre bactérias promotoras de crescimento de plantas e o girassol ainda não foi bem estudada.

Embora os dados deste trabalho mostrem que a microbiolização com *Bacillus* sp. e *E. cloacae* não aumenta a tolerância ao déficit hídrico, em girassol, eles permitem concluir que, em condições normais de umidade do solo, a combinação destas bactérias endofíticas aumenta o crescimento das plantas, sugerindo maior potencial de produção.

As plantas inoculadas e cultivadas a 100% CP (tratamentos 2, 3 e 4) apresentaram redução média de 42%, 49% e 60%, respectivamente, nos teores de N, P e K nas raízes (Figuras 2a, 2c e 2e). Nas folhas,

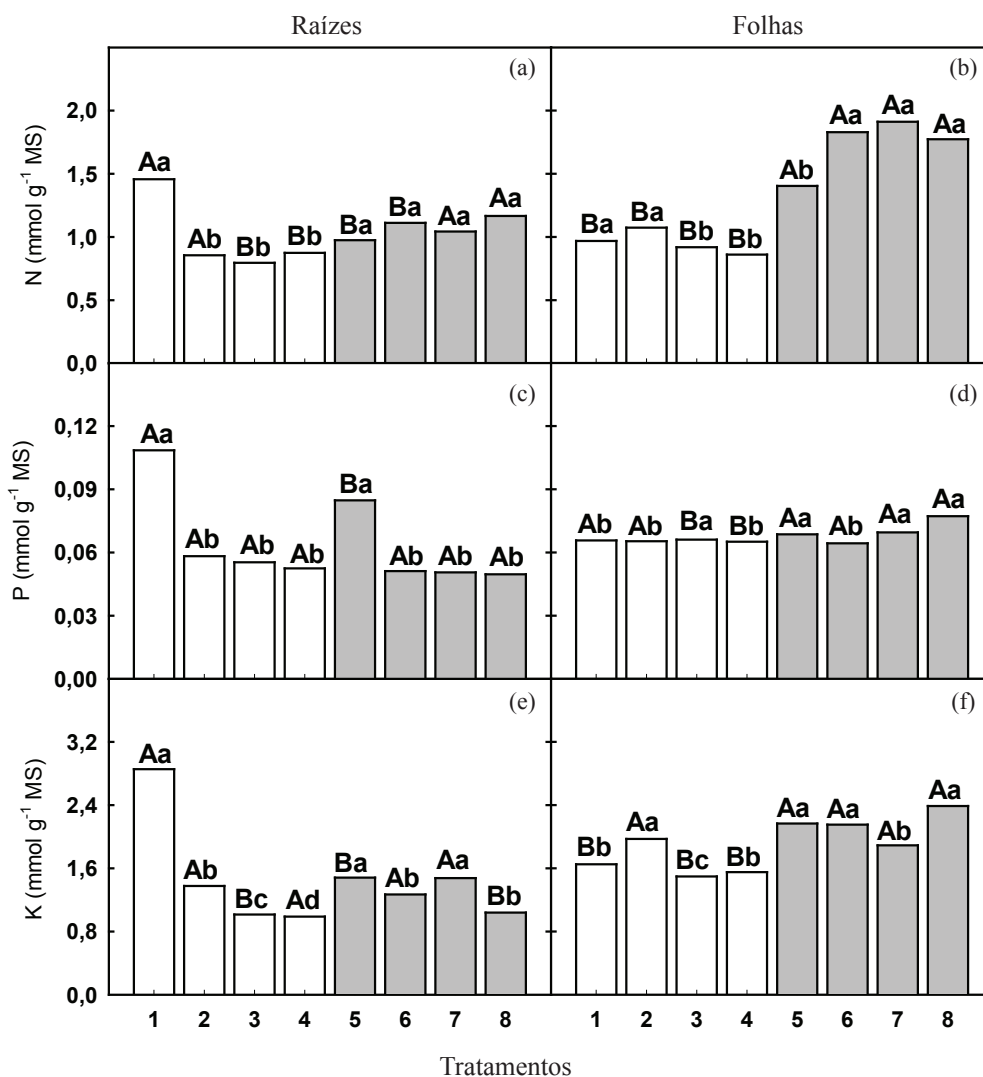


Figura 2. Teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), em raízes (a, c, e, g) e folhas (b, d, f, h) de plantas de girassol cultivadas por 35 dias, em casa-de-vegetação (Cruz das Almas, BA, 2012). Tratamentos: 1) Plantas não inoculadas a 100% da capacidade de pote (CP); 2) Plantas inoculadas com *Bacillus* sp. a 100% CP; 3) Plantas inoculadas com *E. cloacae* a 100% CP; 4) Plantas inoculadas com *Bacillus* sp. + *E. cloacae* a 100% CP; 5) Plantas não inoculadas a 30% CP; 6) Plantas inoculadas com *Bacillus* sp. a 30% CP; 7) Plantas inoculadas com *E. cloacae* a 30% CP; 8) Plantas inoculadas com *Bacillus* sp. + *E. cloacae* a 30% CP. Médias seguidas da mesma letra maiúscula (entre níveis de umidade no solo, em cada tratamento de inoculação) e mesma letra minúscula (entre tratamentos de inoculação, em cada nível de umidade no solo) não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5%.

não foram observadas diferenças significativas entre os teores de N, P e K destes tratamentos, em relação ao controle (Figuras 2b, 2d e 2f).

Nas plantas cultivadas a 30% CP, observou-se redução nos teores de N, P e K nas raízes e aumento nos teores de N e K nas folhas, independentemente de estarem ou não inoculadas. Entretanto, nas plantas sob estresse hídrico e inoculadas (tratamentos 6, 7 e 8), observou-se aumento nos teores de N nas folhas (Figura 2b) e redução nos teores de P nas raízes (Figura 2c), quando comparadas com as plantas sob estresse hídrico e não inoculadas (tratamento 5).

De acordo com Dey et al. (2004), as interações entre os micro-organismos e os vegetais têm grande importância na transformação, mobilização e solubilização de nutrientes do solo, possibilitando aumento da absorção pelos vegetais. Assim, a manutenção dos teores de N, P e K nas folhas e a redução nas raízes das plantas inoculadas e cultivadas a 100% CP sugerem um efeito de diluição, associado a um aumento da translocação para as folhas, haja vista a maior demanda destes nutrientes na parte aérea, decorrente do maior crescimento das plantas (Dimkpa et al. 2009).

Faye et al. (2006) indicam que o suprimento adequado de água ao solo é necessário para que ocorra disponibilização e absorção de nutrientes pelas plantas. Como o íon fosfato se movimenta principalmente por difusão e o nitrogênio e potássio por fluxo de massa, a falta de água no solo pode contribuir, substancialmente, para a diminuição na absorção destes nutrientes. Desta forma, é provável que a redução da absorção induzida pela deficiência hídrica tenha sido responsável pela redução nas concentrações dos nutrientes nas raízes das plantas sob restrição hídrica, semelhantemente ao descrito por Sardans & Peñuela (2004). Por outro lado, o aumento dos teores de N e K nas folhas destas plantas pode ter resultado de um efeito de concentração destes nutrientes, em decorrência da redução no crescimento, conforme sugerido por Paixão (2012).

Os teores de carboidratos solúveis, aminoácidos livres, prolina e proteínas solúveis diminuíram, em média, 58%, 69%, 72% e 44%, respectivamente, nas raízes das plantas inoculadas e cultivadas a 100% CP (Figura 3). Nas folhas, observou-se redução média de 33% nos teores de proteínas solúveis, nas plantas destes tratamentos. Alterações substanciais não foram observadas nos teores dos demais solutos orgânicos, nas folhas das plantas inoculadas e cultivadas a 100% CP.

O déficit hídrico de 30% CP reduziu, significativamente, os teores de carboidratos solúveis (31%), aminoácidos livres (44%), prolina (39%) e proteínas solúveis (64%) nas raízes, mas aumentou os de aminoácidos livres (64%), prolina (84%) e proteínas solúveis (60%), nas folhas das plantas não inoculadas (Figura 3). A ocorrência de distúrbios induzidos pela seca pode ter afetado a translocação de solutos orgânicos das folhas para as raízes, nas plantas sob estresse hídrico, resultando no acúmulo destes solutos na parte aérea, semelhantemente ao verificado por Azevedo Neto et al. (2010), em plantas de amendoim.

Comparando-se os dados de solutos orgânicos, nas plantas de todos os tratamentos a 30% CP, observou-se que, em geral, os teores de solutos orgânicos nas folhas e raízes das plantas inoculadas foram mais elevados do que nas plantas sob estresse hídrico e sem microbiolização. O acúmulo intracelular de solutos orgânicos osmoticamente ativos, em resposta às condições de baixa disponibilidade de água, é um importante mecanismo desenvolvido pelas plantas que apresentam tolerância à seca (Chaves Filho & Stacciarini-Seraphin 2001). Entre estes solutos, os carboidratos solúveis e os aminoácidos livres são considerados os principais grupos de compostos envolvidos no ajustamento osmótico (Lacerda et al. 2001, Azevedo Neto et al. 2004). Este mecanismo pode auxiliar a planta a manter a turgescência, tornando possível a manutenção da absorção de água e da pressão de turgescência da célula, o que pode contribuir para a manutenção de processos fisiológicos como a fotossíntese, alongamento e divisão celulares (Serraj & Sinclair 2002).

Dessa forma, os dados deste trabalho sugerem que a presença de bactérias endofíticas pode aumentar a capacidade de as plantas sob restrição hídrica realizarem o ajustamento osmótico pelo maior acúmulo de solutos orgânicos, quando comparadas com as plantas sob estresse hídrico e não inoculadas.

Sabe-se que plantas sob restrição hídrica podem acumular proteínas de baixa massa molecular, as quais poderiam ser usadas como fonte de armazenamento de nitrogênio para mobilização, após o estresse ser aliviado ou eliminado (Parida & Das 2005). Considerando-se que as concentrações de proteínas solúveis, aminoácidos livres e prolina aumentaram em todos os tratamentos sob déficit hídrico, os dados sugerem que o aumento do teor de proteínas

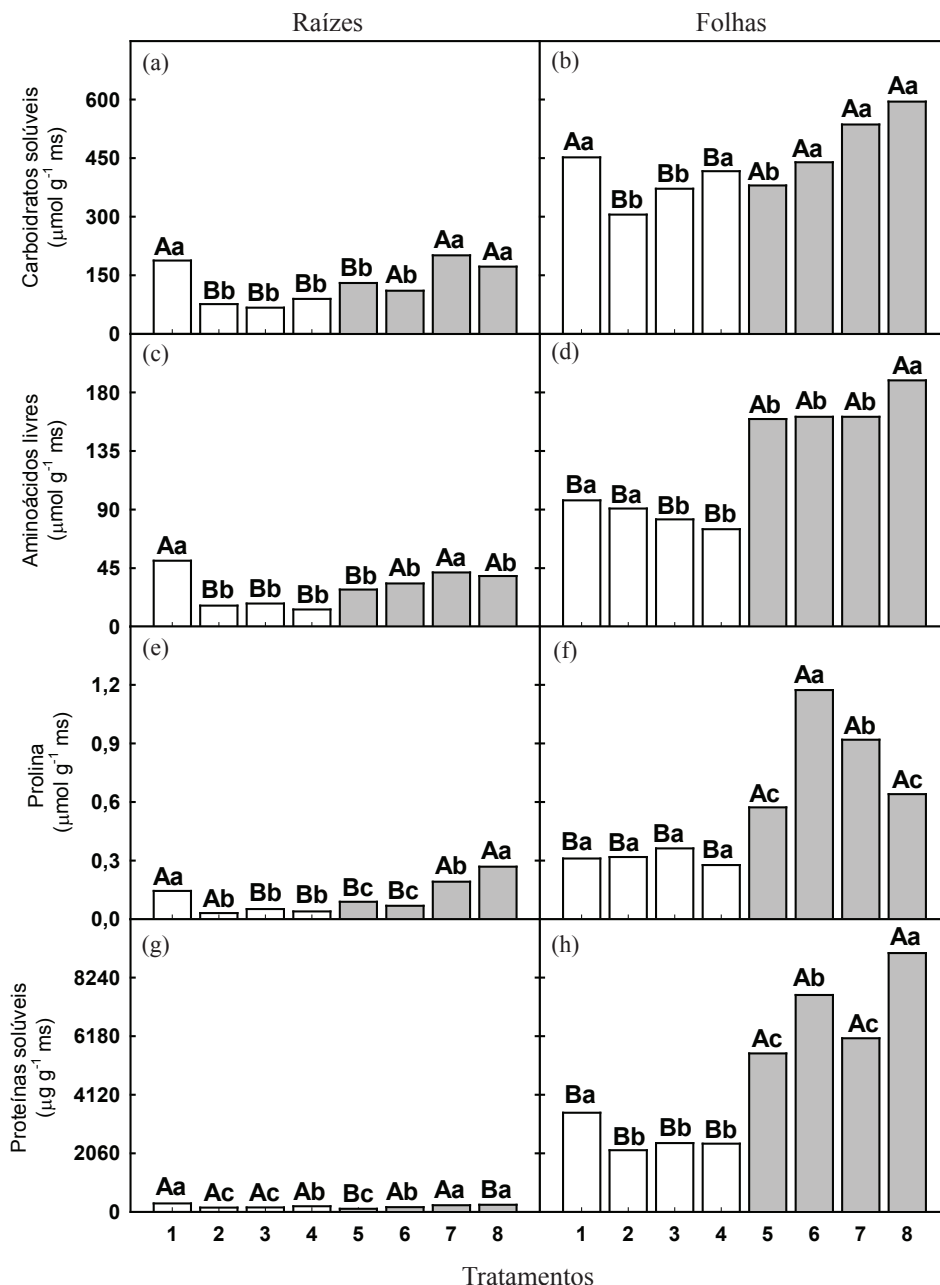


Figura 3. Teores de carboidratos solúveis, aminoácidos livres, prolina e proteínas solúveis, em raízes (a, c, e, g) e folhas (b, d, f, h) de plantas de girassol cultivadas por 35 dias, em casa-de-vegetação (Cruz das Almas, BA, 2012). Tratamentos: 1) Plantas não inoculadas a 100% da capacidade de pote (CP); 2) Plantas inoculadas com *Bacillus* sp. a 100% CP; 3) Plantas inoculadas com *E. cloacae* a 100% CP; 4) Plantas inoculadas com *Bacillus* sp. + *E. cloacae* a 100% CP; 5) Plantas não inoculadas a 30% CP; 6) Plantas inoculadas com *Bacillus* sp. a 30% CP; 7) Plantas inoculadas com *E. cloacae* a 30% CP; 8) Plantas inoculadas com *Bacillus* sp. + *E. cloacae* a 30% CP. Médias seguidas da mesma letra maiúscula (entre níveis de umidade no solo, em cada tratamento de inoculação) e mesma letra minúscula (entre tratamentos de inoculação, em cada nível de umidade no solo) não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5%.

solúveis induzidas pelo estresse resultou do aumento no conteúdo de aminoácidos. Adicionalmente, também sugerem que o aumento na síntese *de novo* e/ou inibição da degradação de aminoácidos foram os

mecanismos que propiciaram o acúmulo de aminoácidos, incluindo a prolina. Resultados semelhantes também foram reportados por Azevedo Neto et al. (2010) e Paixão (2012).

CONCLUSÕES

1. A microbiolização com *Bacillus* sp. e *E. cloacae* não aumentou a tolerância ao déficit hídrico, mas, em condições normais de umidade do solo, a combinação destas bactérias endofíticas resultou no aumento do crescimento do girassol.
2. A presença de bactérias endofíticas aumentou a capacidade de as plantas sob estresse hídrico realizarem o ajustamento osmótico, pelo maior acúmulo de solutos orgânicos compatíveis.

REFERÊNCIAS

- ARAVIND et al. Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis* Thorne) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Crop Protection*, Guildford, v. 29, n. 4, p. 318-324, 2010.
- ASSIS, S. M. P. et al. Bacterial wilt of Heliconia in Pernambuco, Brazil: first report and detection by PCR in soil and rhizomes. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Orgs.). *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. St. Paul: APS Press, 2005. p. 423-430.
- AZEVEDO NETO, A. D. et al. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 16, n. 1, p. 31-38, 2004.
- AZEVEDO NETO, A. D. et al. Physiological and biochemical responses of peanut genotypes to water deficit. *Journal of Plant Interactions*, Abingdon, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2010.
- BANDARA, et al. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *Journal Biosciences*, Bangalore, v. 31, n. 5, p. 645-650, 2006.
- BATES, L. S. et al. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 205-207, 1973.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, Orlando, v. 72, n. 1-2, p. 246-254, 1976.
- CASTRO, C.; OLIVEIRA, F. A. Nutrição e adubação do girassol. In: LEITE, R. M. V. B. C. et al. (Eds.). *Girassol no Brasil*. Campinas: Embrapa Soja, 2005. p. 317-365.
- CHAVES FILHO, J. T.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) em resposta ao estresse hídrico. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 199-204, 2001.
- DEY, R. et al. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, Gujarat, v. 159, n. 4, p. 371-394, 2004.
- DICKMANN, L. et al. Comportamento de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) submetidas a estresse salino. *Revista de Ciências Agroambientais*, Alta Floresta, v. 3, n. 1, p. 64-75, 2005.
- DIMKPA, C. et al. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environment*, Logan, v. 32, n. 12, p. 1682-1694, 2009.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, Washington, DC, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- FACTFISH. *Sunflower seed, area harvested (hectare) - for all countries*. 2013. Disponível em: <<http://www.factfish.com/statistic/sunflower+seed,+area+harvested>>. Acesso em: 18 jun. 2014.
- FAITHFULL, N. T. *Methods in agricultural chemical analysis: a practical handbook*. Wallingford: CABI Publishing, 2002.
- FAYE, I. et al. Characterizing root responses to low phosphorus in pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]. *Agronomy Journal*, Madison, v. 98, n. 5, p. 1187-1194, 2006.
- GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 37, n. 3, p. 395-412, 2005.
- GOES, K. C. G. P. Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Seoul, v. 22, n. 4, p. 437-447, 2012.
- GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Moscow, v. 44, n. 1, p. 136-142, 2008.
- HANADA, R.; ROMEIRO, R. Seleção preliminar de rizobactérias como promotoras de crescimento e como indutoras de resistência sistêmica a *Xanthomonas campestris* em girassol. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 23, n. 1, p. 209 (abstract), 1998.
- HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, Milan, v. 60, n. 4, p. 579-598, 2010.
- JONES JUNIOR, J. B. *Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis*. Boca Raton: CRC Press, 2001.

- LACERDA, C. F. et al. Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes, under NaCl stress. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Campinas, v. 13, n. 3, p. 270-284, 2001.
- LAZZAROTTO, J. J. et al. O agronegócio do girassol no mundo e no Brasil. In: LEITE, R. M. V. B. C. et al. (Eds.). *Girassol no Brasil*. Londrina: Embrapa Soja, 2005. p. 15-42.
- LEITE, H. A. et al. *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 97, n. 6, p. 2639-2651, 2013.
- LEITE, R. M. V. B. C. et al. (Eds.). *Girassol no Brasil*. Londrina: Embrapa Soja, 2005.
- MASTRETTA, C. et al. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *International Journal of Phytoremediation*, Boca Raton, v. 11, n. 3, p. 251-267, 2009.
- MELNICK, R. L. et al. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control*, Xalapa, v. 46, n. 1, p. 46-56, 2008.
- PAIVA SOBRINHO, S. et al. Desenvolvimento inicial de plantas de girassol em condições de estresse hídrico. *Enciclopédia Biosfera*, Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011.
- PAIXÃO, C. L. *Aspecto fisiológico e bioquímico de genótipos de girassol sob estresse hídrico*. 2012. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2012.
- PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Orlando, v. 60, n. 3, p. 324-349, 2005.
- PÉREZ-GARCÍA, A. et al. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, Milan, v. 22, n. 1, p. 187-193, 2011.
- SARDANS, J.; PEÑUELAS, J. Increasing drought decreases phosphorus availability in an evergreen Mediterranean forest. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 267, n. 1, p. 367-377, 2004.
- SAS INSTITUTE. *SAS software*. Version 9.1. Cary: SAS Institute, 1999.
- SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell and Environment*, Oxford, v. 25, n. 2, p. 333-341, 2002.
- SEYED, Y. et al. *Water stress in plants: causes, effects and responses*. Rijeka: Intech Europe, 2012.
- SILVA, F. C. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999.
- SILVEIRA, E. B. et al. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, v. 22, n. 2, p. 217-221, 2004.
- SOUZA, C. C. et al. Avaliação de métodos de determinação de água disponível e manejo da irrigação em terra roxa sob cultivo de algodoeiro herbáceo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 4, n. 3, p. 338-342, 2000.
- SOUZA, C. R. et al. Trocas gasosas de mudas de videira, obtidas por dois porta-enxertos, submetidas à deficiência hídrica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 36, n. 10, p. 1221-1230, 2001.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). *Produção mundial: safra 2012/13*. 2012. Disponível em: <<http://www.cnpp.usda.gov/default.htm>>. Acesso em: 13 dez. 2012.
- WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, Washington, DC, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.
- YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, London, v. 80, n. 948, p. 209-213, 1955.
- ZHANG, Y. F. et al. Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. *Chemosphere*, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 57-62, 2011.