



**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO
DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL
ASSOCIADAS À CULTURA DO SORGO, EM
SOLOS DE DIFERENTES BIOMAS**

FABIANO GAMA DE SOUSA

2017

FABIANO GAMA DE SOUSA

**ISOLAMANETO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL
ASSOCIADAS À CULTURA DO SORGO, EM SOLOS DE DIFERENTES
BIOMAS**

Tese apresentada à
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agronomia, Área de
Concentração em Fitotecnia para obtenção do título
de Doutor.

Orientadora:
Vera Lúcia Divan Baldani
Co-orientador:
Joilson Silva Ferreira

VITÓRIA DA CONQUISTA – BA
BAHIA - BRASIL
2017

S696i

Sousa, Fabiano Gama.

Isolamento, identificação e seleção de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal associadas à cultura do sorgo, em solos de diferentes biomas. / Fabiano Gama Sousa, 2017.

202f. ; il. (algumas color.)

Orientador (a): Dra. Vera Lúcia Divan Baldani.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia, Vitória da Conquista, 2017.

Inclui referência F. 166 – 190.

1. Ciência do solo. 2. Estirpes bacterianas. 3. Fixação biológica de nitrogênio. I. Divan Baldani, Vera Lúcia. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia T. III.

CDD: 631.46

*Catálogo na fonte: **Cristiane Cardoso Sousa – CRB 5/1843***

UESB – Campus Vitória da Conquista – BA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Área de Concentração em Fitotecnia

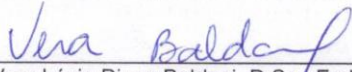
Campus de Vitória da Conquista - BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

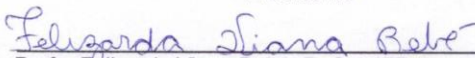
Título: "ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS À CULTURA DO SORGO, EM SOLOS DE DIFERENTES BIOMAS".

Autor: Fabiano Gama de Sousa

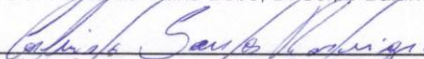
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, pela Banca Examinadora:



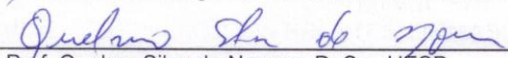
Profa. Vera Lúcia Divan Baldani, D.Sc., Embrapa Seropédica/RJ
Presidente



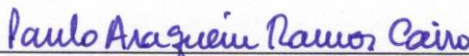
Profa. Felizarda Viana Bebé, D. Sc., IFBaiano - Guanambi



Prof. Carlindo Santos Rodrigues, D. Sc., IFBaiano - Salvador



Prof. Quelmo Silva de Novaes, D. Sc., UESB



Prof. Paulo Araquém Ramos Cairo, D. Sc., UESB

Data de realização: 31 de março de 2017.

Estrada do Bem Querer, Km 4 – Caixa Postal 95 – Telefone: (77) 3425-9383 – Fax: (77) 3424-1059

– Vitória da Conquista – BA – CEP: 45031-900

e-mail: ppgagronomia@uesb.edu.br

“Porque todo aquele que invocar o nome do Senhor será salvo”

Romanos 10:13

Ao Senhor Jesus Cristo por ter me acompanhado em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe, Marilene Gama de Souza, por sempre ter me incentivado aos estudos desde a infância.

Aos meus avós, Afrânio Gama de Souza (*in memoriam*) e Marinedes Almeida Sande (*in memoriam*).

Aos meus preciosos irmãos, Alexsandro Gama de Souza, Flávia Gama de Souza, Fernanda de Oliveira Souza e Esdras Gama de Souza.

A todos os meus primos, em especial a Jimmy Pereira de Souza.

Aos meus amigos, Alexandre Baraúna, Alex Barbosa Mafessoni, Alex Costa, Dany Roberta Marque Caldeira, Ernando Balbinot, Joelma Santos, João Jerônimo, Marcelo Dias, Rafael Henrique Pereira dos Reis, Régis Pacheco, Roberlan Ferreira Silva e Silvana Gomes dos Santos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Nos últimos quatro anos, passei por situações alegres e difíceis, mas não menos importantes, que, certamente, me tornaram uma pessoa mais humana e um profissional mais capacitado. Dessa forma, agradeço a muitos que colaboraram nessa caminhada.

A Deus, por meio de Jesus Cristo está presente em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, pela oportunidade de ingressar e obter mais um título.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, pelo afastamento concedido integralmente para cursar o Doutorado em Agronomia.

À EMBRAPA Agrobiologia, pelo Doutorado Sanduíche (2 anos), por intermédio do Dr. José Ivo Baldani.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado sanduíche.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder bolsa de Doutorado por intermédio do programa Prodoutoral.

Aos meus avós paternos, Afrânio Gama de Souza (*in memoriam*) e Marinedes Almeida Sande (*in memoriam*) por todo o suporte em todas as situações da minha vida.

À minha mãe, Marilene, e aos meus queridos irmãos, Alexsandro, Flávia, Fernanda e Esdras, por todo amor e companheirismo em tudo que passei até atingir o título de Doutor.

À minha Orientadora Dra. Vera Lúcia Divan Baldani, pela excelente orientação, compreensão e paciência durante o Doutorado, bem como pela amizade adquirida e pelos laços profissionais.

Ao Dr. José Ivo Baldani pela orientação no Doutorado sanduíche e os ensinamentos na área de genética de bactérias diazotróficas.

Ao Dr. Joilson Silva Ferreira pela co-orientação e pelos conhecimentos transferidos durante o curso.

À Joelma Santos pela amizade e ensinamentos na área de isolamento de bactérias diazotróficas.

À minha colega e amiga Silvana Gomes pela colaboração nas atividades práticas e pela vivência na EMBRAPA Agrobiologia.

Ao Carlos Prestes e Mayan pela colaboração em diversas atividades práticas e amizade.

Ao Alexandre Baraúna pelos ensinamentos na área de genética.

Aos amigos, Edevaldo, Wilk, Marcio, Jander, Carlinha, Jean, Rafael Cassador, Lucero, Eduardo, Pedro, Alessandro, Josimar, Erika, Rodolfo, Thianny, Ariany, João, Willian, Alisson e aos demais pela agradável convivência no alojamento da EMBRAPA Agrobiologia.

Aos professores do Programa de Pós-graduação e da EMBRAPA Agrobiologia pelos valiosos ensinamentos.

Aos técnicos do Laboratório de Gramíneas, Lúcio e Wilson por toda colaboração e força que me deram durante todo o período de desenvolvimento das atividades de pesquisa na EMBRAPA.

Aos funcionários da EMBRAPA, Roberto Carlos, Claudinho, Amarildo, Ernani e aos demais pela por todo incentivo e trabalho.

Aos meus colegas de Doutorado, Anderson, Ana Paula, Thiago, Rayka, Cristina, Renan, Danilo, Maurício, Edenilson, Eduardo, Josué, Flávio, Geraldo, Gisele, Greice, Thallyta, Jerffson, Joelma, Leandro, Ubiratan, Patrick, Pedro, Raelly, Ariana, Arlete e aos demais pela amizade e agradável convivência.

Aos meus amigos e professores Dany, Ernando e Rafael por toda colaboração e incentivo durante o meu afastamento e condução dos experimentos realizados no IFRO.

Aos alunos dos grupos de pesquisa INTEGRA e GEFOS, Almir, Patrícia, Dayenne, Ana Letícia, Roberlan, Alex, Amanda, Natanael, Roberto, Gisely, Daniela, Ana Paula, Ana Paula Melo, Fernando, André, Diego, Gabriel, Gean, Jessica, Larah, Mateus, Wender e Suellen pelo todo apoio nas atividades de pesquisa.

RESUMO GERAL

SOUSA, F.G. **Isolamento, identificação e seleção de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal associadas à cultura do sorgo, em solos de diferentes biomas.** Vitória da Conquista – BA: UESB, 2017. (Tese – Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia)

Neste estudo, uma fração da comunidade bacteriana de diazotrofos associados à cultura do sorgo (*Sorghum bicolor* L.) foi analisada em solos de diferentes biomas brasileiros. Foram isolados 73 diazotrofos utilizando os meios de cultivo semissólidos, NFb, JNFb, JMV e LGI de cultivares de sorgo forrageiro e sacarino. Os 73 isolados obtidos foram agrupados pela análise de BOX-PCR e posteriormente, as estirpes representativas foram identificadas pela análise dos genes 16S rRNA e *housekeeping recA*. A característica molecular de fixação de nitrogênio foi identificada pelo sequenciamento do gene *nifH*. A população de diazotróficos variou de 10^2 a 10^7 por grama de tecido fresco nas raízes e foi de 10^2 na parte aérea do sorgo. O sequenciamento do gene 16S rRNA confirmaram a presença dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas* e revelaram a ocorrência pela primeira vez de *A. formosense*, *A. zeae*, *A. melinis*, *B. aerius* e *S. pavanii* em plantas de sorgo. O gene *nifH* foi detectado em mais de 80% dos isolados bacterianos. Foram selecionadas mais 14 estirpes bacterianas promissoras para serem testadas em experimento gnotobiótico. Das 87 estirpes bacterianas testadas em condições gnotobióticas, foram selecionadas 13 diazotrofos para experimentos em casa de vegetação. Foram conduzidos quatro experimentos, dois com sorgo forrageiro e dois com sorgo granífero. As bactérias diazotróficas J36, N11, L60, JV49 e Aam82 proporcionaram maior incremento de massas secas de parte aérea e raízes nas plantas de sorgo forrageiro BRS 655. No incremento de teores de nitrogênio nas plantas de sorgo forrageiro BRS 655, destacaram as estirpes bacterianas N5, J9 e L66. A estirpe N5 apresentou as maiores produções de massas secas de raízes e parte aérea para o sorgo granífero BRS 332. As estirpes bacterianas N5, N11 e J39 proporcionaram maiores incrementos nos teores de nitrogênio no sorgo granífero BRS 332.

Palavras-chave: estirpes bacterianas, BOX-PCR, fixação biológica de nitrogênio, sustentabilidade.

Orientadora: Vera Lúcia Divan Baldani, *D.Sc.*, UESB e Co-orientador: Joilson Silva Ferreira, *D.Sc.*, UESB

Orientador, Doutorado-Sanduiche: José Ivo Baldani, *D.Sc.*, EMBRAPA-Agrobiologia

GENERAL ABSTRACT

SOUSA, F.G. **Isolation, identification and selection of plant growth promoting diazotrophic bacteria associated to sorghum culture in soils of different biomes.** Vitória da Conquista – BA: UESB, 2017. (Thesis - PhD in Agronomy – Concentration Area in Plant Science).

In this study, a fraction of the bacterial community of diazotrophs associated with sorghum (*Sorghum bicolor* L.) was analyzed in soils of different Brazilian biomes. The 73 diazotrophs were isolated using semi-solid culture media, NFb, JNFb, JMV e LGI of sweet and grass sorghum cultivars. The 73 isolates obtained were grouped by BOX-PCR analysis and later, the representative strains were identified by 16S rRNA gene analysis and the *recA housekeeping* gene. The nitrogen fixation characteristic was identified by the sequencing of the *nifH* gene. The population of diazotrophs varied from of 10^2 to 10^7 per gram of fresh tissue in the roots and was 102 in the shoot of the sorghum. Sequencing of the 16S rRNA gene confirmed the presence of the *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Bacillus* and *Stenotrophomonas*, genres and first occurrence of *A. formosense*, *A. zeae*, *A. melinis*, *B. aerius* and *S. pavanii* in a sorghum plant. The *nifH* gene was detected in more than 80% of the bacterial isolates. Were select 14 promising bacterial strains were selected for testing in a gnotobiotic experiment. Of the 87 bacterial strains tested under gnotobiotic conditions, 13 diazotrophs were selected for greenhouse experiments. Four experiments were carried out, two with grass sorghum and two with grain sorghum. The Diazotrophic bacteria J36, N11, L60, JV49 and Aam82 provided a greater increase of shoot dry masses and roots in BRS 655 grass sorghum plants. In the increase of nitrogen levels in BRS 655 grass sorghum plants, the bacterial strains N5, J9 and L66 stood out. The N5 strain presented the highest yields of dry root and shoot mass for BRS 332 grain sorghum. Bacterial strains N5, N11 and J39 provided higher increases in nitrogen content in BRS 332 grain sorghum.

Key-words: bacterial strains, biological fixation of nitrogen, BOX-PCR, sustainability.

Adviser: Vera Lúcia Divan Baldani, *D.Sc.*, UESB e Co-advisor: Joilson Silva Ferreira, *D.Sc.*, UESB
Advisor Ph.D Sandwich: José Ivo Baldani, *D.Sc.*, EMBRAPA-Agrobiologia

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

1	Caracterização geoclimática das localidades onde foram coletados os solos.....	37
2	Análise física das amostras de solos coletados nas áreas experimentais.....	38
3	Análise química dos solos coletados nas áreas experimentais.....	38
4	População de bactérias diazotróficas isoladas de dois genótipos de sorgo em três biomas brasileiros.....	52
5	Desdobramento do número mais provável (log do número de bactérias por grama de tecido fresco) e número de isolados.....	53
6	Análise de similaridade de isolados representativos agrupados na análise de BOX-PCR baseado no sequenciamento do gene 16S rRNA utilizando o programa BLASTn.....	64
7	Frequência dos grupos bacterianos baseado no gene 16S rRNA e os índices de diversidade das bactérias diazotróficas isoladas na cultura do sorgo em três biomas.	75
8	Síntese de compostos indólicos (AIA) das estirpes bacterianas isoladas e bactérias diazotróficas tipo em 24 horas de crescimento em meio DYGS com L-triptofano.....	79
9	Síntese de compostos indólicos (AIA) das estirpes bacterianas isoladas e bactérias diazotróficas tipo em 48 horas de crescimento em meio DYGS com L-triptofano.....	80

CAPÍTULO II

1	Tratamentos do experimento gnotobiótico compostos por estirpes bacterianas diazotróficas isoladas de sorgo, bactérias padrão, testemunha sem inoculação e sem N e tratamento sem inoculação e com adubação nitrogenada em sorgo forrageiro BRS 655.....	88
2	Bactérias padrão utilizadas no experimento gnotobiótico em sorgo forrageiro BRS 655 em Seropédica-RJ.....	89
3	Análise química dos solos coletados nas áreas experimentais para os experimentos em casa de vegetação.....	91
4	Tratamentos utilizados em casa de vegetação nos sorgos granífero BRS 332 e forrageiro BRS 665 em casa de vegetação em Seropédica – RJ e Colorado do Oeste – RO.....	92
5	Efeito de estirpes bacterianas diazotróficas isoladas do sorgo e	

	bactérias tipo diazotróficas sobre a massa fresca de raiz (MFR), massa seca de raiz (MSR), porcentagem de matéria seca de raiz (PMR), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa seca de parte aérea (MSPA) e porcentagem de matéria seca de parte aérea (PMPA) de sorgo forrageiro BRS 655 em experimento gnotobiótico.....	100
6	Efeito das estirpes bacterianas na morfologia radicular de sorgo forrageiro BRS 655, cultivado em condições gnotobióticas em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.....	104
7	Efeito das estirpes bacterianas no comprimento específico radicular (CER, mm mg ⁻¹) e nos números de pontas total de raízes (PTR), pontas de raízes grossas (PRG), pontas de raízes finas (PRG) e pontas de raízes mais finas (PRMF) de sorgo forrageiro BRS 655, cultivado em condições gnotobióticas em casa de vegetação no município de Seropédica - RJ.....	114
8	Efeito de estirpes bacterianas e doses crescentes de nitrogênio no crescimento inicial (30 DAE) de plantas de sorgo forrageiro BRS 655, cultivado em casa de vegetação no município de Seropédica-RJ.....	117
9	Massas médias dos componentes morfológicos e índices de colheita de plantas de sorgo forrageiro BRS 655 inoculadas com estirpes bacterianas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação nos municípios de Seropédica – RJ e Colorado do Oeste-RO, colhidas aos 45 dias após a semeadura.....	119
10	Porcentagem, teor e partição de nitrogênio por planta de sorgo forrageiro BRS 665 sob o efeito de estirpes bacterianas e doses crescentes de nitrogênio, cultivadas em casa de vegetação em Seropédica – RJ.....	124
11	Porcentagem, teor e partição de nitrogênio por planta de sorgo forrageiro BRS 665 sob o efeito de estirpes bacterianas e doses crescentes de nitrogênio, cultivadas em casa de vegetação em Colorado do Oeste – RO.....	129
12	Efeito das estirpes bacterianas isoladas do sorgo e de bactérias padrão na produção de componentes da parte aérea de sorgo granífero BRS 332 em casa de vegetação, colhidos aos 45 dias após a semeadura (estádio vegetativo) nos municípios de Seropédica-RJ e Colorado do Oeste-RO.....	140

13	Massas dos componentes morfológicos da parte aérea, massa de raízes e número de grãos de sorgo granífero BRS 332, cultivado em casa de vegetação (ciclo reprodutivo), inoculado com estirpes bacterianas e com doses crescentes de nitrogênio em Seropédica – RJ.....	143
14	Massas dos componentes morfológicos da parte aérea, massa seca das raízes e número de grãos de sorgo granífero BRS 332, cultivado em casa de vegetação (ciclo reprodutivo), inoculado com estirpes bacterianas e com doses crescentes de nitrogênio em Colorado do Oeste – RO.....	145
15	Percentual e teores de nitrogênio em plantas de sorgo granífero BRS 332 sob o efeito de estirpes bacterianas e doses crescentes de nitrogênio, cultivadas em casa de vegetação em Seropédica–RJ.....	148
16	Partição percentual dos teores de nitrogênio na raiz (PNR), colmo (PNC), folha (PNF), panícula (PNP) e grãos (PNG) em plantas de sorgo granífero BRS 332, cultivadas em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.....	149
17	Percentual e teores de nitrogênio em plantas de sorgo granífero BRS 332 sob o efeito de estirpes bacterianas e doses crescentes de nitrogênio, cultivadas em casa de vegetação em Colorado do Oeste – RO.....	152
18	Partição percentual dos teores de nitrogênio na raiz (PNR), colmo (PNC), folha (PNF), panícula (PNP) e grãos (PNG) em plantas de sorgo granífero BRS 332, cultivadas em casa de vegetação no município de Colorado do Oeste – RO.....	153

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- 1 Diagrama de todas as etapas aplicadas para contar e isolar as bactérias diazotróficas livres, associativas e endofíticas..... 41
- 2 Colônias representativas dos principais grupos fenotípicos de bactérias isoladas de plantas de sorgo, cultivadas em meio sólido NFb 3x (A e B), JMV (C) e LGI (D). Bactérias tipo: SP245=*A. brasilense*; HRC54 = *H. seropedicae*; Aam82 = *A. amazonense*; SP7 = *A. brasilense*..... 51
- 3 Dendograma obtido pela análise de agrupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados dos meios NFb e JNFb. As matrizes de similaridade foram calculadas usando o coeficiente de Jaccard e os agrupamentos usando o método UPGMA..... 56
- 4 Dendograma obtido pela análise de agrupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados dos meios JMV. As matrizes de similaridade foram calculadas usando o coeficiente de Jaccard e os agrupamentos usando o método UPGMA..... 60
- 5 Dendograma obtido pela análise de agrupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados dos meios LGI. As matrizes de similaridade foram calculadas usando o coeficiente de Jaccard e os agrupamentos usando o método UPGMA..... 60
- 6 Dendograma obtido pela análise de agrupamento dos perfis de BOX-PCR para todos os isolados dos meios NFb, JNFb, JMV e LGI. As matrizes de similaridade foram calculadas usando o coeficiente de Jaccard e os agrupamentos usando o método UPGMA..... 61
- 7 Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~ 1.450 pb), incluindo os isolados representativos e as estirpes de bactérias diazotróficas depositadas no banco de dados NCBI. O teste de filogenia foi baseado no agrupamento das sequências de acordo o algoritmo Neighbor-joining, com a árvore consenso gerada pelo programa MEGA 7. Os números localizados nos ramos da árvore indicam a porcentagem de 1.000 *bootstraps*. A sequência do gene 16S rRNA de *Spiroplasma chrysopicola* foi utilizada como grupo externo..... 65
- 8 Árvore filogenética baseada em sequências do gene *nifH* (~ 350 pb), incluindo os isolados representativos e as estirpes de bactérias diazotróficas depositadas no banco de dados NCBI. O teste de filogenia foi baseado no agrupamento das sequências de

	acordo o algoritmo Neighbor-joining, com a árvore consenso gerada pelo programa MEGA 7. Os números localizados nos ramos da árvore indicam a porcentagem de 1.000 <i>bootstraps</i> . A sequência do gene <i>nifH</i> de <i>Bacillus cereus</i> foi utilizada como grupo externo.....	69
9	Árvore filogenética baseada em sequências do gene <i>recA</i> (~ 550 pb), incluindo os isolados representativos e as estirpes de bactérias diazotróficas depositadas no banco de dados NCBI. O teste de filogenia foi baseado no agrupamento das sequências de acordo o algoritmo Neighbor-joining, com a árvore consenso gerada pelo programa MEGA 7. Os números localizados nos ramos da árvore indicam a porcentagem de 1.000 <i>bootstraps</i> . A sequência do gene <i>recA</i> de <i>Enterobacter</i> sp. foi utilizada como grupo externo.....	73
10	Vias hipotéticas e caracterizadas para a síntese de ácido indol 3 acético (AIA) em <i>Azospirillum</i> sp. As linhas pontilhadas representam etapas hipotéticas de conversão para o estoque de produtos.....	77

CAPÍTULO II

1	Efeito das estirpes bacterianas <i>Azospirillum brasilense</i> J39 e <i>Azospirillum amazonense</i> L72 sobre o sorgo forrageiro BRS 655 em comparação com a testemunha (88, sem inoculação) e com tratamento sem inoculação e fertilizado, proporcionalmente, com 100 kg N ha ⁻¹ (89).....	102
2	Altura média de plantas de sorgo forrageiro BRS 665 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterianas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.....	130
3	Diâmetro médio de plantas de sorgo forrageiro BRS 665 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterianas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.....	131
4	Efeito da inoculação de sorgo forrageiro BRS 655 com as estirpes de <i>Azospirillum brasilense</i> N11 (A), <i>Azospirillum formosense</i> J36 (B), <i>Azospirillum melinis</i> JV49 (C) e <i>Azospirillum amazonense</i> L60 (D) em relação à testemunha (plantas à direita) em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.....	132
5	Altura média de plantas de sorgo forrageiro BRS 665 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes	

	bacterinas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Colorado do Oeste – RO.....	134
6	Diâmetro médio de plantas de sorgo forrageiro BRS 665 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterinas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Colorado do Oeste – RO.....	135
7	Massas secas médias de raiz (MSR), colmo (MSC), folha (MSF), parte aérea (MSPA) e planta inteira (MSPI) por planta de sorgo forrageiro BRS 665 cultivados em casa de vegetação sob o efeito de doses crescentes de nitrogênio nos municípios de Seropédica-RJ e Colorado do Oeste-RO.....	137
8	Altura média de plantas de sorgo granífero BRS 332 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterinas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.....	155
9	Diâmetro médio de plantas de sorgo granífero BRS 332 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterinas.....	156
10	Altura média de plantas de sorgo granífero BRS 332 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterinas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Colorado do Oeste – RO.....	158
11	Diâmetro médio de plantas de sorgo granífero BRS 332 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterinas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Colorado do Oeste – RO.	159
12	Massas secas médias de raiz (MSR), colmo (MSC), folha (MSF), grãos (MSG) e parte aérea (MSPA) por planta de sorgo granífero BRS 332, cultivados em casa de vegetação sob o efeito de doses crescentes de nitrogênio nos municípios de Seropédica-RJ e Colorado do Oeste-RO.....	160
13	Efeito da inoculação de sorgo granífero BRS 332 com as estirpes de <i>Bacillus safensis</i> N5 (A), <i>Azospirillum brasilense</i> N11 (B), <i>Azospirillum brasilense</i> J39 (C) e <i>Azospirillum melinis</i> JV49 (D) em relação à testemunha (plantas à direita) em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.....	162

APÊNDICE A (CAPÍTULO I)

1A	Meios semissólidos JMV, JNFb, NFb, LGI e LGI-P utilizados para o isolamento de bactérias diazotróficas.....	191
2A	Películas aerotáticas características de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de sorgo nos meios NFb, JNFb, JMV e LGI.....	191
3A	Estirpe bacteriana JV44 identificada como <i>Azospirillum melinis</i> isolada no meio JMV e transferida para o meio NFb, para confirmação da espécie. Estirpe bacteriana L65 isolada no meio LGI e caracterizada molecularmente como <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	192
4A	Placas com colônias puras de isolados bacterianos de sorgo em meio Batata.	192
5A	Perfil eletroforético de análise BOX-PCR para agrupamento dos perfis de DNA das estirpes bacterianas isoladas em meio NFb. O marcador (M) utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder e o penúltimo poço é o branco (B).....	193
6A	Perfil eletroforético de análise BOX-PCR para agrupamento dos perfis de DNA das estirpes bacterianas isoladas em meio JNFb. O marcador (M) utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder e o penúltimo poço é o branco.....	193
7A	Perfil eletroforético de análise BOX-PCR para agrupamento dos perfis de DNA das estirpes bacterianas isoladas em meio JMV. O marcador (M) utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder.....	194
8A	Perfil eletroforético de análise BOX-PCR para agrupamento dos perfis de DNA das estirpes bacterianas isoladas em meio LGI. O marcador (M) utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder.....	194
9A	Perfil eletroforético da amplificação do gene 16S rRNA de estirpes bacterianas isoladas da cultura do sorgo. O marcador (M) utilizado foi 1 Kb Plus DNA Ladder e o último poço é representado pelo branco (B).....	195
10A	Perfil eletroforético de amplificação do gene <i>nifH</i> de estirpes bacterianas isoladas da cultura do sorgo. O marcador (M) utilizado foi 1 Kb Plus DNA Ladder. Nos poços 4, 6 e 8 não houve amplificação do gene <i>nifH</i>	195
11A	Perfil eletroforético de amplificação do gene <i>housekeeping recA</i> de estirpes bacterianas isoladas da cultura do sorgo. O marcador (M) utilizado foi 1 Kb Plus DNA Ladder. No poço 14 não houve amplificação do gene <i>recA</i>	196
12A	Fluxograma de amplificação e sequenciamento de genes para caracterização molecular das bactérias diazotróficas na cultura do	

	sorgo.....	196
13A	Microplacas contendo as curvas padrão de AIA e BSA, e as concentrações produzidas de AIA e proteínas pelas estirpes bacterianas isoladas do sorgo para determinação da síntese de compostos indólicos ($\mu\text{g mL PTN}^{-1}$).....	197
14A	Análise filogenética de <i>Azospirillum</i> spp. e outros representantes da família <i>Rhodospirillaceae</i> baseado em sequências do gene 16S rRNA.....	202

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2	REFENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1	A cultura do sorgo.....	21
2.2	Bactérias Diazotróficas Associadas a Gramíneas.....	24
3	CAPÍTULO I. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICA PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADA À CULTURA DO SORGO EM DIFERENTE BIOMAS.....	31
	RESUMO.....	32
	ABSTRACT.....	33
1	INTRODUÇÃO.....	34
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1	Caracterização geográfica e edáfica das áreas experimentais.....	37
2.2	Genótipos de sorgo e isolamento de bactérias diazotróficas.....	38
2.3	Caracterização fenotípica de bactérias diazotróficas.....	41
2.4	Caracterização molecular de bactérias diazotróficas.....	42
2.4.1	Extração de DNA de bactérias diazotróficas.....	42
2.4.2	Análise de BOX-PCR de bactérias diazotróficas.....	43
2.4.3	Amplificação do gene 16S rRNA de bactérias diazotróficas.....	44
2.4.4	Amplificação do gene <i>nifH</i> de bactérias diazotróficas.....	44
2.4.5	Amplificação do gene <i>housekeeping recA</i> de bactérias diazotróficas.....	45
2.4.6	Sequenciamento e análise de similaridade de bactérias diazotróficas.....	46
2.5	Índices de diversidade de bactérias diazotróficas.....	48
2.6	Síntese de compostos indólicos de bactérias diazotróficas.....	48
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.1	Isolamento e população de bactérias diazotróficas.....	50
3.2	Caracterização fenotípica de bactérias diazotróficas.....	55
3.3	Identificação e caracterização molecular das bactérias diazotróficas.....	57
3.4	Índices de diversidade de bactérias diazotróficas.....	73
3.5	Síntese de compostos indólicos das bactérias diazotróficas.....	76
4	CONCLUSÕES.....	81
4	CAPÍTULO II. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS À CULTURA DO SORGO EM CONDIÇÕES GNOTOBIÓTICAS E CASA DE VEGETAÇÃO.....	81
	RESUMO.....	83

	ABSTRACT.....	84
1	INTRODUÇÃO.....	86
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	86
2.1	Experimento gnotobiótico de bactérias diazotróficas associadas ao sorgo forrageiro BRS 655.....	86
2.2	Bactérias diazotróficas associadas aos sorgos forrageiro e granífero em casa de vegetação.....	90
2.2.1	Bactérias diazotróficas associadas ao sorgo forrageiro em casa de vegetação.....	93
2.2.2	Bactérias diazotróficas associadas ao sorgo granífero em casa de vegetação.....	96
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
3.1	Bactérias diazotróficas associadas ao sorgo forrageiro em condições gnotobióticas.....	99
3.2	Bactérias diazotróficas associadas ao sorgo forrageiro BRS 655 em casa de vegetação.....	116
3.3	Bactérias diazotróficas associadas ao sorgo granífero BRS 332 em casa de vegetação.....	138
4	CONCLUSÕES.....	163
5	CONCLUSÕES GERAIS.....	164
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	165
7	REFERÊNCIAS.....	166
	APÊNDICE A. CAPÍTULO I.....	191
	ANEXO A. CAPÍTULO I.....	198

1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção agrícola atual demanda um uso elevado de insumos para que os genótipos cultivados possam expressar adequadamente os seus rendimentos. Assim, o requerimento por insumos como fertilizantes químicos vem aumentando a cada ano, o que tem elevado os custos e reduzido a sustentabilidade dos agroecossistemas.

A busca por utilização de processos e/ou produtos que visem a redução da dependência por insumos nos sistemas de produção agropecuários tem sido almeçados, principalmente em relação ao nitrogênio (N), que é o elemento mais requerido pelas plantas.

Neste cenário, pesquisas estão sendo desenvolvidas com bactérias diazotróficas, que fixam biologicamente o nitrogênio atmosférico e promovem o crescimento das plantas, reduzindo o uso do N na agricultura.

A simbiose de bactérias diazotróficas com leguminosas, como no caso da soja, já está bem definida. Entretanto, estudos sobre a associação dessas bactérias com gramíneas são recentes e estão mais avançados nas culturas do milho, cana-de-açúcar, trigo e arroz. Por sua vez, experimentos avaliando a associação de bactérias diazotróficas com outras culturas de importância sócio-econômica no Brasil devem ser realizadas, como o caso do sorgo (*Sorghum bicolor* L. MOENCH).

O sorgo é uma gramínea que, em virtude da sua diversidade genotípica, pode ser cultivada com a finalidade de produzir grãos, forragem, silagem e etanol. Além disso, a planta de sorgo tolera mais o déficit de água e o excesso de umidade no solo do que a maioria dos outros cereais e pode ser cultivada numa ampla faixa de condições de solo (MAGALHÃES et al., 2003), em virtude de apresentar melhor conversão de água em matéria seca.

Segundo ANDRADE NETO et al. (2010), o sorgo é uma planta de origem tropical com boa capacidade fotossintética, adaptada às mais variadas condições de fertilidade do solo, sendo mais tolerante do que o milho a altas temperaturas e déficit hídrico, razão pela qual é cultivado em ampla faixa de latitudes, mesmo em regiões com temperaturas elevadas, secas ou onde ocorrem veranicos. Assim, a cultura do sorgo, pela sua característica xerófita, é recomendada para plantio em regiões de escassez hídrica e em safras de sucessão.

Considerando as características morfológicas e bioquímicas do sorgo, os seus cultivares apresentam boa adaptabilidade de cultivo em diversos biomas do Brasil, o que tem favorecido o incremento na área plantada e em sua produtividade.

Ademais, em virtude das interações climáticas, edáficas e da biota de um bioma, o desenvolvimento da cultura do sorgo é distintamente influenciada, bem como a sua relação com as bactérias diazotróficas.

Para tanto, é imprescindível que estirpes de bactérias diazotróficas sejam isoladas e selecionadas a partir da interação com a planta em cada bioma.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do sorgo

A cultura do sorgo em virtude das suas características agronômicas tem aumentado consideravelmente a sua área plantada, produção e produtividade no Brasil. De acordo com o IBGE (2011), a área plantada do sorgo foi 761.844 ha, a produção de 1,9 milhão de toneladas e a produtividade de 2.550 kg ha⁻¹.

Na safra 2011/12 a produção aumentou em 300 mil toneladas, em comparação a safra 2010/11, atingindo um valor de 2,2 milhões de toneladas (CONAB, 2013).

A crescente demanda por grãos no mundo, associada ao substancial incremento genético dos híbridos, tem alavancado, a cada ano, a área plantada e a produtividade da cultura do sorgo no Brasil (ALMEIDA FILHO et al., 2010). Corroborando com esses autores, Terra et al. (2010) afirmaram que a cultura do sorgo granífero tem aumentado consideravelmente sua produção nos últimos tempos no Brasil, onde muito desse incremento se deve à expansão da área plantada, ao emprego de novas técnicas de cultivo e ao uso de genótipos mais produtivos e adaptados às condições edafoclimáticas de plantio. O sorgo parece ter encontrado seu nicho de mercado, fato importante para alavancar o processo produtivo, consolidando sua posição de cultura alternativa ao milho na produção de vários subprodutos.

O sorgo é considerado um dos cereais com maior tolerância à seca, que se deve em parte a mecanismos como o *stay green*, que é caracterizado pela manutenção de caules e folhas verdes sob estresse de seca após o florescimento (SUBUDHI et al., 2000). O sorgo parece apresentar duas características: escape e tolerância. O escape, através de um sistema radicular profundo e ramificado, o qual é eficiente na extração de água do solo. Já a tolerância está relacionada ao nível bioquímico. A planta diminui o metabolismo, murcha (hiberna) e tem um

poder extraordinário de recuperação quando o estresse é interrompido (MAGALHÃES e DURÃES, 2003).

Na atividade agrícola, é natural que os agricultores armazenem o excedente de forragem a ser utilizado no período da seca. Neste contexto, o sorgo se destaca como cultura promissora para a alimentação animal, pois além de não competir com produtos destinados ao consumo humano, suas características de cultivo e o valor nutritivo fazem com que a cultura seja estudada como sucedânea à do milho (SILVA et al., 2005).

A silagem de milho é tida como padrão, em virtude das suas características químico-bromatológicas, favorecerem o processo fermentativo, bem como do seu valor nutritivo e digestibilidade. No entanto, em razão da sua necessidade de água, há maiores perdas na produção. Assim, de acordo Machado et al. (2012), entre as forrageiras indicadas para a produção de silagem, o sorgo destaca-se pela resistência ao déficit hídrico, pela amplitude de plantio e pela capacidade de rebrota.

O sorgo forrageiro é uma das plantas mais indicadas para a produção de silagem, por apresentar elevado rendimento, e características que favorecem o perfil de fermentação desejável, como adequados teores de matérias seca e de substratos fermentescíveis, além de baixo poder tampão (FERNANDES et al., 2009).

Neumann et al. (2002) destacaram que o sorgo é uma planta adaptada ao processo de ensilagem, devido às suas características fenotípicas que determinam facilidade de plantio, manejo, colheita e armazenamento.

Corroborando com outros autores, Lima (2008) afirmou que o sorgo é uma cultura que produz silagens com boas características fermentativas e destaca-se por ser um volumoso com adequada concentração de carboidratos solúveis, essenciais para a fermentação láctica. Depois do milho, é a cultura anual mais importante para produção de silagem, pois possibilita produção

economicamente viável (alta produção por unidade de área), possui bom valor energético e níveis médios de proteína (cerca de 8% de proteína bruta). Um outro tipo de sorgo forrageiro seria o de corte e pastejo, oriundo do cruzamento de *Sorghum bicolor* com o *Sorghum sudanensis*.

Gobetti (2010) afirma que os sorgos utilizados em sistemas de corte e/ou pastejo são híbridos interespecíficos obtidos através do cruzamento entre o capim Sudão (*S. sudanensis*) e genótipos de sorgo (*S. bicolor*), sendo plantas de rápido crescimento vegetativo e estabelecimento, de grande adaptabilidade e pouca exigência quanto à fertilidade do solo.

O híbrido de sorgo com capim Sudão pode ser uma boa opção de forragem, com alta produtividade por área e adequado valor nutricional para alimentação de ruminantes, principalmente em sistemas de produção onde a oferta de alimentos volumosos de boa qualidade é sazonal, tornando a produção animal instável, ao longo do ano (GONTIJO et al., 2008).

O sorgo sacarino apresenta colmos com caldo semelhante ao da cana, rico em açúcares fermentescíveis, e pode servir para a produção de etanol na mesma instalação utilizada pela cana-de-açúcar. Trata-se de uma espécie e ciclo rápido, cultura totalmente mecanizável, alta produtividade de biomassa verde, com altos rendimentos de etanol e com bagaço utilizável com fonte de energia (DURÃES, 2011).

Segundo Lima et al. (2011), a produção de etanol a partir do sorgo sacarino tem sido considerada viável, devido a sua semelhança com a cana-de-açúcar, ao alto teor de açúcares fermentescíveis, além do processamento poder ser feito nas usinas de cana-de-açúcar. Outro aspecto importante é a possibilidade de produção de etanol no período da entressafra da cana-de-açúcar utilizando-se o sorgo sacarino. Portanto, o sorgo sacarino apresenta-se como uma interessante opção complementar à cana-de-açúcar para compor a matriz energética nacional,

possibilitando a expansão da área passível de utilização para produção de bioenergia e aumentando a eficiência da produção de etanol (MAY et al., 2012).

2.2 Bactérias diazotróficas associadas a gramíneas

O N é o elemento predominante na atmosfera (78%), porém, indisponível às plantas, em razão da tripla ligação presente na molécula do gás nitrogênio (N_2), é o macronutriente mais requerido para o desenvolvimento das plantas. E por este motivo, o uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura é uma prática obrigatória. De acordo com Sala et al. (2007), nos países de clima tropical, a agricultura é mais dependente do emprego de fertilizantes nitrogenados, pois devido à grande quantidade de chuvas e à rápida decomposição da matéria orgânica, grande parte do N é perdida via lixiviação, desnitrificação e pela imobilização microbiana. Dessa maneira, a fertilização com N se torna mais importante, o que incrementa o custo da produção agrícola. Então, processos ou técnicas que possibilitem a redução do uso de adubação nitrogenada melhora a produção viável ambientalmente. Para contribuir com essa condição, Döbereiner (1997) enfatizou que a maioria dos genótipos de plantas utilizadas comercialmente foi selecionada para a obtenção de alta produtividade em condições de baixo nível de N no solo, favorecendo a seleção de variedades que são capazes de suprir parte das suas necessidades de N pela associação com bactérias diazotróficas.

As bactérias diazotróficas são aquelas que fixam biologicamente o N atmosférico e o transferem para a planta quando associadas; em contrapartida, requerem energia na forma de ATP. As bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas são classificadas em: rizosféricas, endofíticas facultativas e endofíticas obrigatórias (BALDANI et al, 1997). As bactérias rizosféricas colonizam a rizosfera das plantas, enquanto as endofíticas colonizam

interiormente a planta, sendo que as facultativas são encontradas nas raízes interna e externamente, e as obrigatórias, no interior de raízes e na parte aérea.

As bactérias endofíticas são aquelas que podem ser isoladas de tecidos vegetais desinfestados ou extraídas do interior da planta e não causam prejuízo visível à mesma. Estas bactérias não estão sujeitas à competição por nutrientes, que normalmente ocorre no solo da rizosfera, e têm maior eficiência, uma vez que, ao contrário das colonizadoras de rizosfera, já estão internamente no sistema radicular, onde os compostos bioativos por elas sintetizados encontram-se prontamente disponíveis às plantas. Nessa relação a planta fornece nutrientes e habitat, enquanto a bactéria irá promover o crescimento e sanidade da planta (MARIANO et al., 2004).

As bactérias diazotróficas endofíticas ainda podem ser homólogas e não homólogas. As estirpes isoladas de uma espécie vegetal são mais aptas a se restabelecerem nas raízes da mesma espécie vegetal, após a inoculação, sendo denominadas de estirpes homólogas (BALDANI e BALDANI, 2005), enquanto estirpes não homólogas são originalmente isoladas de outra espécie vegetal (SALA et al., 2007).

As bactérias diazotróficas ainda podem sintetizar fitormônios, sideróforos, solubilizar fosfatos e serem antagônicas a fitopatógenos, promovendo, dessa forma, o crescimento das plantas. Assim, as bactérias diazotróficas estão sendo denominadas de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP). Hungria (2011), revisando vários autores, conceituou as BPCP como grupo de microrganismos benéficos às plantas, devido a sua capacidade de colonizar a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos das plantas. Considerou que as BPCP podem estimular o crescimento das plantas por diversas maneiras, sendo as mais relevantes: capacidade de fixação biológica de nitrogênio; aumento na atividade da redutase do nitrato, quando crescem endofiticamente nas plantas; produção de hormônios, como

auxinas, citocininas, giberelinas e uma variedade de outras moléculas; solubilização de fosfato; e por atuarem como agente de controle biológico de patógenos.

Em plantas não leguminosas foi observada a atividade de redução de acetileno, sendo mais tarde constatado que as bactérias associadas a essas plantas possuíam os genes requeridos para expressão da nitrogenase, e ainda, que ocorria a expressão “in situ” dessa enzima na associação planta-bactéria diazotrófica (JAMES, 2000).

Diante desse contexto, vários estudos têm sido realizados no Brasil avaliando bactérias diazotróficas em gramíneas, principalmente nas culturas do milho, arroz, trigo e cana-de-açúcar. Os resultados obtidos por meio desses estudos são promissores, onde a inoculação com as bactérias tem permitido a substituição parcial da adubação nitrogenada. De forma geral, as bactérias diazotróficas associadas à gramíneas não suprem completamente a exigência de N das plantas, como ocorre com a simbiose dos rizóbios com a cultura da soja. Em revisão sobre bactérias diazotróficas associativas, Moreira et al. (2010) afirmaram que a contribuição de N fixado para as gramíneas está em torno de 25 a 50 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, o que equivale ao suprimento médio de cerca de 17% das demandas das culturas. Considerando a importância que as espécies produtoras de grãos, como trigo, arroz e milho, entre outras, são a principal fonte de carboidrato da dieta humana, além do alto potencial fotossintético das gramíneas C4 nos trópicos, esta taxa de fixação biológica de nitrogênio (FBN), mesmo baixa, representa uma grande economia nos custos de produção, o que justifica estudos visando ao seu manejo.

Segundo Mantelin e Touraine (2004), as bactérias podem favorecer a nutrição nitrogenada das culturas, incrementando a capacidade de assimilação de N, indiretamente, com o crescimento do sistema radicular, ou diretamente, estimulando o sistema de transporte de N das plantas.

Pereira et al. (2013) encontraram maiores valores de acúmulo de biomassa na variedade RB867515 de cana-de-açúcar, quando inoculada com um coquetel de bactérias (*Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia tropica* e *Azospirillum amazonense*), em comparação à adição de estirpes individuais ou de adubação nitrogenada. Esse resultado demonstra que efeitos sinérgicos podem ser encontrados no uso de mais de uma estirpe de bactéria. Utilizando essas mesmas estirpes, Shultz et al. (2012) encontraram respostas significativas para o cultivar RB867515, onde o incremento de desenvolvimento e produtividade foi similar à adição de 120 kg de N ha⁻¹, porém, não encontraram diferenças significativas para a variedade RB72454, provavelmente por este cultivar ser indicada para solos de baixa fertilidade.

Suman et al. (2008) relataram que variedades de cana-de-açúcar, com maior número de bactérias diazotróficas, não somente apresentam maior potencial de FBN, bem como, quando submetidas à metade da dose recomendada de fertilizante nitrogenado, atingem níveis de produtividade similares aos de plantas com a dose completa.

O uso de bactérias diazotróficas nas culturas do milho, arroz e trigo tem possibilitado respostas positivas, reduzindo a adubação nitrogenada. Por meio dessas pesquisas, atualmente no Brasil estão sendo comercializados inoculantes à base de estirpes Ab-V5 e Ab-V6 da bactéria *Azospirillum brasilense*.

Mendes et al. (2011) observaram aumento na produtividade de grãos de trigo, quando associado ao uso de *Azospirillum brasilense*, com e sem a redução na adubação de cobertura com nitrogênio.

Sala et al. (2005) verificaram que bactérias diazotróficas endofíticas promovem o crescimento e o acúmulo de N em plantas de trigo.

Sabino et al. (2012) avaliando o desenvolvimento inicial de plântulas de arroz, observaram que a combinação de inoculação com estirpes de bactérias

diazotróficas, mais a aplicação de 50 kg de N ha⁻¹, propicia os maiores acúmulos de biomassa.

Guimarães et al. (2003), utilizando a variedade de arroz Guarani inoculada com bactérias diazotróficas endofíticas, obtiveram resultados positivos em casa de vegetação e no campo. Em casa de vegetação, houve um incremento na matéria seca, no N-total e na produção de grãos, enquanto que, em campo, as estirpes ZAE94 de *Herbaspirillum seropedicae* foram as que promoveram aumento de 50% na produção de grãos.

As bactérias diazotróficas apresentam efeitos positivos também no processo de germinação e no vigor das sementes. Araújo et al. (2010) constataram que estirpes de bactérias diazotróficas podem ser selecionadas para formular inoculante para sementes de arroz e que elas promovem o aumento da velocidade de germinação das sementes dos cultivares IR42 e Zebu Branco, com menor contaminação por fungos.

Bartchechen et al. (2010), estudando a combinação da bactéria *Azospirillum brasilense* e milho com 0, 50% e 100% da dose de N requerida pela planta, observaram que a inoculação propicia aumento da produtividade apenas quando não há adubação.

Braccini et al. (2012) descreveram que a inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes de milho promove um incremento na altura e na produção de grãos quando comparado ao controle, aumentando a matéria seca das plantas. Além disso, os mesmos autores afirmaram ser viável agronomicamente aplicar o bioestimulante Stimulate, na concentração 200 mL ha⁻¹ via foliar, com a adição de 50% da dose de N na semeadura, e a inoculação com a *A. brasilense*.

De acordo com Hungria (2011), na cultura do milho safrinha, a inoculação com estirpes de *Azospirillum brasilense* e a aplicação de apenas 24

kg N ha⁻¹ na semeadura resulta em rendimento de 3400 kg ha⁻¹, que são interessantes economicamente para agricultura familiar. Entretanto, se forem adicionados 30 kg N ha⁻¹ no florescimento do milho é possível alcançar rendimento de 7000 kg ha⁻¹ pela inoculação.

Diante desse contexto, observa-se que as culturas de milho, arroz, trigo e cana-de-açúcar apresentam avanço nas pesquisas com bactérias diazotróficas. Contudo, outras gramíneas de importância econômica, como o sorgo, devem ser melhor estudadas, em referência à associação com bactérias diazotróficas. James et al. (1997) observaram que, nas folhas de plantas de sorgo as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* não estão presentes nos espaços intercelulares, mas somente localizados nos vasos do xilema. Outros autores também já demonstraram a presença de bactérias diazotróficas em plantas de sorgo (BALDANI et al., 1986; BASHAN et al., 2004).

Em estudo avaliando a associação de bactérias diazotróficas no sorgo, Pereira et al. (1988) encontraram respostas positivas da associação com *Azospirillum lipoferum*.

Bergamaschi et al. (2007) isolaram bactérias diazotróficas de 14 cultivares de sorgo forrageiro e afirmaram que os isolados provavelmente são dos gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Burkholderia*. Entretanto, houve diferença na colonização das bactérias em relação aos genótipos, demonstrando especificidade na interação planta e bactéria.

Santos (2010), estudando a inoculação de bactérias diazotróficas em sorgo granífero, forrageiro e sacarino, em casa de vegetação, selecionou quatro estirpes para serem usadas a campo. As quatro estirpes foram *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Burkholderia sp.* e *B. tropica*, as quais foram utilizadas para compor o inoculante misto. O sorgo granífero foi beneficiado pela mistura de estirpes e as melhores respostas foram observadas nas menores doses de N. No sorgo forrageiro houve uma tendência não significativa dos

componentes de produção serem superiores sem adubação nitrogenada, e nas doses de 90 e 120 kg N ha⁻¹, quando inoculados. E por fim, o sorgo sacarino não respondeu à inoculação com a mistura de estirpes.

3 CAPÍTULO I

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS
À CULTURA DO SORGO EM DIFERENTES BIOMAS
BRASILEIROS**

RESUMO

SOUSA, F.G. **Diversidade de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal associadas à cultura do sorgo em diferentes biomas brasileiros.** Vitória da Conquista – BA: UESB, 2017. (Tese – Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia)

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é o quarto cereal mais produzido no Brasil, porém, estudos da associação com bactérias diazotróficas são escassos. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a diversidade de bactérias diazotróficas associadas à cultura do sorgo forrageiro e sacarino nos biomas Caatinga, Mata Atlântica e Floresta Amazônica. O isolamento dos diazotrofos foi realizado utilizando cinco meios de cultivo semissólidos, NFB, JNFb, JMV, LGI e LGI-P. Os 73 isolados obtidos foram agrupados pela análise de BOX-PCR e posteriormente, as estirpes representativas foram identificadas pela análise dos genes 16S rRNA e *housekeeping recA*. A característica molecular de fixação de nitrogênio foi identificada pelo sequenciamento do gene *nifH*. A análise de síntese de compostos indólicos foi realizada em todos os isolados. A população de diazotróficos variou de 10^2 a 10^7 por grama de tecido fresco nas raízes e foi de 10^2 na parte aérea do sorgo. A maior população de diazotrofos foi constatada no bioma Mata Atlântica. A análise de BOX-PCR permitiu reduzir em mais de 50% as estirpes para análise dos genes 16S rRNA, *nifH* e *recA*. O sequenciamento do gene 16S rRNA confirmaram a presença dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas* e revelaram a ocorrência pela primeira vez de *A. formosense*, *A. zaeae*, *A. melinis*, *B. aerius* e *S. pavanii* em plantas de sorgo. O gene *nifH* foi detectado em mais de 80% dos isolados bacterianos. Todas as estirpes bacterianas apresentaram síntese de compostos indólicos nos tempos de 24 e 48 h, exceto para a estirpe N17 (*S. pavanii*). A maior população de bactérias diazotróficas foi observada no bioma Mata Atlântica. Nas raízes dos genótipos de sorgo encontra-se a maior população de diazotrofos. O bioma Floresta Amazônica apresenta a maior diversidade de bactérias diazotróficas e o bioma Mata Atlântica a maior riqueza de espécies. A biossíntese de compostos indólicos pelos diazotrofos associados à cultura do sorgo demonstra potencial biotecnológico para uso como biofertilizantes.

Palavras-chave: auxina, BOX-PCR, DNA, fixação biológica de nitrogênio, sustentabilidade.

Orientadora: Vera Lúcia Divan Baldani, *D.Sc.*, UESB e Co-orientador: Joilson Silva Ferreira, *D.Sc.*, UESB

Orientador, Doutorado-Sanduiche: José Ivo Baldani, *D.Sc.*, EMBRAPA-Agrobiologia

ABSTRACT

SOUSA, F.G. **Diversity of plant growth promoting diazotrophic bacteria associated to sorghum culture in different Brazilian biomes.** Vitória da Conquista – BA (Thesis – PhD in Agronomy – Concentration Area in Plant Science)

The Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) is the fourth most produced cereal in Brazil, however, studies of the association with diazotrophic bacteria are scarce. The objective of this study was to evaluate the diversity of diazotrophic bacteria associated to the culture of sweet and forage sorghum in the Caatinga, Atlantic Forest and Amazon Forest biomes. The isolation of diazotrophs was performed using five semi-solid culture media, NFb, JNFb, JMV, LGI and LGI-P. The 73 isolates obtained were grouped by BOX-PCR analysis and later, the representative strains were identified by 16S rRNA gene analysis and the *recA* housekeeping gene. The nitrogen fixation characteristic was identified by the sequencing of the *nifH* gene. The analysis of the synthesis of indole compounds was performed in all isolates. The population of diazotrophs varied from 10^2 to 10^7 per gram of fresh tissue in the roots and was 10^2 in the shoot of the sorghum. The largest population of diazotrophs was detected in the Atlantic Forest biome. The BOX-PCR analysis allowed to reduce in more than 50% the strains for analysis of 16S rRNA, *nifH* and *recA* genes. Sequencing of the 16S rRNA gene confirmed the presence of the *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Bacillus* and *Stenotrophomonas*, genus and first occurrence of *A. formosense*, *A. zaeae*, *A. melinis*, *B. aerius* and *S. pavanii* in a sorghum plant. The *nifH* gene was detected in more than 80% of the bacterial isolates. All bacterial strains showed synthesis of indole compounds at times of 24 and 48 h, except for strain N17 (*S. pavanii*). The largest population of diazotrophic bacteria was observed in the Atlantic Forest biome. In the roots of sorghum genotypes is the largest population of diazotrophs. The Amazon Forest biome presents the greatest diversity of diazotrophic bacteria and the Atlantic Forest biome the greatest species richness. The biosynthesis of indole compounds by diazotrophs associated with sorghum culture demonstrates biotechnological potential for use as biofertilizers.

Key-words: auxin, biological fixation of nitrogen, BOX-PCR, DNA, nitrogen, sustainability.

1 INTRODUÇÃO

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é o quarto cereal mais produzido no Brasil (IBGE, 2016), em virtude, principalmente, da sua diversidade genotípica, com a finalidade de produzir grãos, forragem, silagem, etanol e biomassa, sendo cultivado em todos os biomas brasileiros. De acordo com Andrade Neto et al. (2010), o sorgo é uma planta de origem tropical com boa capacidade fotossintética, adaptadas às mais variadas condições de fertilidade do solo, sendo mais tolerante que o milho a altas temperaturas e déficit hídrico, razão pela qual é cultivado em ampla faixa de latitudes, mesmo em regiões com temperaturas elevadas, secas ou onde ocorrem veranicos.

O sorgo, como a maioria das culturas anuais, requer grande quantidade de nitrogênio (N), exigindo 15,7 kg de N para cada Megagrama (Mg) de matéria seca (MS) produzida no sorgo forrageiro (FRANCO, 2011); 8,4 a 10 kg de N para cada Mg de MS no sorgo sacarino (SOARES et al., 2014); 7,6 kg de N para cada Mg de MS no sorgo biomassa (SANTOS et al., 2014) e 17 kg de N para cada Mg de grãos produzido no sorgo granífero (CANTARELLA et al., 1996).

Apesar da adaptabilidade do sorgo às diversas condições edafoclimáticas, existe uma alta demanda de fertilizantes nitrogenados para que a cultura atinja rendimentos que permitam a viabilidade econômica da sua produção agrícola. Entretanto, a adição dos adubos nitrogenados afeta negativamente o balanço energético no cultivo do sorgo, sendo essencial o uso de fontes de N não poluentes, como o uso de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal.

As bactérias diazotróficas são consideradas promotoras do crescimento de plantas em virtude de poderem estimular a capacidade de fixação biológica do nitrogênio (FBN), incremento na atividade da redutase do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas, síntese de hormônios, solubilização de

fosfato e, ainda, por atuarem como controle biológico de patógenos. Segundo Dobbela et al. (2003), as bactérias diazotróficas promotoras do crescimento de plantas combina todos esses mecanismos.

Estudos da interação das bactérias diazotróficas estão avançados em gramíneas como o milho, a cana-de-açúcar, o arroz e o trigo. Entretanto, a cultura do sorgo, que apresenta uma alta versatilidade na produção agrícola (grãos, forragem, silagem, etanol e biomassa), bem como maior adaptabilidade ao déficit hídrico, conferindo maior possibilidade de sucesso no cultivo em safrinha e em regiões semiáridas, ainda demanda maiores investigações sobre a interface bactéria-planta.

O estudo da associação e do efeito das bactérias diazotróficas com as plantas de sorgo é documentado por vários pesquisadores desde a década de 1970 (DÖBEREINER e DAY, 1976; KUMARI et al., 1976; PEDERSEN et al., 1978), quando os isolados testados foram identificados como *Azospirillum* spp. (KUMARI et al., 1976; KAPULNIK et al., 1981; PAL e MALIK, 1981; LIN et al., 1983; BALDANI, 1984; SMITH et al., 1984; BALDANI et al., 1986a; ALEXANDER, e ZUBERER, 1988), *Azospirillum* spp. e fungo micorrízico arbuscular (FAM) *Glomus* spp. (PACOVSKY, 1988; PACOVSKY, 1989), *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum seropedicae* (PEREIRA et al., 1988), *Gluconacetobacter diazotrophicus* e FAM *Glomus* spp. (PAULA et al., 1991; ADRIANO-ANAYA et al., 2006), *Azoarcus* sp. BH72 (STEIN et al., 1997), *Herbaspirillum* sp. (PIMENTEL et al., 1991; JAMES et al., 1997), *Paenibacillus* spp. (COELHO et al., 2009), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (LUNA et al., 2010), *Gluconacetobacter diazotrophicus* e FAM (MEENAKSHISUNDARAM e SANTHAGURU, 2010), *Burkholderia* (WONG-VILLARREAL et al., 2012), *Mycobacterium senegalense* e *Bacillus firmus* (RUPAEDAH et al., 2014).

Mareque et al. (2014), isolaram bactérias de diversos gêneros (*Pantoea*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Herbaspirillum*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Chrysobacterium*, *Kocuria*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Bacillus* e *Staphylococcus*), associadas com o sorgo sacarino com a prospecção para a promoção de crescimento vegetal, e obtiveram duas estirpes promissoras, a *Rhizobium* e a *Pantoea*.

Atualmente, no Brasil, poucos estudos têm sido reportados à associação de bactérias diazotróficas com a cultura do sorgo. Bergamaschi et al. (2007) isolaram bactérias diazotróficas de 14 cultivares de sorgo forrageiro no Rio Grande do Sul, e identificaram três estirpes bacterianas, provavelmente dos gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Burkholderia*. Entretanto, houve diferença na colonização das bactérias em relação aos genótipos, demonstrando especificidade na interação planta e bactéria. Santos (2010), estudando a inoculação de bactérias diazotróficas em sorgo granífero, forrageiro e sacarino, em casa de vegetação, selecionou quatro estirpes (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Burkholderia sp.* e *B. tropica*) para serem usadas a campo.

Diante desse contexto, é imprescindível avaliar a diversidade de bactérias diazotróficas em diferentes biomas brasileiros e genótipos de sorgo, para a obtenção de estirpes promissoras para a cultura. O objetivo foi avaliar a diversidade e síntese de AIA de bactérias diazotróficas na cultura do sorgo forrageiro e sacarino nos biomas Caatinga, Mata Atlântica e Floresta Amazônica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização geográfica e edáfica das áreas experimentais

O experimento foi conduzido inicialmente em casa de vegetação instalada na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* de Vitória da Conquista. Foram coletados solos de três biomas brasileiros, nos municípios de Vitória da Conquista-BA (Caatinga), Uruçuca-BA (Mata Atlântica) e Colorado do Oeste-RO (Floresta Amazônica). A caracterização geoclimática dos municípios está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 Caracterização geoclimática das localidades onde foram coletados os solos.

Bioma	Localidade	Coordenadas	Altitude	Clima¹
Caatinga	Vitória da Conquista-BA	14°52'39"S; 40°47'41"W	886 m	Cwa
Mata Atlântica	Uruçuca-BA	14°35'07"S; 39°16'27"W	79 m	Af
Floresta Amazônica	Colorado do Oeste-RO	13°07'37"S; 60°29'05"W	408 m	Aw
	Solo²	Temperatura média	Precipitação	
Caatinga	LATOSSOLO Amarelo distrófico	20,2°C	734 mm	
Mata Atlântica	ARGISSOLO Vermelho Amarelo eutrófico	24,2°C	1585 mm	
Floresta Amazônica	ARGISSOLO Vermelho eutrófico	24,0°C	1900 mm	

¹Classificação climática de Köppen. ²SANTOS et al. (2013).

Os solos coletados nas três áreas experimentais, na profundidade de 0-20 cm, foram analisados quanto aos seus atributos físico-químicos. Os resultados das análises físico-químicas estão demonstrados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 Composição granulométrica das amostras de solos coletados nas áreas experimentais.

Bioma	Composição granulométrica (TFSA* g kg ⁻¹)				Classe textural
	Areia grossa 2,0-0,2 mm	Areia fina 0,20-0,05 mm	Silte 0,05-0,002 mm	Argila <0,002 mm	
Caatinga	700	95	15	190	Franco Arenosa
Mata Atlântica	190	230	320	260	Franca
Floresta Amazônica	200	246	131	423	Argilosa

*TFSA= Terra fina seca ao ar.

Tabela 3 Composição química dos solos coletados nas áreas experimentais.

Bioma	pH	P	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H ⁺	SB ¹	T ²	V ³	MO ⁴
	(H ₂ O)	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³ de solo						(%)	g dm ⁻³	
Caatinga	5,4	3	0,28	2,2	1,2	0,0	1,7	3,7	5,4	68	14
Mata Atlântica	7,0	250	0,51	9,3	5,4	0,0	1,4	15,3	16,7	92	23
Floresta Amazônica	6,5	3,9	0,36	8,6	0,96	0,0	2,5	10,0	12,5	80	33

¹Soma de bases trocáveis; ²CTC a pH 7,0; ³V= Saturação de bases; ⁴MO=Matéria orgânica.

2.2 Genótipos de sorgo e isolamento das bactérias diazotróficas

Os genótipos de sorgo utilizados para o isolamento das bactérias diazotróficas foram o sorgo forrageiro Volumax e o sorgo sacarino BRS 511. O sorgo forrageiro Volumax (híbrido AGX-213), apresenta ciclo semiprecoce, porte alto, sem tanino nos grãos e ensilagem com 110 dias. O sorgo sacarino

BRS 511, com ciclo de 100-120 dias, atinge altura de 300 cm, com rendimento de colmo de até 80 Mg ha⁻¹.

Os genótipos foram cultivados em solos das três áreas experimentais (Vitória da Conquista-BA, Uruçuca-BA e Colorado do Oeste-RO). Os solos coletados nas áreas experimentais foram peneirados e acondicionados em cinco vasos para cada cultivar de sorgo, totalizando 10 vasos por bioma. Após o enchimento dos vasilhames foi efetuada a semeadura com seis sementes por vaso. Aos 10 dias após a emergência (DAE), foi realizado o desbaste das plantas, permanecendo apenas uma planta por vaso. Depois de 45 DAE, as plantas foram colhidas e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia da UESB, *campus* Vitória da Conquista para o isolamento das bactérias diazotróficas.

O isolamento aconteceu conforme duas metodologias, uma convencional, descrita por Döbereiner et al. (1995) e Baldani et al. (2014); e outra, modificada por Bergamaschi (2006), utilizando 300 µL de solução das diluições do tecido vegetal para inoculação nos frascos contendo os meios semissólidos. Os meios utilizados para o isolamento foram o NFb (BALDANI e DÖBEREINER, 1980), JNFb, LGI (DÖBEREINER et al., 1995), JMV (BALDANI, 1996) e LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995), com o intuito de obter isolados bacterianos de espécies como *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp. e *Gluconacetobacter* spp.

As plantas foram lavadas em água corrente e, logo em seguida, com três lavagens sucessivas com água destilada. Então, foram seccionadas em parte aérea (colmo e folhas) e raiz. Para cada parte vegetal (parte aérea e raiz) foram pesados 10 g, sendo maceradas separadamente em liquidificador contendo 90 mL de solução salina. A solução (tecido vegetal e solução salina) foi peneirada e inoculada (1 mL) em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina (triplicata), em diluição seriada de 10⁻² a 10⁻⁷. Alíquotas de 100 µL e 300 µL de

cada diluição, em triplicata, foram inoculadas em frascos contendo 5 mL dos meios de cultura semissólidos (NFb, JNFb, LGI, JMV e LGI-P). Os frascos foram alocados em câmara incubadora tipo B.O.D. a 30°C, sem luminosidade. Após cinco dias, foi verificado a presença ou não da formação de película característica na superfície dos meios de cultivo. O método utilizado para a contagem de bactérias foi o Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady, conforme descrito por Döbereiner et al. (1995).

As películas formadas foram repicadas e transferidas com auxílio de alça de platina para novos frascos contendo os meios semissólidos respectivos. Esse processo foi realizado quatro vezes consecutivas. Na quarta repicagem, foi retirada uma alíquota das películas e as mesmas foram estriadas em placas contendo meio sólido correspondente. Em seguida, as placas foram alocadas em câmara de incubação por um período de sete dias, a 30°C e sem luz. Assim, as colônias isoladas e diferentes, em cada placa, foram demarcadas e transferidas para um frasco contendo meio semissólido correlato. Após a confirmação do crescimento (formação de película), uma alíquota foi estriada em placa contendo meio específico e confirmado a pureza das colônias, foi riscada em placa contendo meio batata. Confirmando a pureza das colônias, foram, então, estocadas em frascos contendo meio específico inclinado, imersas em óleo mineral e em tubos com glicerol 50%, armazenados em temperatura ambiente e em temperatura -20°C, respectivamente. O fluxograma de isolamento das estirpes bacterianas diazotróficas está representado na Figura 1.

O experimento de quantificação de população de bactérias diazotróficas (NMP) foi esquematizado em delineamento inteiramente casualizados, em esquema fatorial quádruplo 3x2x2x2x4 (bioma, genótipo, alíquota, tecido e meios, respectivamente) totalizando 96 combinações, com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância; posteriormente, as interações, ao teste de agrupamento de médias Scott-Knott; e os fatores isolados, ao teste

Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011).

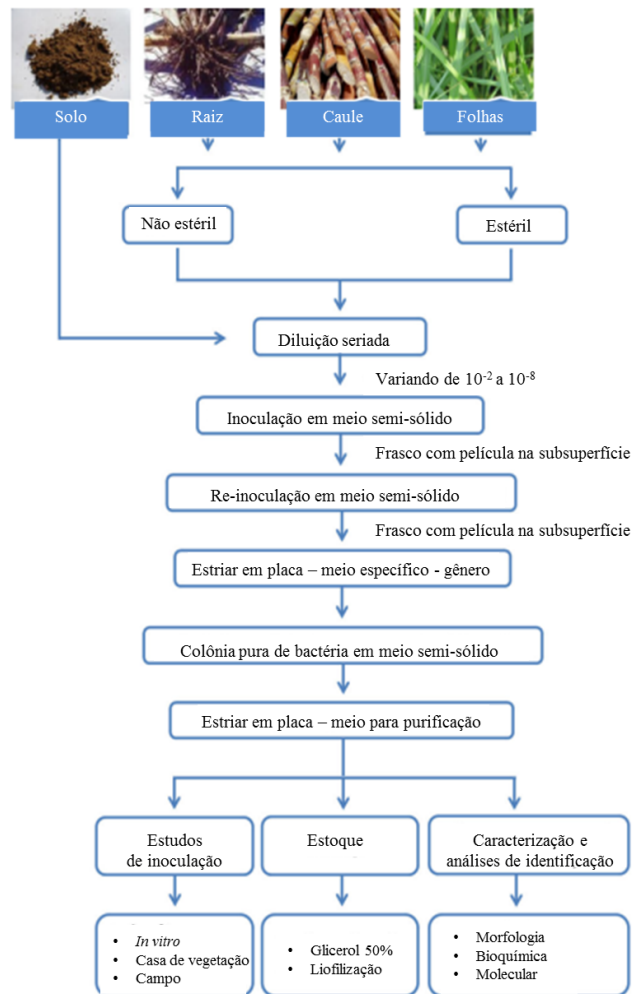


Figura 1 Diagrama de todas as etapas aplicadas para contar e isolar as bactérias diazotróficas livres, associativas e endofíticas (BALDANI et al., 2014).

2.3 Caracterização fenotípica de bactérias diazotróficas

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio sólido para avaliação da caracterização fenotípica. Aos sete dias de cultivo foram avaliadas quanto a: tamanho, cor, forma, elevação, borda, superfície, crescimento, produção de muco e detalhes ópticos (YANO et al., 1993). As colônias foram observadas em estereomicroscópio binocular Stemi 2000-C, com AxioCam ERc5s (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

2.4 Caracterização molecular de bactérias diazotróficas

A caracterização molecular e funcional das estirpes bacterianas foi realizada nos Laboratórios de Genética e Bioquímica, Gramíneas e de Biologia Molecular do Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (EMBRAPA Agrobiologia), em Seropédica – RJ.

2.4.1 Extração de DNA de bactérias diazotróficas

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio DYGS, que apresenta a seguinte composição em $g L^{-1}$: glicose, 2,0; peptona, 1,5; extrato de levedura, 2,0; ácido málico, 2,0; K_2HPO_4 , 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 e ácido glutâmico, 1,5; pH 6,0 (RODRIGUES NETO et al., 1986). Após 24 h, sob temperatura de 30°C, 1 mL de suspensão bacteriana foi centrifugado na rotação de 16.000 g por 2 minutos e a extração foi efetuada com *Wizard genomic DNA purification kit* (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante para bactérias gram negativas. A qualidade do DNA genômico total foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 1% durante 1 hora e voltagem de 90 V. A quantidade do DNA genômico total foi aferida com base em 1 μL por amostra,

em espectrofotômetro Nanodrop® 3300 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA).

2.4.2 Análise de BOX-PCR de bactérias diazotróficas

A diversidade genotípica foi realizada utilizando a análise de BOX-PCR. As reações de PCR foram realizadas com o iniciador BOX A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (VERSALOVIC et al., 1994), conforme descrito por Kaschuk et al. (2006). Cada reação de amplificação foi realizada com um volume final de 25 µL, contendo 50 ng de DNA genômico; tampão 1X; 3,0 mM de MgCl₂; 0,3 mM de cada DNTP; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase e 1 µM do iniciador BOX A1R. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler® gradiente (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), programado para realizar uma desnaturação inicial 94°C, por 7 min.; seguido de 30 ciclos, a 94°C, por 1 min.; a 53°C, por 1 min.; a 65°C, por 8 min.; e uma extensão final a 65°C, por 16 min. Em seguida, ao término da reação, 12 µL de produto PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, a uma voltagem de 100 V por 4 horas e 30 min em tampão TAE novo. Então, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador KODAK Gel Logic Cabinet 100 (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA). As imagens foram capturadas, arquivadas como documentos do tipo JPG e processadas pelo programa GelCompar II versão 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). As matrizes de similaridade foram calculadas pelo coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912) e o agrupamento de matrizes de similaridade utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (SNEATH e SOKAL, 1973). Foram consideradas da mesma espécie estirpes bacterianas com 70% de similaridade do *fingerprint*. Uma estirpe de cada grupo foi selecionada para

identificação taxonômica por meio do sequenciamento dos genes 16S rRNA, *nifH* e *recA*.

2.4.3 Amplificação do gene 16S rRNA de bactérias diazotróficas

Para amplificação do fragmento do gene 16S rRNA, foi utilizada a combinação dos iniciadores 27F (5'-AGA GTT TA TCC TG CTC AG-3') (FURUSHITA et al., 2003) e Amp2 (5'-AAG GAG GT ATC CAR CCG CA-3') (WANG et al., 1996). Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo 50 ng de DNA genômico; tampão 1X; 3,0 mM de MgCl₂; 0,3 mM de cada dNTP; 1,5 U de *Taq* DNA polimerase e 0,2 µM de cada iniciador. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler® gradiente (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), programado para realizar uma desnaturação inicial de 94°C, por 3 min.; seguido de 30 ciclos, a 94°C, por 1 min.; 60°C, por 1 min; e a 72°C, por 1 min e 30 s; e uma extensão final a 72°C, por 5 min. Em seguida ao término da reação, 5 µL de produto de reação em cadeia de polimerase (PCR) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a uma voltagem de 100 V, por 1 h e 30 min, em tampão TAE 1X. Então, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta, em fotodocumentador KODAK Gel Logic Cabinet 100 (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA).

2.4.4 Amplificação do gene *nifH* de bactérias diazotróficas

Para a amplificação de fragmentos do gene *nifH* foi utilizada a combinação dos iniciadores PolF (5'-TC GAY CCS AAR GCB GAC TC-3') e PolR (5'-ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA-3') (POLY et al., 2001). Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo 50

ng de DNA genômico; tampão 1X; 3 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 U de *Taq* DNA polimerase e 0,2 μM de cada iniciador. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler® gradiente (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), programado para realizar uma desnaturação inicial de 94°C, por 3 min.; seguido de 30 ciclos, a 94°C, por 1 min; 56°C, por 45 s; e 72°C por 45 s e uma extensão final a 72°C, por 5 min. Após o término da reação, 5 μL de produto de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% a uma voltagem de 100 V por 1,5 h em tampão TAE 1X. Então, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 μg mL⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador KODAK Gel Logic Cabinet 100 (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA).

2.4.5 Amplificação do gene *housekeeping recA* de bactérias diazotróficas

Para a amplificação do fragmento do gene *housekeeping recA*, foi utilizada a combinação dos iniciadores 41F (5'-TTC GGC AAG GGM TCG RTS ATG-3') e 640R (5'-ACA TSA CRC CGA TCT TCA TGC-3') (VINUESA et al., 2005). Cada reação de amplificação foi realizada para atingir um volume final de 50 μL, contendo 50 ng de DNA genômico; tampão 1X; 1,75 mM de MgCl₂; 0,25 mM de cada dNTP; 1,75 U de *Taq* DNA polimerase e 0,8 μM de cada iniciador. As reações de amplificação foram organizadas para realizar uma desnaturação inicial de 94°C, por 5 min.; seguido de 35 ciclos, a 94°C, por 1 min.; 56°C, por 1 min; 72°C, por 2 min e uma extensão final a 72°C, por 10 min. Em seguida ao término da reação, submeteram-se 5 μL de produto de PCR a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a uma voltagem de 100 volts, por 1 hora e 30 minutos em tampão TAE 1X. Então, corou-se o gel em solução de brometo de etídeo (0,5 μg mL⁻¹), o qual foi visualizado sob luz ultravioleta

em fotodocumentador KODAK Gel Logic Cabinet 100 (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA).

2.4.6 Sequenciamento e análise de similaridade de bactérias de diazotróficas

Os produtos de PCR foram distribuídos em duas alíquotas, uma de 2 μL e outra de 10 μL , em tubos de 500 μL de parede ultrafina. A alíquota de 2 μL foi quantificada no fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, EUA). As concentrações das amostras foram no mínimo de 15 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. A alíquota de 10 μL foi destinada para purificação enzimática utilizando as enzimas EXO I 20 U μL^{-1} (EN581, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e FastAp 1U μL^{-1} (EF0651, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). As amostras foram aquecidas a 37°C, por 15 min e, em seguida a 85°C, por 20 min. Após a quantificação e tratamento com as enzimas, as amostragens seguiram para a reação de marcação.

As amplificações para o sequenciamento dos fragmentos dos genes 16S rRNA e *nifH* foram realizadas em microplacas de 96 poços, utilizando os mesmos iniciadores descritos nas reações anteriores. Na microplaca, utilizou-se um poço para adicionar a reação controle pGEM. A reação controle de pGEM foi composta por 2 μL de pGEM (200 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$); 4 μL de M13 (0,8 $\mu\text{moles } \mu\text{L}^{-1}$); 1,5 μL de água de PCR, 1,5 μL DE tampão 5X e 1,0 μL de Big Dye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 10 μL , contendo 1 μL de iniciador (5 μM); 1 μL de Big Dye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido); 1,5 μL de tampão 5X e 50-100 ng do produto de PCR. As reações de amplificação aconteceram em termociclador, programado

para efetuar uma desnaturação inicial de 96°C por 1 min; seguido de 35 ciclos a 96°C por 15 seg; 50°C por 15 seg e 60°C por 4 min.

Após a reação, foi efetuada uma purificação pós-reação, adicionando-se 1 µL de EDTA 125 mM, 1 µL de acetato de sódio 3 M e 25 µL de etanol absoluto. Então, as placas foram seladas e misturadas por inversão, quatro vezes sucessivas, e mantidas no escuro por 15 min, em temperatura ambiente. Em seguida, centrifugadas por 30 min a 3000 g e as placas invertidas foram submetidas a um *spin* 150 g, adicionando-se 35 µL de etanol 70%. As placas foram centrifugadas a 1650 g, por 15 min, em temperatura ambiente e mais uma vez submetidas a *spin* invertido. Enfim, as placas foram alocadas em ambiente sem luminosidade por no mínimo 1 h e ressuspendidas em 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), para injeção no ABI 3500xL Genetic Analyzers (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). O sequenciamento foi obtido após 48 h. As sequências obtidas seguiram-se para edição no programa Chromas 2.5.1 (Tecnelysium Pty Ltd, Australia). O consenso entre as sequências dos iniciadores do 16S rRNA foi realizado no programa Staden Package 2.0 (STADEN et al., 2003). Após a edição das sequências, foram submetidas ao programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1997), para comparação com sequências similares depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As árvores filogenéticas foram construídas com base nos fragmentos do gene 16S rRNA (~1450 pb), *nifH* (~350 pb) e *recA* (~550 pb). As sequências selecionadas no formato FASTA foram processadas no programa MEGA 7 (KUMAR et al., 2016), e a árvore consenso construída pelo método de filogenia Neighbor-Joining e o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2- parameter model, considerando um *bootstrap* de 1.000 repetições.

2.5 Índices de diversidade de bactérias diazotróficas

Após a identificação genética dos isolados bacterianos determinaram-se os índices de diversidade, em função dos biomas e dos genótipos de sorgo. A diversidade de espécies foi determinada utilizando o programa PAST - *Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis* (HAMMER et al., 2001), mediante o cálculo dos seguintes índices: índice de diversidade de Shannon-Weaver ($H' = - \sum p_i \ln p_i$), onde p_i é o número de indivíduos de uma dada espécie, dividido pelo número total de espécies observadas; índice de dominância de Simpson ($D = \sum [n_i(n_i-1)/N(N-1)]$), onde n_i é o número de indivíduos de uma espécie e N é o número total de indivíduos observados; índice de equabilidade de Pielou ($J = H'/\ln S$), onde H' é o índice de Shannon-Weaver e S , o número total de espécies amostradas.

2.6 Síntese de compostos indólicos de bactérias diazotróficas

As estirpes bacterianas isoladas do sorgo foram analisadas quanto à síntese de compostos indólicos conforme o método de microplaca proposto por Sarwar e Kremer (1995). Cada isolado bacteriano foi cultivado em três tubos contendo 5 mL de DYGS líquido por 24 h, sob temperatura de 30°C, sem luz. Logo após, uma alíquota de 20 µL de cada tubo foi transferida para outro tubo contendo meio DYGS líquido, acrescido com L-triptofano (100 µg mL⁻¹), e também foram submetidos à agitação de 150 rpm por um período de 24 h, em ambiente sem luminosidade a 30°C. Então, alíquotas de 1 mL de cada tubo foram retiradas nos tempos de 24 e 48 h de crescimento bacteriano e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos.

Em seguida à centrifugação, 150 μL do sobrenadante de cada amostra foram adicionados em um poço de microplaca (96 poços) mesclado a 100 μL do reagente de Salkowski (1 mL de 0,5 M FeCl_3 em 49 mL de ácido perclórico 35%). As amostras foram alocadas no escuro, por 30 min, sob temperatura ambiente e em seguida, efetuou-se leitura de absorvância com um comprimento de onda de 540 nm em leitor de microplaca Anthos Zenyth 200 rt (Biochrom, Cambridge, EUA). A concentração dos compostos indólicos foi estimada utilizando uma curva padrão previamente preparada com soluções de 5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido 3-indol-acético.

Para normalizar os valores obtidos da síntese de compostos indólicos, o conteúdo de proteínas foi determinado conforme descrito por Bradford (1976). As células centrifugadas foram então ressuspensas em 1 mL de meio DYGS líquido, e alíquotas de 100 μL dessa suspensão foram adicionadas em tubos contendo 100 μL de NaOH 1M e mantidas por 30 min em temperatura ambiente. Então, 25 μL desta solução foram adicionadas a um poço de microplaca, o qual foi acrescido, posteriormente, de 225 μL de solução de Bradford. A microplaca com 96 poços foi incubada por 30 min a 37°C. As leituras de absorvância foram efetuadas em leitor de microplaca Biochrom Anthos Zenyth 200 rt com comprimento de onda de 595 nm.

A concentração de proteína (PTN) foi determinada utilizando uma curva padrão previamente preparada com quantidades de 0,25 a 1,5 $\mu\text{g uL}^{-1}$ de albumina de soro bovino (BSA). Os dados foram submetidos à análise de variância e submetidos ao teste de agrupamento de médias Scott-Knott ($p < 5\%$). Os desdobramentos foram analisados pelo teste Tukey ($p < 5\%$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e população de bactérias diazotróficas

Houve formação de película característica nos meios semissólidos NFb, JNFb, LGI e JMV na parte aérea e raiz de sorgo forrageiro e sacarino, demonstrando a presença de bactérias diazotróficas. Não houve formação de películas no meio LGI-P, apresentando a ausência de microrganismos bacterianos do gênero *Gluconacetobacter* nestes dois genótipos de sorgo. O tamanho da população de bactérias colonizando as raízes variou de 10^2 a 10^7 , enquanto na parte aérea foi de 10^2 por grama de tecido fresco. Foram constatadas diferenças significativas para a população bacteriana diazotróficas em função dos biomas, alíquotas, meios e tecidos vegetais testados, com exceção dos genótipos (Tabelas 4 e 5).

O isolamento de bactérias possibilitou a obtenção de 73 estirpes. O bioma Mata Atlântica apresentou maior número de população bacteriana em relação à Floresta Amazônica e similar à Caatinga (Tabela 5). Esses resultados conferiram o maior número de isolados bacterianos consecutivamente na Mata Atlântica (33), Caatinga (27) e Floresta Amazônica (13). O maior teor de MO no solo da Floresta Amazônica (Tabela 3) não possibilitou o maior número de isolados em comparação com os solos dos outros biomas.

Conforme Rudnick et al. (1997), a FBN é um processo regulado pela necessidade do ambiente e das espécies fixadoras, pois, a enzima nitrogenase, responsável pela redução do N_2 é inativada, quando submetida à presença de amônio. Assim, Moreira et al. (2010) descreveram que em áreas não perturbadas, com vegetação clímax, esse processo biológico é pouco estimulado, pois a ciclagem eficiente garante a manutenção do metabolismo e da taxa de crescimento.

Já em regiões degradadas com solos e substratos pobres ou desprovidos de MO como os de áreas mineradas, a FBN pode ser estimulada. Nesse sentido, a FBN em ambientes não perturbados como o do solo coletado no bioma Floresta Amazônica, poderiam estar com a atividade reduzida. A maior diversidade de bactérias neste bioma (Tabela 7) pode ter favorecido a competição entre as espécies, o que dificultou o isolamento nos meios semissólidos.

O maior número de isolados diazotróficos no bioma Mata Atlântica pode ter sido beneficiado por ser um solo em uso agrícola (alterado), estimulando o processo de FBN. Aliado a essa condição, o solo de Mata Atlântica apresentou um alto teor de P (Tabela 3), em virtude de fertilização fosfatada.

O P, como relatado na literatura, incrementa o número de pelos radiculares, proporcionando mais sítios de infecção para os diazotrofos, além de contribuir para a síntese de adenosina trifosfato (ATP), essencial no funcionamento da enzima nitrogenase, essencial na FBN. O P é um nutriente essencial às plantas, participando como componente estrutural dos ácidos nucléicos, fosfolipídios, ATP, sendo um elemento chave de vias metabólicas, bioquímicas e particularmente importante para a FBN (RICHARDSON e SIMPSON, 2011). Entretanto, de acordo com Marschner et al. (2001), a importância relativa do tipo de solo sobre a estrutura da comunidade microbiana continua uma questão difícil e nenhum princípio geral emergiu ainda. Assim, comparações de diferentes solos requerem consideração de muitas variáveis, incluindo diferenças entre nutrientes minerais, textura do solo, pH, matéria orgânica, estrutura física e históricos de manejo.

Tabela 4 - População de bactérias diazotróficas isoladas de dois genótipos de sorgo em três biomas brasileiros.

Bioma	Número mais provável (log do número de bactérias por grama de tecido fresco)								Total de isolados
	Sorgo Forrageiro (Raiz)				Sorgo Sacarino (Raiz)				
	0,1 mL				0,1 mL				
	NFb	JNFb	LGI	JMV	NFb	JNFb	LGI	JMV	
Caatinga	3,50aA	3,50bA	2,48bB	2,60bB	3,18aA	2,96bA	2,60aB	2,48bB	06
Mata Atlântica	3,65aA	3,88bA	3,05aB	3,30aB	2,95aB	3,65aA	2,85aB	3,30aA	23
Floresta Amazônica	3,40aB	4,40aA	2,48bC	2,48bC	3,40aA	2,60bC	2,95aB	2,48bC	03
Bioma	Sorgo Forrageiro (Raiz)				Sorgo Sacarino (Raiz)				Total de isolados
	0,3 mL				0,3 mL				
	NFb	JNFb	LGI	JMV	NFb	JNFb	LGI	JMV	
	Caatinga	3,98aA	3,66aA	2,95bB	2,48aC	4,45aA	4,12aA	3,07bB	
Mata Atlântica	2,95bA	2,48bA	2,72bA	2,80aA	4,35aA	4,88aA	5,13aB	4,13aB	10
Floresta Amazônica	4,13aA	3,95aA	4,40aA	2,48aB	3,71bA	3,08bA	3,43bA	2,48bB	10
Bioma	Sorgo Forrageiro (Parte Aérea)				Sorgo Sacarino (Parte Aérea)				Total de isolados
	0,1 mL				0,1 mL				
	NFb	JNFb	LGI	JMV	NFb	JNFb	LGI	JMV	
	Caatinga	2,95aA	2,95aA	2,48aB	2,48aB	2,48aA	2,48aA	2,48aA	
Mata Atlântica	2,95aA	2,48bB	2,48aB	2,48aB	2,60aA	2,60aA	2,60aA	2,48aA	0
Floresta Amazônica	2,48bA	2,48bA	2,48aA	2,48aA	2,48aA	2,48aA	2,48aA	2,48aA	0
Bioma	Sorgo Forrageiro (Parte Aérea)				Sorgo Sacarino (Parte Aérea)				Total de isolados
	0,3 mL				0,3 mL				
	NFb	JNFb	LGI	JMV	NFb	JNFb	LGI	JMV	
	Caatinga	3,40aA	2,95aB	2,48aC	2,48aC	2,48bA	2,48aA	2,48bA	
Mata Atlântica	2,48bA	2,48bA	2,48aA	2,51aA	3,08aA	2,48aB	3,08aA	2,48aB	0
Floresta Amazônica	2,48bA	2,48bA	2,48aA	2,48aA	2,48bA	2,48aA	2,48bA	2,48aA	0
Total de isolados	03	10	14	07	14	16	06	03	73

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas por letras minúsculas separam os biomas dentro de cada tipo de sorgo, alíquota e meio de cultivo (coluna). Médias seguidas por letras maiúsculas separam os meios dentro de cada tipo de sorgo, alíquota e bioma (linha). Os coeficientes de variação para o desdobramento dos biomas e meios foram 8,07% e 9,15% respectivamente.

Os genótipos não influenciaram a população de bactérias diazotróficas e o quantitativo de isolados (Tabela 5).

Este fato demonstra que, possivelmente, não há uma alteração significativa na exsudação de substâncias pelas raízes entre os genótipos, embora o sorgo sacarino apresente colmos suculentos com altos teores de açúcares fermentescíveis. Esta característica similar à cana-de-açúcar não possibilitou o isolamento de bactérias do gênero *Gluconacetobacter*.

Tabela 5 - Desdobramento do número mais provável (log do número de bactérias por grama de tecido fresco) e número de isolados.

	Bioma			Genótipo		Alíquota	
	Caatinga	Mata Atlântica	Floresta Amazônica	Forrageiro	Sacarino	0,1 mL	0,3 mL
NMP	2,89ab	3,05a	2,86b	2,91 ^a	2,95a	2,82b	3,05 ^a
Total de isolados	27	33	13	35	38	39	34
CV(%)	21,92			22,07		21,73	
	Meios				Tecido		
	NFb	JNFb	LGI	JMV	Raiz	Parte Aérea	
NMP	3,16a	3,08ab	2,85bc	2,63c	3,30a	2,51b	
Total de isolados	17	26	20	10	66	07	
CV(%)	20,99				18,21		

Médias seguidas de mesma letra nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a variável bioma foi utilizado 10% de significância. NMP = número mais provável e CV = coeficiente de variação.

De forma geral, a alíquota de 0,3 mL favoreceu o maior crescimento populacional de bactérias diazotróficas, embora, com o número de isolados similares (Tabela 5). O acréscimo inicial na formação de películas nos meios

semissólidos, favorecido pela maior alíquota, não possibilitou a manutenção das mesmas nas repicagens sucessivas.

Aparentemente, microrganismos não diazotróficos foram favorecidos pela síntese de compostos nitrogenados produzidos pelos fixadores de nitrogênio, caracterizado pela formação da película. Posteriormente, em virtude da competitividade interespecífica dos procariontes pelo consumo dos compostos nitrogenados, não foi possível a formação de novas películas pelos microssimbiontes, quando repicadas. Segundo Moreira (1994), mesmo sem adição de N combinado ao meio de cultura, algumas espécies não fixadoras, denominadas *scavengers*, conseguem utilizar, eficientemente, traços de N que geralmente existem nos outros compostos nitrogenados do meio de cultura. Outras bactérias não fixadoras também podem crescer como contaminantes à custa da amônia excretada no meio de cultura pelas bactérias fixadoras de N₂.

Os meios semissólidos foram influenciados pela população de bactérias diazotróficas (Tabela 5). A população de diazotrofos foi maior no meio NFb, em comparação aos meios LGI e JMV, e similar ao meio JNFb. O meio JNFb apresentou população de diazotróficos superior ao meio JMV e similar ao meio LGI. Do total de 73 isolados, 17 foram obtidos do meio NFb (23,3%), 26 do meio JNFb (35,6%), 20 do meio LGI (27,4%) e 10 do meio JMV (13,7%). Os meios NFb e JNFb favoreceram maior isolamento de bactérias nos biomas Caatinga (47,1%) e Floresta Amazônica (41,2%). Dos isolados oriundos do meio LGI, 80% foram provenientes do bioma Mata Atlântica, 20% do bioma Floresta Amazônica e ausentes no bioma Caatinga. Portanto, não foi possível isolar estirpes bacterianas similares à *Azospirillum amazonense* no bioma Caatinga. No meio JMV, 60% dos isolados foram do bioma Caatinga, 30% do bioma Mata Atlântica e 10% no bioma Floresta Amazônica.

Os resultados mostraram que a população de diazotrofos foi superior na raiz, em comparação à detectada na parte aérea, bem como a quantidade de

isolados (Tabela 5). Os diazotrofos nas raízes representaram 90,4% das estirpes isoladas (66) e apenas 9,6% (7) foram correspondentes à parte aérea. Todos os isolados da parte aérea foram obtidos do bioma Caatinga, um do meio JNFb e seis do meio JMV. A colonização das bactérias diazotróficas ocorre, em princípio, no sistema radicular, sinalizada pela liberação dos exsudados. Posteriormente, parte da população bacteriana migra para a parte aérea. Reis Junior et al. (2000) encontraram maior população de bactérias nas raízes de cana-de-açúcar, relatando que esta região é o dreno de fotoassimilados e que estes compostos são utilizados pelas bactérias para sua sobrevivência. Ainda, estes autores descrevem que as bactérias têm dificuldade de translocação para a parte aérea, o que pode justificar o seu maior acúmulo nas raízes. Corroborando com estes resultados, Gomes (2009), avaliando bactérias diazotróficas endofíticas no milho, também encontraram maior população de microrganismos bacterianos nas raízes, justificando que o crescimento radicular implica aumento de substratos de carbono (C) na zona radicular, os quais promovem a proliferação de rizobactérias em face deste ambiente rico em alimento, o que explica, ao menos parcialmente, a maior densidade de bactérias detectadas nas regiões das plantas de milho.

3.2 Caracterização fenotípica das bactérias diazotróficas

Colônias representativas dos grupos fenotípicos das bactérias isoladas estão apresentadas na Figura 2. As estirpes isoladas do meio NFb apresentaram, geralmente, crescimento rápido, forma circular, elevação plana, bordo inteira, superfície lisa, configuração granular, produção de muco escassa e tamanho até 2 mm. Estas características são similares às apresentadas pelos microrganismos bacterianos *A. brasilense* e *A. lipoferum*. As bactérias isoladas do meio JNFb apresentaram características semelhantes às do NFb, entretanto, com o tamanho

menor até 1 mm, e poucas com o centro da colônia azulado. Por isso, a maioria das bactérias não foi do gênero *Herbaspirillum*, apenas as estirpes representadas por J19, J32 e J33. No meio JMV, a maioria apresentou as seguintes características: crescimento rápido, elevação lente, bordo inteira, superfície lisa, configuração granular, pouca produção de muco e tamanho até 3 mm.

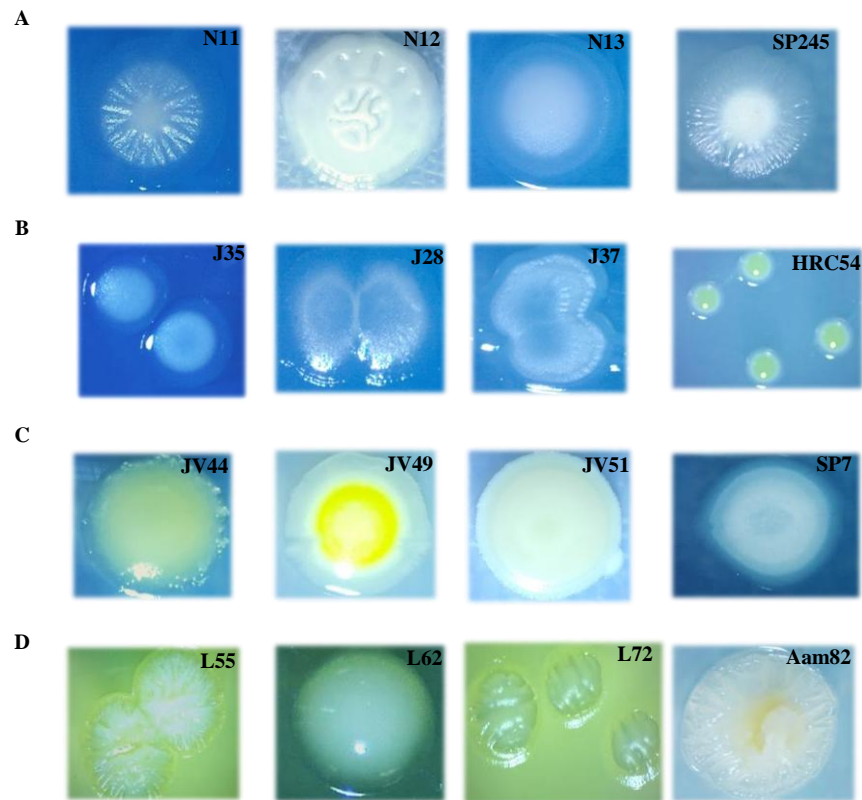


Figura 2 – Colônias representativas dos principais grupos fenotípicos de bactérias isoladas de plantas de sorgo, cultivadas em meio sólido NFb 3x (A e B), JMV (C) e LGI (D). Bactérias tipo: SP245=*A. brasilense*; HRC54 = *H. seropedicae*; Aam82 = *A. amazonense*; SP7 = *A. brasilense*.

Algumas apresentaram produção de muco abundante, uma característica similar às bactérias do gênero *Burkholderia*, no entanto, na caracterização molecular foram identificadas como *A. melinis* e *A. lipoferum*.

Enfim, os diazotrofos isolados do meio LGI expressaram as seguintes características: crescimento rápido, forma irregular, elevação lenta, bordo ondulada, superfície papilada, configuração enrugada, cor branca, pouca produção de muco e tamanho acima de 3 mm. Estas estirpes quando estriadas em placa com meio batata apresentam tamanho acima de 5 mm. Todos estes aspectos são de *A. amazonense*, como comprovado pela caracterização molecular. As características fenotípicas das bactérias utilizadas para comparação (padrão) são descritas detalhadamente por Döbereiner et al. (1995) e Baldani et al. (2014).

3.3 Identificação e caracterização molecular das bactérias diazotróficas

As 73 estirpes bacterianas foram agrupadas baseadas nos perfis gerados na análise de BOX-PCR, em função dos meios de cultivo (Figuras 3-6). Foram observados de 11 a 20 fragmentos nos perfis dos isolados bacterianos nos quatro meios, permitindo comparar os *fingerprints* com 70% de similaridade. Os isolados com o mínimo de 70% de semelhança foram considerados geneticamente análogos. A análise de BOX-PCR, é um tipo de avaliação por rep-PCR (*repetitive-sequence-based PCR*) (VERSALOVIC et al., 1991, 1994; BRUIJN, 1992), que consiste na avaliação de perfis de DNA em regiões repetitivas e conservadas do material genético, como no elemento repetitivo na subunidade box A (54 pb) (MARTIN et al., 1992), que é altamente conservada em bactérias (KOEUTH et al., 1995). A análise de BOX-PCR evidenciou ser eficiente na obtenção de bactérias diazotróficas associativas ou endofíticas (ALBINO et al., 2006; TORRES et al., 2008) e resulta em perfis com maior

número de bandas e menor custo na verificação por requerer um único *primer* (iniciador), quando comparados com as análises de REP (Repetitive Extragenic Palindromic) e ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (HUNGRIA et al., 2008). Para cada grupo similar foi selecionada uma estirpe representativa para a caracterização molecular dos genes 16S rRNA, *nifH* e *recA*. As análises de BOX-PCR foram avaliadas em função dos meios de cultivos, inicialmente separadamente por meio e, posteriormente, combinados aleatoriamente de dois em dois e, finalmente, todos os perfis de DNA agrupados. Os perfis gerados dos isolados oriundos dos meios NFb e JNFb possibilitaram agrupar estirpes com similaridade acima de 70%. Entretanto, não houve semelhança quando comparados os isolados dos meios NFb e JNFb com os dos meios JMV e LGI, e entre estes dois (Figura 6). Nesse sentido, infere-se que os meios semissólidos apresentam uma boa margem de segurança para o isolamento de bactérias de espécies distintas. Os meios NFb e JNFb que apresentam a mesma fonte de C (malato), geralmente possibilitam isolar bactérias diazotróficas de mesmo gênero e espécie. Contudo, em virtude da amplitude de uso de fontes de C por alguns diazotrofos, estes podem ser isolados em meios semissólidos diferentes.

Após a análise de BOX-PCR, do total de 73 isolados, 34 foram selecionados como estirpes referência dos agrupamentos para as análises dos genes 16S rRNA, *nifH* e *recA*. Destas, 10 tipos foram procedentes do meio NFb (58,8%), 15 JNFb (57,7%), 3 JMV(30%) e 6 LGI (30%), proporcionando uma redução de mais de 55% das estirpes-a serem caracterizadas geneticamente. Dos sete isolados bacterianos diazotróficos provenientes da parte aérea do sorgo forrageiro, seis foram identificados como *Azospirillum melinis*, representados por JV44 e JV49 (Figura 6). No dendograma que consta todos os perfis, pode-se observar a proximidade do isolado J20 com a estirpe JV44, comprovando a eficácia da análise de perfil de DNA BOX-PCR (Figura 5). Ademais, pode-se

inferir que o maior agrupamento de diazotrofos similares na análise de BOX-PCR foi entre os isolados dos meios JMV e LGI. Este fato é comprovado quando se observa o número de gêneros e espécies isolados em cada meio (Tabela 6).

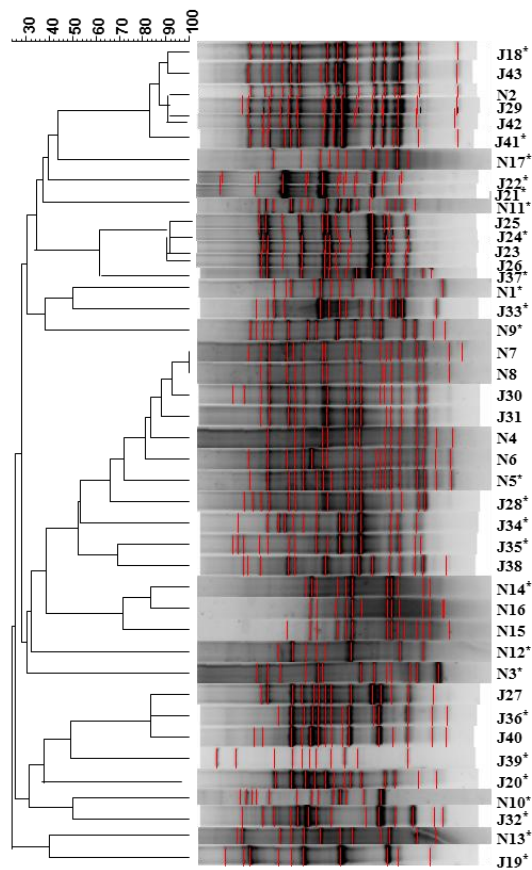


Figura 3 - Dendrograma obtido pela análise de agrupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados dos meios NFb e JNFb. As matrizes de similaridade foram calculadas usando o coeficiente de Jaccard e os agrupamentos usando o método UPGMA. Isolados indicados com o símbolo “*” foram usados para o sequenciamento dos genes 16S rRNA, *nifH* e *recA*.

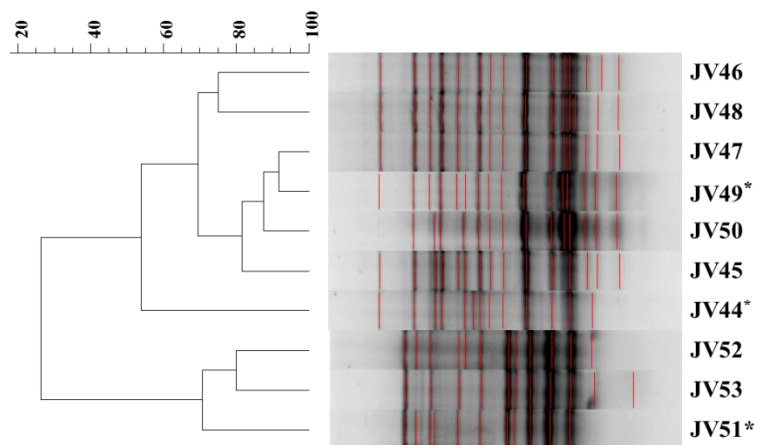


Figura 4 - Dendrograma obtido pela análise de agrupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados dos meios JMV. As matrizes de similaridade foram calculadas usando o coeficiente de Jaccard e os agrupamentos usando o método UPGMA. Isolados indicados com o símbolo “*” foram usados para o sequenciamento dos genes 16S rRNA, *nifH* e *recA*.

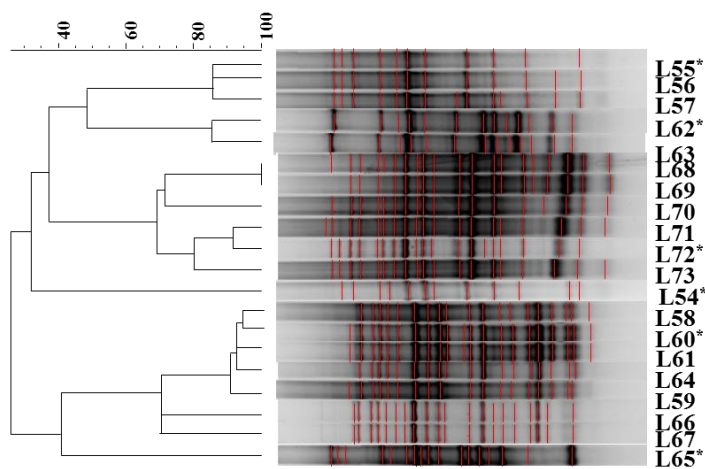


Figura 5 - Dendrograma obtido pela análise de agrupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados dos meios LGI. As matrizes de similaridade foram calculadas usando o coeficiente de Jaccard e os agrupamentos usando o método UPGMA. Isolados indicados com o símbolo “*” foram usados para o sequenciamento dos genes 16S rRNA, *nifH* e *recA*.

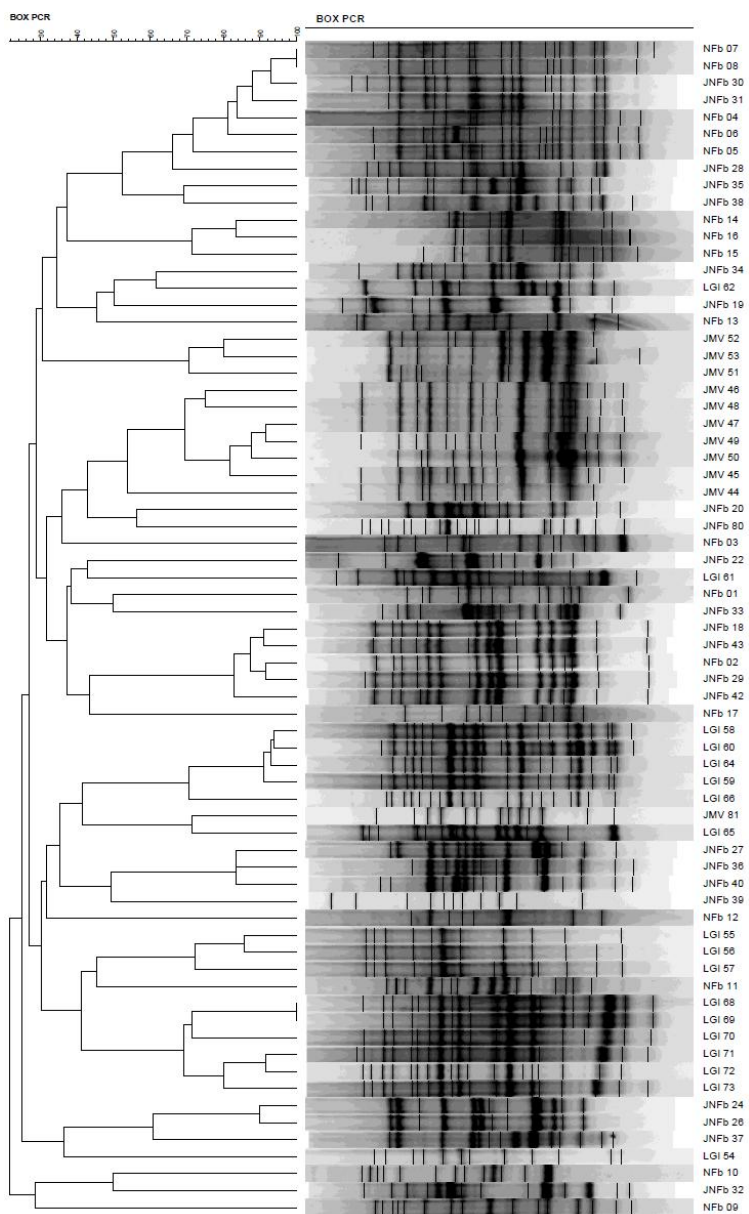


Figura 6 - Dendrograma obtido pela análise de agrupamento dos perfis de BOX-PCR para todos os isolados dos meios NFB, JNFb, JMV e LGI. As matrizes de similaridade foram calculadas usando o coeficiente de Jaccard e os agrupamentos usando o método UPGMA.

As estirpes isoladas pertencem aos filos Proteobacteria (*Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Stenotrophomonas*) e Firmicutes (*Bacillus*) (Tabela 6). As bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Stenotrophomonas* e *Bacillus*, são das classes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Bacilli*, respectivamente. Foram identificadas seis espécies, tanto no meio NFb quanto no JNFb, à medida que nos meios JMV e LGI foram detectadas apenas duas espécies em cada.

As análises de similaridade dos fragmentos do gene 16S rRNA permitiram valores superiores a 97% de semelhança com as sequências de outras bactérias depositadas no banco de dados *GenBank* do NCBI. Pontes et al. (2007), afirmaram que, usualmente, similaridades de sequências maiores que 97%, em comparação com sequências de outras bactérias depositadas no banco de dados, podem ser identificadas como mesma espécie.

A análise filogenética baseada nas sequências dos genes 16S rRNA indicou a presença de 12 espécies, composta por *Azospirillum formosense*, *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. zae*, *A. melinis*, *A. amazonense*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *S. pavanii*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. frisingense*, *Bacillus aerius* e *B. safensis* (Figura 7).

O maior número de isolados foi identificado como do gênero *Azospirillum* (57), representando 78% das estirpes obtidas. Destas, 5,3; 8,8; 12,3; 19,3; 21,1 e 33,3% foram de *A. lipoferum*, *A. zae*, *A. melinis*, *A. brasilense* e *A. amazonense*, respectivamente. As bactérias do gênero *Azospirillum* são consideradas endofíticas facultativas, que apresentam a capacidade de colonizar a rizosfera e o interior do tecido radicular (BALDANI et al., 1997). Estes diazotróficos apresentam o metabolismo versátil de C e N, o que os tornam bem adaptados à rizosfera e competem com sucesso neste ambiente (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Estes autores ainda afirmam que algumas destas bactérias do gênero *Azospirillum* possuem

mecanismos específicos de interação com as raízes e são aptas a colonizar todo o interior das mesmas, enquanto outras, apenas colonizam a camada de mucilagem ou células do córtex danificadas das raízes.

O gênero *Azospirillum* foi descrito inicialmente por Tarrand et al. (1978), os quais classificaram as duas espécies como *A. lipoferum* e *A. brasilense*. Wong e Stenberg (1979) isolaram cinco estirpes de *A. brasilense* associadas com raízes de sorgo e comprovaram a sua capacidade de fixação de N. Pereira et al. (1988), relataram o uso de estirpe de *A. lipoferum* S82 isoladas de raízes de sorgo no efeito sobre a produtividade de sorgo e arroz em campo. Baldani (1984) descreveu a ocorrência de *A. amazonense* nas raízes de sorgo. Entretanto, não é reportado na literatura o isolamento de bactérias das espécies *A. melinis*, *A. zae* e *A. formosense* na cultura do sorgo, como ocorrido neste trabalho. A bactéria *A. melinis* foi identificada por Peng et al. (2006), isolada de capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.). As cepas de *A. zae* foram isoladas de solo rizosférico de plantas de milho cultivadas no sul de Ontário, no Canadá (MEHNAZ et al., 2007), enquanto que a estirpe CC-NFb-7 de *A. formosense* foi isolada de solo agrícola em Yunlin County, Taiwan (LIN et al., 2012). As bactérias *A. melinis* foram consideradas por Peng et al. (2006), como endófitas, corroborando com o presente estudo, onde os microrganismos bacterianos foram isolados, principalmente da parte aérea do sorgo (JV44 e JV49), e os demais provavelmente colonizam o interior do tecido radicular. Outro aspecto importante foi que mais de 90% das cepas de *A. melinis* foram isoladas em solo considerado de baixa fertilidade (Caatinga), como no caso do isolamento desta espécie no capim-gordura, favorecendo assim a associação com estes procariontes diazotróficos. Ademais, a *A. zae* foi isolada inicialmente no meio M (malato de sódio) e pH 7,2-7,4 (MEHNAZ et al., 2007), ao passo que no sorgo foi isolado utilizando o meio JNFb, com a fonte de C similar (malato) e o pH 5,8. Para a *A. formosense*, o meio utilizado foi NFb (LIN et al., 2012), e para

os isolados do sorgo os meios NFb e JNFb foram empregados, os quais apresentam a mesma fonte de C (malato).

Tabela 6 - Análise de similaridade de isolados representativos agrupados na análise de BOX-PCR, baseado no sequenciamento do gene 16S rRNA, utilizando o programa BLASTn.

Isolado	Bioma	Genótipo	Tecido	16S rRNA (maior sim.%)	nº de acesso	% sim.
N1	Caatinga	FORAGEIRO	Raiz	<i>Azospirillum formosense</i>	NR117483.1	99
N3	Floresta	FORAGEIRO	Raiz	<i>Bacillus aerius</i>	NR118439.1	99
N5	Caatinga	SACARINO	Raiz	<i>Bacillus safensis</i>	NR113945.1	100
N9	Caatinga	SACARINO	Raiz	<i>Bacillus safensis</i>	NR113945.1	100
N10	Caatinga	SACARINO	Raiz	<i>Bacillus safensis</i>	NR113945.1	100
N11	Mata	SACARINO	Raiz	<i>Azospirillum brasilense</i>	NR110457.1	99
N12	Mata	SACARINO	Raiz	<i>Azospirillum brasilense</i>	NR110457.1	99
N13	Mata	SACARINO	Raiz	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NR040804.1	99
N14	Mata	SACARINO	Raiz	<i>Azospirillum brasilense</i>	NR110457.1	99
N17	Mata	SACARINO	Raiz	<i>Stenotrophomonas pavonii</i>	NR118008.1	99
J18	Mata	FORAGEIRO	Raiz	<i>Azospirillum brasilense</i>	NR110457.1	99
J19	Caatinga	FORAGEIRO	Raiz	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	NR114720.1	99
J20	Caatinga	FORAGEIRO	PA	<i>Azospirillum formosense</i>	NR117483.1	99
J21	Mata	FORAGEIRO	Raiz	<i>Azospirillum formosense</i>	NR117483.1	99
J22	Mata	FORAGEIRO	Raiz	<i>Azospirillum formosense</i>	NR117483.1	99
J24	Mata	FORAGEIRO	Raiz	<i>Azospirillum zeae</i>	NR043934.1	98
J28	Caatinga	SACARINO	Raiz	<i>Azospirillum melinis</i>	NR043483.1	99
J32	Caatinga	SACARINO	Raiz	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	NR025353.1	99
J33	Caatinga	SACARINO	Raiz	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	NR025353.1	99
J34	Caatinga	SACARINO	Raiz	<i>Azospirillum melinis</i>	NR043483.1	99
J35	Caatinga	SACARINO	Raiz	<i>Azospirillum melinis</i>	NR043483.1	99
J36	Mata	SACARINO	Raiz	<i>Azospirillum formosense</i>	NR117483.1	99
J37	Caatinga	SACARINO	Raiz	<i>Azospirillum zeae</i>	NR043934.1	98
J39	Mata	SACARINO	Raiz	<i>Azospirillum formosense</i>	NR117483.1	99
J41	Mata	SACARINO	Raiz	<i>Azospirillum brasilense</i>	NR110457.1	99
JV44	Caatinga	FORAGEIRO	PA	<i>Azospirillum melinis</i>	NR043483.1	99
JV49	Caatinga	FORAGEIRO	PA	<i>Azospirillum melinis</i>	NR043483.1	98
JV51	Mata	SACARINO	Raiz	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR117841.1	99
L54	Floresta	FORAGEIRO	Raiz	<i>Azospirillum amazonense</i>	NR117477.1	99
L55	Floresta	FORAGEIRO	Raiz	<i>Azospirillum amazonense</i>	NR117477.1	99
L60	Mata	FORAGEIRO	Raiz	<i>Azospirillum amazonense</i>	NR117477.1	99
L62	Mata	FORAGEIRO	Raiz	<i>Azospirillum amazonense</i>	NR117477.1	99
L65	Mata	FORAGEIRO	Raiz	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	NR114720.1	100
L72	Mata	SACARINO	Raiz	<i>Azospirillum amazonense</i>	NR117477.1	99

As abreviações representam: sim.: similaridade; PA: parte aérea; N: NFb; J: JNFb; JV: JMV e L: LGI.

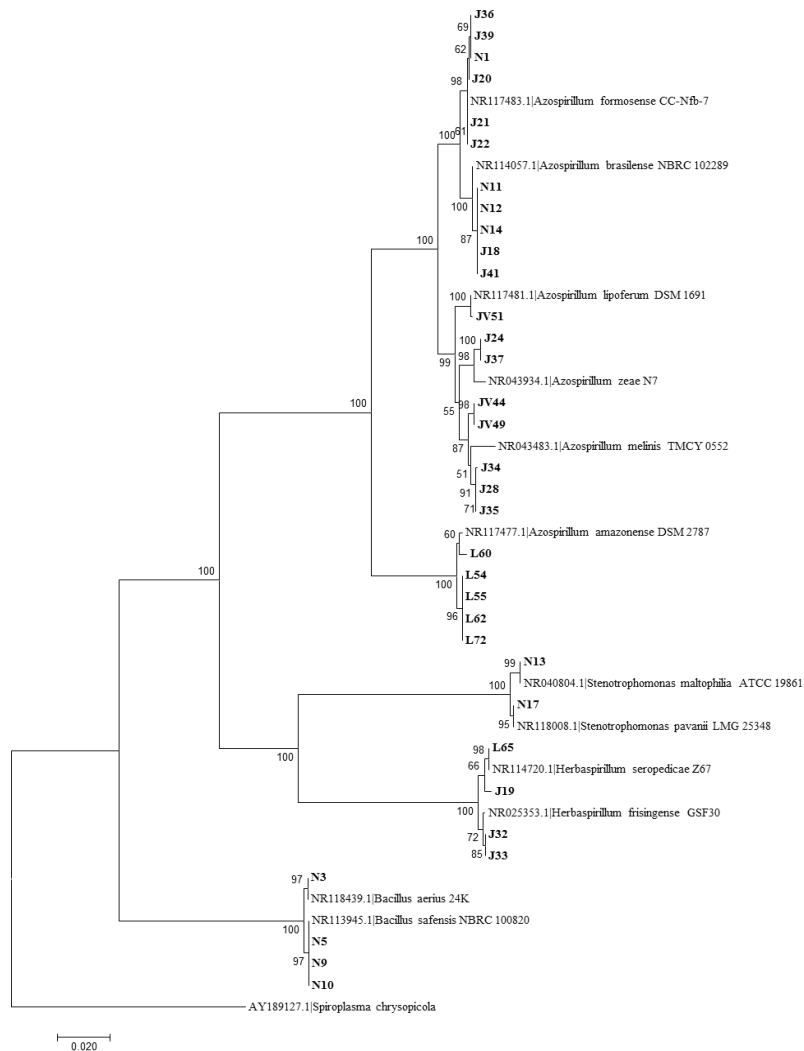


Figura 7 - Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~ 1.450 pb), incluindo os isolados representativos e as estirpes de bactérias diazotróficas depositadas no banco de dados NCBI. O teste de filogenia foi baseado no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining, com a árvore consenso gerada pelo programa MEGA 7. Os números localizados nos ramos da árvore indicam a porcentagem de 1.000 *bootstraps*. A sequência do gene 16S rRNA de *Spiroplasma chrysopicola* foi utilizada como grupo externo.

Não foram identificadas bactérias do gênero *Burkholderia*, mesmo utilizando o meio JMV. Todas as estirpes bacterianas isoladas no meio JMV pertencem ao gênero *Azospirillum*, identificadas como *A. lipoferum* e *A. melinis*. Conforme Reis et al. (2015), os diazotrofos *A. lipoferum* e *A. melinis* podem utilizar manitol como fonte de C, e crescem em pH variando de 5,7-6,8 e 4,0-8,0, respectivamente. Portanto, as estirpes de *A. lipoferum* sobreviveram à acidez do meio JMV (5,0-5,4), o que demonstra a capacidade de adaptação destas bactérias a variações ainda maiores de pH. Ainda, as bactérias diazotróficas *A. lipoferum* e *A. melinis* foram transferidas para frascos contendo meio semissólido NFb, apresentando película aerotóxica característica, após cinco dias de cultivo. Assim, pode-se admitir que estas estirpes são do gênero *Azospirillum*.

O meio de cultura JNFb favoreceu o isolamento de bactérias da categoria *Herbaspirillum*, entretanto, apenas três estirpes foram obtidas deste meio, sendo uma *H. seropedicae* e duas *H. frisingense*. A maior proporção de isolados foi composta por bactérias do gênero *Azospirillum*, o que comprova a sua versatilidade em colonizar as gramíneas e crescer em meios com diferentes fontes de C e pH.

Outro aspecto importante foi que os tecidos vegetais não foram desinfestados, o que, certamente, contribuiu para o isolamento de diazotrofos endófitos facultativos ou rizosféricos, em detrimento dos endofíticos obrigatórios, como os procariontes do gênero *Herbaspirillum*. Conforme Baldani et al. (2005a), o meio JNFb possibilita o crescimento de outras bactérias diazotróficas, particularmente aquelas capazes de tolerar a maior acidez inicial deste meio e utilizar malato como fonte de C, como os diazotrofos do gênero *Azospirillum*.

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foi descrita inicialmente por Baldani et al. (1986b), colonizando raízes de sorgo, milho e arroz. A estirpe L65 obteve uma similaridade de 98% com *H. seropedicae* Z67 (Figura 7), isolada do

meio LGI, que tem como fonte de C a sacarose e pH de 6,0-6,2, o qual é utilizado para isolamento de bactérias diazotróficas *A. amazonense*. Entretanto, não é reportado na literatura o isolamento de bactéria *H. seropedicae* em meio LGI. Nesse sentido, a estirpe bacteriana crescida em meio semissólido LGI foi repicada para o meio semissólido JNFb e, após três dias de incubação, a 30°C, foi verificada a formação da película aerotóxica. Assim, repicou-se mais três vezes consecutivas para confirmação do crescimento desta estirpe e, então, foi estriada em placa com meio NFb sólido, onde verificou-se colônias com o centro azulado característico dessa espécie. O crescimento e a fixação de N₂ de *H. seropedicae* ocorre na presença de 10% de sacarose (BALDANI et al., 2005b), bem como em pH variando de 5,3-8,0, sendo 5,8 considerado ideal (BALDANI et al., 2014b). Ademais, foram identificadas duas estirpes de *H. frisingense* no genótipo de sorgo sacarino, corroborando com os resultados obtidos por Mareque et al. (2014), os quais isolaram a estirpe UYSB35 de sorgo sacarino com similaridade de 99% para esta espécie.

Excetuando-se a estirpe L65, todas as outras foram identificadas como *A. amazonense*, o que demonstra a seletividade desse meio para isolar esta espécie. Foram isoladas 19 estirpes, distribuídas em 15 do bioma Floresta Amazônica e 4 de Mata Atlântica. Na análise de BOX-PCR (Figura 5), observa-se que as estirpes de *A. amazonense* de cada bioma não são similares, e que as de Mata Atlântica (L54, L55, L56 e L57) são separadas das outras, que são oriundas de Floresta Amazônica.

Ainda, foram obtidas bactérias dos gêneros *Stenotrophomonas* e *Bacillus* no meio NFb. No gênero *Stenotrophomonas*, foi isolada uma estirpe de *S. maltophilia* e outra de *S. pavanii*, enquanto para o gênero *Bacillus* foram identificadas uma estirpe de *B. aerius* e nove de *B. safensis*. As bactérias dos gêneros *Stenotrophomonas* e *Bacillus* foram isoladas de sorgo sacarino, exceto a *B. aerius*, que foi observada no sorgo forrageiro. Mareque et al. (2014) também

identificaram estirpes bacterianas de *S. pavanii*, *S. maltophilia* e *B. safensis* em sorgo sacarino cultivado em Bella Unión, Artigas, Uruguai, isolando-as em placas contendo meios LGI, DYGS e TSA, após confirmação de formação de película nos meios semissólidos JNFb, LGI e LGI-P. Entretanto, na literatura, não foi reportada associação de *B. aereus* com a cultura do sorgo.

Estirpes de bactérias do gênero *Stenotrophomonas* foram predominantes no isolamento em *Brachiaria brizantha* (Poaceae), representando 69% dos isolados (SILVA et al., 2013) obtidos em meio JNFb. Esses autores revelaram que o objetivo era isolar bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum*, contudo, não foi detectado. No entanto, esses autores utilizaram o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA com sequências constituídas de 500-700 pb, o que, possivelmente, influenciou na identificação adequada dos isolados, uma vez que o gene 16S rRNA contém em torno de ~1450 pb. Bactérias diazotróficas do gênero *Bacillus* já foram detectadas em outras gramíneas como milho, trigo, *Lolium* (DING et al., 2005) e arroz (DAFFONCHIO et al., 1998).

Todas as estirpes bacterianas de *Stenotrophomonas* e *Bacillus* isoladas do sorgo formaram película característica no meio semissólido NFb livre de N, onde a densidade de oxigênio é baixa. Nestas condições, somente bactérias microaerófilas fixadoras de N conseguem formar a película, cuja característica esta que condiciona as suas sobrevivências nesse meio. Inicialmente, outros procariontes podem-se aproveitar dos compostos sintetizados pelas bactérias diazotróficas para crescerem, contudo, em virtude das repicagens posteriores, geralmente, apenas os diazotrofos permanecem em razão da FBN.

Na análise do gene *nifH*, foi possível amplificar 80,82% (59) das estirpes, do total de 73 isolados bacterianos (Figura 8). Nos isolados N3, N9, N10, J19, J34, J35, J36, J39, JV51 e L65, não houve amplificação da sequência do gene *nifH*. Entretanto, todas as estirpes formaram película característica de

bactérias diazotróficas nos meios semissólidos correspondentes. Possivelmente, com a modificação na reação de PCR e/ou a utilização de outros *primers*, além do PolF e PolR, poderia haver a possibilidade de amplificação do gene *nifH*.

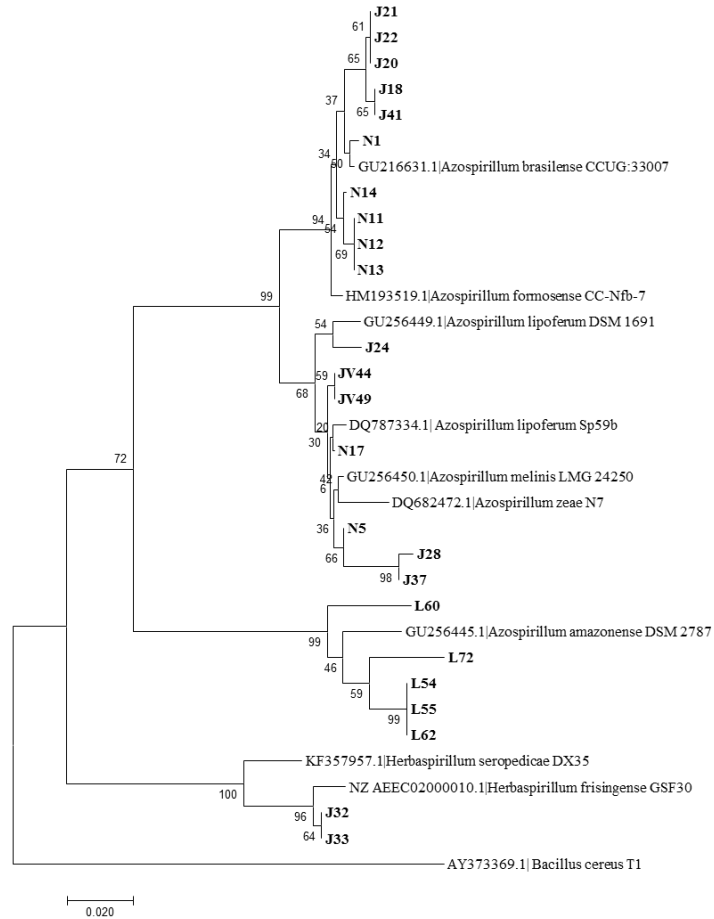


Figura 8 - Árvore filogenética baseada em sequências do gene *nifH* (~ 350 pb), incluindo os isolados representativos e as estirpes de bactérias diazotróficas depositadas no banco de dados NCBI. O teste de filogenia foi baseado no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining, com a árvore consenso gerada pelo programa MEGA 7. Os números localizados nos ramos da árvore indicam a porcentagem de 1.000 *bootstraps*. A sequência do gene *nifH* de *Bacillus cereus* foi utilizada como grupo externo.

Marusina et al. (2001), testando *primers* para amplificação de gene *nifH*, afirmaram que ampla diversidade filogenética de microrganismos fixadores de N resulta numa variabilidade considerável, mesmo de genes conservados, como o *nifH*, e que o alto grau de degeneração das sequências de nucleotídeos deste gene, praticamente elimina a possibilidade de existência de sítios suficientemente longos de sequências não variantes. Além disso, o conjunto das sequências de nucleotídeos do gene *nifH* disponíveis a partir do *GenBank* é relativamente pequeno, quando comparado às sequências de 16S rRNA. Por outro lado, o gene *nifH* codifica a subunidade de proteína de ferro da nitrogenase, e a análise filogenética obtida por esse gene é largamente consistente com a filogenia do gene ribossomal do 16S de microrganismos diazotróficos (YOUNG, 1992; ZEHR et al., 2003). Ademais, o gene *nifH* é o mais estudado entre os genes do operon *nif*, com uma extensa coleção de sequências obtidas de microrganismos cultivados e não cultivados isolados de ambientes múltiplos e representa o maior banco de dados não ribossomal de microrganismos não cultivados (UEDA et al., 1995; ZEHR et al., 1998; 2003; HAMELIN et al., 2002; TAN et al., 2003; DESLIPPE e EGGER, 2006; COELHO et al., 2009).

Outros autores têm utilizado *primers* diferentes para amplificação do gene *nifH*, como Zehrf e Zehrr (TAN et al., 2009), 19F e 407R (COSTA e MELO, 2005). Entretanto, constata-se que a utilização dos *primers* PolF e PolR para as bactérias associativas e endofíticas em gramíneas acontece em maior proporção. Coelho et al. (2008), utilizando os *primers* PolF e PolR na avaliação da diversidade de bactérias fixadoras de N na rizosfera de dois cultivares de sorgo, encontraram bactérias de diversos gêneros, como *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Azohydromonas*, *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Ideonella*, *Sinorhizobium* e outros.

Houve amplificação do gene *nifH* de 82,4% no meio NFb, 69,2% no JNFb, 70% no JMV e 95% no LGI (Figura 8). As estirpes J18 e J41 foram identificadas como *A. brasilense*, similarmente à identificação do gene 16S rRNA. As bactérias J20, J21 e J22 foram detectadas como *A. formosense*, conforme as sequências do gene 16S rRNA. Entretanto, os diazotrofos N1 (*A. brasilense*), N11, N12 e N14 (*A. formosense*) não foram similares ao reconhecimento do gene ribossomal 16S. Para algumas estirpes representativas de *A. brasilense* e *A. formosense*, não foi possível uma identificação muito precisa. Estas duas espécies de *Azospirillum* são consideradas filogeneticamente próximas, podendo apresentar similaridade entre os genes como constatado na árvore de evolução concebida por Lin et al. (2012).

No banco de dados do *GenBank* encontram-se sequências de *nifH* de estirpes de *S. maltophilia*, no entanto, a bactéria N13 foi identificada como *A. formosense*. Para a bactéria N17, também, não houve semelhança entre as identificações, sendo constatada como *A. lipoferum (nifH)*, embora, no banco de dados *GenBank* não sejam encontradas as sequências do gene *nifH* para *S. pavanii*. Ademais, houve similaridade para os diazotrofos J32 e J33 (*H. frisingense*), e J37 (*A. zaeae*), enquanto N5, J24, J28, JV44 e JV45 não apresentaram semelhança entre a identificação dos genes *nifH* e 16S rRNA.

Geralmente, infere-se que o gene *nifH* não deve ser considerado como único marcador filogenético na identificação de diazotróficos, podendo ocorrer transferência horizontal de genes (RAYMOND et al., 2004; FISCHER et al., 2012) de uma bactéria para a outra no ambiente. Não existe um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) universal para a amplificação do gene *nifH* e, em alguns casos, os oligonucleotídeos iniciadores são desenhados para a amplificação de um grupo específico de bactérias diazotróficas (ZEHR et al., 2003). Por outro lado, considerando a amplificação do gene *nifH* para os

isolados do meio LGI, todos apresentaram similaridade genética entre as duas árvores filogenéticas.

No gene *housekeeping recA*, houve amplificação para 53 (72,6%) isolados bacterianos. Em referência aos meios, o gene foi amplificado em 88,2% dos isolados no NFb, 50% no JNFb, 70% no JMV e 94,7% no LGI (Figura 9). As estirpes L54, L55, L60, L62 e L72 foram identificadas como *A. amazonense*, similares as árvores filogenéticas dos genes 16S rRNA e *nifH*. Entretanto, para as demais estirpes não houve similaridade entre as identificações para os genes *recA* e 16S rRNA. Esta divergência ocorre, principalmente, porque no banco de dados *GenBank* não existem sequências do gene *recA* para a maioria das bactérias diazotróficas isoladas, como *A. formosense*, *A. zea* e *A. melinis*. Nesse sentido, seria fundamental realizar o sequenciamento para estas bactérias e outros gêneros mais frequentes em gramíneas, como o sorgo. A finalidade para esta amplificação e sequenciamento era aumentar a precisão de identificação destes diazotrofos.

O gene *housekeeping recA* possui estabilidade genética, porém apresenta maior divergência genética em relação ao 16S rRNA, mesmo entre espécies proximamente relacionadas, o que contribui para construir árvores filogenéticas consistentes (RIBEIRO et al., 2009; MENNA et al., 2009). Atualmente, vários autores têm realizado a análise de sequência multilocus (MLSA – *multilocus sequence analysis*) para identificar os isolados, principalmente rizóbios. A MLSA é uma ferramenta empregada em estudo de espécies próximas e descrição de novas espécies (RIVAS et al., 2009; WANG et al., 2013). Meyer et al. (2014), identificaram uma nova espécie de *Burkholderia* utilizando uma análise de concatenação entre os genes 16S rRNA, *recA* e *gyrB*. A finalidade do sequenciamento do gene *housekeeping recA* era, juntamente com o gene 16S rRNA, elaborar uma árvore concatenada para adquirir maior precisão na identificação dos isolados. No entanto, com a reação de PCR utilizada foi

possível amplificar o gene *housekeeping recA* da maioria dos isolados bacterianos, o que permite que novos estudos sejam realizados e possibilitem maior precisão na identidade dos procariontes diazotróficos em gramíneas.

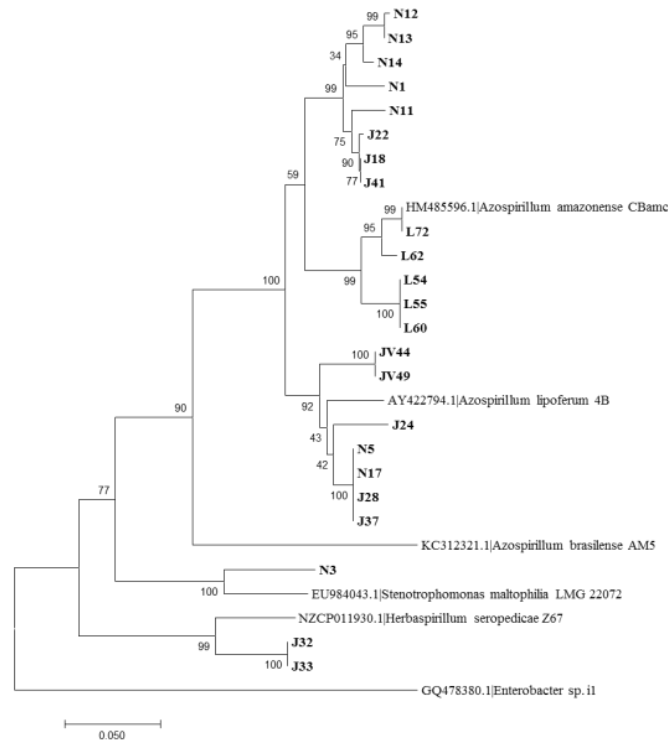


Figura 9 - Árvore filogenética baseada em sequências do gene *recA* (~ 550 pb), incluindo os isolados representativos e as estirpes de bactérias diazotróficas depositadas no banco de dados NCBI. O teste de filogenia foi baseado no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining, com a árvore consenso gerada pelo programa MEGA 7. Os números localizados nos ramos da árvore indicam a porcentagem de 1.000 *bootstraps*. A sequência do gene *recA* de *Enterobacter* sp. foi utilizada como grupo externo.

3.4 Índices de diversidade de bactérias diazotróficas

Os índices de diversidade foram diferentes para os biomas e para os genótipos de sorgo (Tabela 7). O bioma Mata Atlântica apresentou maior riqueza de espécies (8), quando comparado com os outros dois biomas. No bioma Floresta Amazônica foi detectada a menor riqueza de espécies (6). Embora o bioma Floresta Amazônica apresentasse a menor riqueza de espécies, obteve a maior diversidade (H'), em razão da maior homogeneidade (J) na distribuição dos indivíduos em cada espécie e principalmente pela menor dominância (D) entre as espécies.

Os biomas Caatinga e Mata Atlântica exibiram valores similares de índice de diversidade, principalmente, pela maior dominância entre as espécies identificadas. O índice de diversidade de Shannon-Weaver é sensível à riqueza e à abundância relativa de espécies (ATLAS e BARTHA, 1998).

Observa-se, claramente, que no bioma Mata Atlântica, as espécies *A. brasilense* e *A. amazonense* foram predominantes sobre as demais. Por sua vez, no bioma Caatinga, as espécies de *A. melinis* e *B. safensis* foram abundantes em comparação com as outras. Assim, a distribuição entre as espécies foi relativamente mais uniforme (equitativa) em Floresta Amazônica. A abundância relativa de determinadas espécies de bactérias diazotróficas em ecossistemas específicos, possibilita a triagem de locais com características peculiares para o isolamento de estirpes fixadoras de N com maior potencial agronômico.

Esperava-se maior quantitativo e diversidade de isolados diazotróficos nos três locais amostrados, entretanto, em razão do uso de meios de cultivo semi-seletivos favoreceu um menor número de indivíduos e de espécies, considerando que estes meios semissólidos permitem, prioritariamente, o crescimento de bactérias microaerófilas, fixadoras de N e que sobrevivem basicamente na rizosfera e no interior das plantas. De forma geral, o cultivo de microrganismos fornece informações limitadas sobre a diversidade, ponderando

que a maioria dos organismos existentes não é isolada por meio de técnicas de cultivo tradicionais.

Tabela 7 – Frequência dos grupos bacterianos baseada no gene 16S rRNA e os índices de diversidade das bactérias diazotróficas isoladas na cultura do sorgo em três biomas.

Espécie	Número de isolados					Total
	Bioma			Genótipo		
	Caatinga	Mata Atlântica	Floresta Amazônica	Forrageiro	Sacarino	
<i>Azospirillum formosense</i>	3	1	3	5	2	7
<i>Azospirillum melinis</i>	10	nd	1	8	3	11
<i>Azospirillum zeae</i>	1	2	2	4	1	5
<i>Azospirillum lipoferum</i>	nd	3	nd	Nd	3	3
<i>Azospirillum brasilense</i>	1	9	2	2	10	12
<i>Azospirillum amazonense</i>	nd	15	4	13	6	19
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	1	1	nd	2	nd	2
<i>Herbaspirillum frisingense</i>	2	nd	nd	Nd	2	2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	nd	1	nd	Nd	1	1
<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	nd	1	nd	Nd	1	1
<i>Bacillus aerius</i>	nd	nd	1	1	Nd	1
<i>Bacillus safensis</i>	9	nd	nd	Nd	9	9
Total	17	33	13	35	38	73

	Índices de diversidade				
	Bioma			Genótipo	
S	7	8	6	7	10
H'	1,537	1,524	1,672	1,660	1,982
D	0,2702	0,2966	0,2071	0,2310	0,1704
1-D	0,7298	0,7034	0,7929	0,7690	0,8296
J	0,7900	0,7331	0,9329	0,8530	0,8607

nd=não detectado; S = número de espécies; H' = índice de diversidade de Shannon-Weaver; D = índice de dominância de Simpson; J = Equitabilidade de Pielou.

No genótipo de sorgo sacarino, constatou-se maior riqueza de espécies, em comparação ao sorgo forrageiro. O sorgo sacarino também apresentou maior índice de diversidade, sobretudo pela menor dominância entre as espécies do que o sorgo forrageiro. A equitabilidade foi similares para os dois genótipos de sorgo. No sorgo sacarino, houve abundância de *A. brasilense* e *B. safensis*, diferentemente do sorgo forrageiro, em que houve predominância de *A. amazonense* e *A. melinis*. A maior concentração de açúcares solúveis no sorgo sacarino pode ter proporcionado a maior riqueza de espécies encontradas e favoreceu o isolamento de estirpes do gênero *Stenotrophomonas* e *Bacillus safensis*, não detectadas no sorgo forrageiro. A riqueza e o índice de diversidade observados neste trabalho foram superiores aos reportados por Bergamaschi et al. (2007), os quais trabalharam com 12 cultivares de sorgo forrageiro, utilizando os meios NFb, JNFb e JMV.

3.5 Síntese de compostos indólicos das bactérias diazotróficas

A maioria dos isolados bacterianos sintetizou compostos indólicos, nos tempos de 24 e 48 h de crescimento, exceto a estirpe N17, identificada como *S. pavanii* (Tabelas 8 e 9). O ácido 3-indol-acético (AIA) é a molécula de auxina mais abundante e ativa em sistemas biológicos, sendo sintetizada principalmente pelas plantas e bactérias. Dentre os efeitos associados, destacam-se a iniciação de raízes laterais e adventícias, o estímulo à divisão celular e o alongamento de raízes e colmos (TEALE et al., 2006). Aparentemente, esta molécula não funciona como um hormônio para as células bacterianas, mas pode ter evoluído, em virtude da sua importância na relação bactéria-planta (PATTEN e GLICK, 2002). Ademais, uma visão simbiótica desta interação pode ser correta, pois o fornecimento de auxinas promove o crescimento de plantas, e, desta forma, há

mais exsudatos e mais nutrientes para as bactérias (SOLANO et al., 2008). As vias metabólicas de síntese de auxinas em bactérias estão demonstradas na Figura 10.

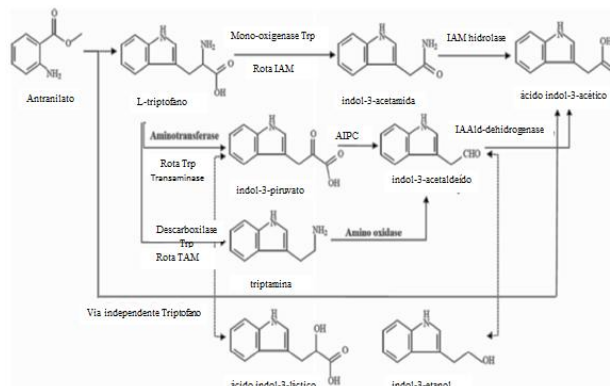


Figura 10 - Vias hipotéticas e caracterizadas para a síntese de ácido indol 3 acético (AIA) em *Azospirillum* sp (CASSÁN et al., 2014).

Na fase exponencial de crescimento (24 h), a síntese de compostos indólicos variou de 0,1 a 402,74 $\mu\text{g mg PTN}^{-1}$, enquanto na fase de crescimento estacionária ficou entre 0,13 a 387,63 $\mu\text{g mg PTN}^{-1}$. Cassán et al. (2014) descreveram que, em condições de cultivo, a produção de AIA pode variar de 5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dependendo do meio de cultivo e da estirpe testada. Por outro lado, Bashan e de-Bashan (2010) reportaram elevada capacidade de bactérias *A. brasilense* paraproduzir AIA, variando de 93 a 379 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

No presente estudo, considerando a mesma unidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$) destes autores foi encontrado valor na fase exponencial (24 h) de crescimento de até 14,23 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e na fase estacionária (48 h), de até 95,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, a determinação do teor de proteínas é imprescindível para adequar a produção dos compostos indólicos ao crescimento populacional bacteriano. A estirpe J24 (*A. zea*) sintetizou a maior quantidade de compostos indólicos no tempo de 24 h (fase exponencial), seguida de L71 (*A. amazonense*), J34 (*A. melinis*), J20 (*A. formosense*) e L64 (*A. amazonense*).

No tempo de 48 h (fase estacionária), considerando apenas estirpes isoladas neste trabalho, a estirpe L64 produziu maior concentração de compostos indólicos, vindo logo na sequência às estirpes L66, L67, L61 (*A. amazonense*), JV53 (*A. lipoferum*), J32 (*H. frisingense*), N16 (*A. brasilense*), L58 (*A. amazonense*), JV50 (*A. melinis*), L69 (*A. amazonense*) e L59 (*A. amazonense*). Constatou-se que a maior produção de compostos indólicos foi promovida principalmente pelas bactérias do gênero *Azospirillum*.

Dos isolados bacterianos, 45,83% sintetizaram maior quantidade de auxinas na fase exponencial, em comparação à fase estacionária, o que comprova que estas bactérias começam a elaborar essas moléculas desde a fase inicial de crescimento. Este evento pode estar relacionado com a estirpe, ou também com o meio DYGS utilizado no crescimento, o qual contém quantidades expressivas de diversos aminoácidos oriundos do extrato de levedura e da peptona (YAMADA et al., 2003; CHAVES et al., 2015).

Ainda, a quantidade dos fitormônios sintetizados *in vitro* por estes microrganismos depende da espécie e/ou estirpe e, basicamente, das condições de cultivo, como a presença de precursores das vias de biossíntese, como o L-triptofano, oxigenação, pH e fase de crescimento dos diazotrofos no momento da avaliação (RADWAN et al., 2002; CROZIER et al., 2010). No entanto, na maioria dos trabalhos a síntese de compostos indólicos é promovida, principalmente, na fase estacionária (RADWAN et al., 2004; SPAEPEN et al., 2007; MALHOTRA e SRIVASTAVA, 2009). Curiosamente, a limitação do carbono e a redução da taxa de crescimento estão associadas à entrada na fase estacionária, evidenciando a importância do crescimento populacional na biossíntese de auxinas (SPAEPEN et al., 2007). Assim, os resultados desses autores corroboram com os resultados reportados no presente estudo, onde houve predomínio na biossíntese de AIA na fase estacionária.

Tabela 8 – Síntese de compostos indólicos (AIA) das estirpes bacterianas isoladas e bactérias diazotróficas tipo em 24 horas de crescimento em meio DYGS com L-triptofano.

Estirpe	AIA		Estirpe	AIA		Estirpe	AIA	
	$\mu\text{g mg PTN}^{-1}$	24h		$\mu\text{g mg PTN}^{-1}$	24 h		$\mu\text{g mg PTN}^{-1}$	24 h
N1	66,44	d	J29	8,21	f	L56	10,95	f
N2	6,08	f	J30	8,23	f	L57	10,67	f
N3	22,14	e	J31	11,67	f	L58	11,94	f
N4	20,62	e	J32	0,15	f	L59	23,71	e
N5	10,67	f	J33	61,30	d	L60	26,36	e
N6	14,30	f	J34	103,04	c	L61	0,20	f
N7	8,66	f	J35	11,65	f	L62	29,23	e
N8	25,34	e	J36	16,20	f	L63	28,35	e
N9	37,24	e	J37	17,33	f	L64	96,68	c
N10	14,07	f	J38	23,00	e	L65	28,72	e
N11	11,73	f	J39	11,64	f	L66	4,51	f
N12	15,39	f	J40	25,35	e	L67	4,45	f
N13	18,86	f	J41	12,85	f	L68	14,30	f
N14	7,35	f	J42	9,67	f	L69	0,20	f
N15	0,10	f	J43	14,45	f	L70	28,33	e
N16	20,51	e	JV44	28,52	e	L71	139,83	b
J18	13,23	f	JV45	1,00	f	L72	51,16	e
J19	36,56	e	JV46	27,39	e	L73	0,20	f
J20	100,39	c	JV47	0,32	f	ZAE95	24,34	e
J21	52,20	e	JV48	20,80	e	Sp7	29,49	e
J22	54,15	e	JV49	12,78	f	Aam82	25,22	e
J23	13,05	f	JV50	2,39	f	Sp245	26,36	e
J24	402,74	a	JV51	22,42	e	HRC54	36,40	e
J25	13,20	f	JV52	28,70	e	ZAE94	18,59	f
J26	13,08	f	JV53	18,29	f	S82	14,73	f
J27	26,92	e	L54	31,74	e	Ppe8	0,20	f
J28	42,73	e	L55	11,08	f	-	-	-

Médias seguidas de letras iguais nas três colunas, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott a 5% de significância. ZAE95= *H. seropedicae*; Sp7= *A. brasilense*; Aam82= *A. amazonense*; Sp245= *A. brasilense*; HRC54= *H. seropedicae*; ZAE94= *H. seropedicae*; S82= *A. lipoferum*; Ppe8= *Burkholderia tropica*.

Tabela 9 – Síntese de compostos indólicos (AIA) das estirpes bacterianas isoladas e bactérias diazotróficas tipo em 48 horas de crescimento em meio DYGS com L-triptofano.

Estirpe	AIA		Estirpe	AIA		Estirpe	AIA	
	$\mu\text{g mg PTN}^{-1}$			$\mu\text{g mg PTN}^{-1}$			$\mu\text{g mg PTN}^{-1}$	
	48 h		48 h		48 h		48 h	
N1	1,32 d	J29	11,07 d	L56	95,46 c			
N2	8,52 d	J30	13,41 d	L57	93,24 c			
N3	2,46 d	J31	93,49 c	L58	144,24 b			
N4	12,63 d	J32	151,69 b	L59	139,23 b			
N5	16,55 d	J33	6,23 d	L60	0,72 d			
N6	4,15 d	J34	115,09 c	L61	173,15 b			
N7	124,96 c	J35	107,90 c	L62	5,15 d			
N8	6,46 d	J36	0,13 d	L63	4,85 d			
N9	3,14 d	J37	6,00 d	L64	387,63 a			
N10	4,10 d	J38	0,20 d	L65	7,06 d			
N11	113,14 c	J39	2,06 d	L66	183,62 b			
N12	3,17 d	J40	8,58 d	L67	179,56 b			
N13	1,60 d	J41	10,56 d	L68	1,91 d			
N14	4,74 d	J42	17,51 d	L69	141,10 b			
N15	102,77 c	J43	7,40 d	L70	1,79 d			
N16	149,90 b	JV44	0,85 d	L71	23,86 d			
J18	62,28 d	JV45	7,55 d	L72	35,63 d			
J19	19,83 d	JV46	6,08 d	L73	62,15 d			
J20	121,92 c	JV47	78,01 c	ZAE95	0,20 d			
J21	1,05 d	JV48	3,35 d	Sp7	1,75 d			
J22	0,95 d	JV49	95,30 c	Aam82	0,20 d			
J23	4,05 d	JV50	142,51 b	Sp245	0,20 d			
J24	35,43 d	JV51	4,03 d	HRC54	36,41 d			
J25	0,85 d	JV52	2,09 d	ZAE94	162,96 b			
J26	4,78 d	JV53	169,98 b	S82	134,15 b			
J27	1,44 d	L54	0,20 d	Ppe8	86,12 c			
J28	3,07 d	L55	104,26 c	-	-			

Médias seguidas de letras iguais nas três colunas, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott a 5% de significância. ZAE95= *H. seropedicae*; Sp7= *A. brasilense*; Aam82= *A. amazonense*; Sp245= *A. brasilense*; HRC54= *H. seropedicae*; ZAE94= *H. seropedicae*; S82= *A. lipoferum*; Ppe8= *Burkholderia tropica*.

4 CONCLUSÕES

As amostras, provenientes do bioma Mata Atlântica, tem a maior população de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal associada à cultura do sorgo.

Nas raízes das plantas de sorgo, encontra-se a maior concentração de diazotrofos, em comparação com a parte aérea, independentemente do bioma.

A análise de perfil de DNA BOX-PCR discrimina e agrupa com precisão a identificação das bactérias diazotróficas, em nível de gênero e espécie.

O gene *housekeeping recA* pode ser utilizado como marcador molecular para aprimorar a identificação de bactérias diazotróficas associadas às plantas de sorgo.

A cultura do sorgo está associada com bactérias promotoras de crescimento vegetal dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas*.

O bioma Floresta Amazônica detém a maior diversidade de diazotrofos, e o bioma Mata Atlântica, a maior riqueza de espécies fixadoras de nitrogênio.

O sorgo sacarino foi capaz de apresentar maior diversidade e riqueza de estirpes bacterianas diazotróficas, em comparação com o sorgo forrageiro.

A biossíntese de compostos indólicos de bactérias diazotróficas associadas à cultura do sorgo tem potencial de promoção de crescimento vegetal que pode ser aplicado como biofertilizantes, para práticas agrícolas sustentáveis e ecologicamente eficientes.

4 CAPÍTULO II

BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS À CULTURA DO SORGO EM CONDIÇÕES GNOTOBIÓTICAS E CASA DE VEGETAÇÃO

RESUMO

Sousa, F.G. **Bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal associadas à cultura do sorgo em condições gnotobióticas e casa de vegetação.** Vitória da Conquista – BA: UESB, 2017. (Tese – Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia)

O sorgo é o quinto cereal mais consumido no mundo, porém, existem poucos estudos com a associação dessa planta com bactérias diazotróficas. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal na cultura do sorgo em condições gnotobióticas e em casa de vegetação nos municípios de Seropédica-RJ e Colorado do Oeste-RO. Inicialmente foi conduzido um experimento em delineamento inteiramente ao acaso, com 89 tratamentos, constituídos por 87 estirpes de bactérias diazotróficas, uma testemunha sem inoculação e um tratamento com adubação nitrogenada. Foram avaliados o comprimento, volume e área superficial do sistema radicular. Das 87 estirpes bacterianas, foram selecionadas 13 estirpes para os experimentos em casa de vegetação. Ainda, foram acrescentadas três bactérias padrão, compondo 16 tratamentos inoculados, um tratamento sem adubação nitrogenada, uma testemunha e três tratamentos com doses crescentes de nitrogênio. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com 21 tratamentos e 5 repetições. Foram conduzidos quatro experimentos, dois com sorgo forrageiro e dois com sorgo granífero. As bactérias foram selecionadas pelo acúmulo de massa seca na parte aérea e raízes e, pelos teores de nitrogênio nos componentes morfológicos das plantas. As estirpes bacterianas N5, N11, N17, J36, J39, JV49, JV50, L60, L66, L72, Aam82, J9 e 1A apresentaram as maiores massas radiculares e de crescimento radicular em plantas de sorgo forrageiro BRS 655, em condições gnotobióticas. As bactérias diazotróficas J36, N11, L60, JV49 e Aam82 proporcionaram maior incremento de massas secas de parte aérea e raízes nas plantas de sorgo forrageiro BRS 655 em casa de vegetação. No incremento de teores de nitrogênio nas plantas de sorgo forrageiro BRS 655, destacaram as estirpes bacterianas N5, J9 e L66. A estirpe N5 apresentou as maiores produções de massas secas de raízes e parte aérea para o sorgo granífero BRS 332. As estirpes bacterianas N5, N11 e J39 proporcionaram maiores incrementos nos teores de nitrogênio no sorgo granífero BRS 332.

Palavras-chave: estirpes bacterianas, gramíneas, nutrição mineral.

Orientadora: Vera Lúcia Divan Baldani, *D.Sc.*, UESB e Co-orientador: Joilson Silva Ferreira, *D.Sc.*, UESB

Orientador Doutorado Sanduíche: José Ivo Baldani, *D.Sc.*, EMBRAPA-Agrobiologia

ABSTRACT

SOUSA, F.G. **Plant growth promoting diazotrophic bacteria associated with sorghum culture under gnotobiotic conditions and greenhouse.** Vitória da Conquista – BA (Thesis – PhD in Agronomy – Concentration Area in Plant Science)

Sorghum is the fifth most consumed cereal in the world, however, there are few studies with the association of this plant with diazotrophic bacteria. The objective of this study was to evaluate the effect of diazotrophic plant growth promoter bacteria on sorghum culture under gnotobiotic conditions and in a greenhouse in the municipalities of Seropédica-RJ and Colorado do Oeste-RO. Initially, an experiment was conducted in a completely randomized design with 89 treatments, consisting of 87 strains of diazotrophic bacteria, one control without inoculation and one treatment with nitrogen fertilization. The length, volume and surface area of the root system were evaluated. Of the 87 bacterial strains, 13 strains were selected for greenhouse experiments. In addition, three standard bacteria were added, comprising 16 inoculated treatments, one treatment without nitrogen fertilization, one control and three treatments with increasing doses of nitrogen. The experimental design was in randomized blocks, with 21 treatments and 5 replicates. Four experiments were conducted, two with grass sorghum and two with grain sorghum. The bacteria were selected by the accumulation of dry mass in the aerial part and roots and by the levels of nitrogen in the morphological components of the plants.

The bacterial strains N5, N11, N17, J36, J39, JV50, L60, L66, L72, Aam82, J9 and 1A presented the highest root and root growth masses in BRS 655 grass sorghum plants under gnotobiotic conditions. The Diazotrophic bacteria J36, N11, L60, JV49 and Aam82 provided a greater increase of shoot dry masses and roots in BRS 655 grass sorghum plants under greenhouse conditions. In the increase of nitrogen levels in BRS 655 grass sorghum plants, the bacterial strains N5, J9 and L66 stood out. The N5 strain presented the highest yields of dry root and shoot mass for BRS 332 grain sorghum. Bacterial strains N5, N11 and J39 provided higher increases in nitrogen content in BRS 332 grain sorghum.

Key-words: bacterial strains, grasses, mineral nutrition.

Adviser: Vera Lúcia Divan Baldani, *D.Sc.*, UESB and Co-advisor: Joilson Silva Ferreira, *D.Sc.*, UESB

Advisor Ph.D Sandwich: José Ivo Baldani, *D.Sc.*, EMBRAPA-Agrobiologia

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é o elemento encontrado em maior abundância na atmosfera e o mais requerido pelas plantas. Entretanto, devido a forte ligação tripla do gás nitrogênio (N₂), ele se torna indisponível para as plantas, tornando indispensável a adição ao solo de fertilizantes nitrogenados. Bactérias diazotróficas, que fixam biologicamente o N (FBN) do ar são fontes não poluentes para o fornecimento desse nutriente para os vegetais. Este tipo de interação planta-bactéria é uma fonte importante de entrada de N na agricultura e representa uma alternativa promissora aos fertilizantes químicos de N (CARVALHO et al., 2014). Em leguminosas, esses diazotrofos são capazes de suprir totalmente o N exigido, sobretudo no caso da soja. Contudo, em gramíneas, esses procariontes não conseguem suprir totalmente a demanda de N das plantas somente pela FBN, podendo influenciar fortemente a nutrição nitrogenada das culturas às quais estão associadas, aumentando a sua capacidade de assimilação de N, indiretamente, com o incremento do sistema radicular, ou diretamente, estimulando o sistema de transporte de N das plantas (MANTELIN e TOURAINÉ, 2004). Ademais, as bactérias diazotróficas podem promover o crescimento de plantas em virtude de diversos modos de ação, como a síntese de fitormônios (auxinas, citocininas e giberelinas), o controle biológico de fitopatógenos (sideróforos) e a solubilização de fosfatos.

As gramíneas como milho, arroz, trigo e cana-de-açúcar no Brasil apresentam avanço nas pesquisas com bactérias diazotróficas, bem como a disponibilidade no mercado de inoculante comercial para as três primeiras culturas. Diante desse cenário, a cultura do sorgo (*Sorghum bicolor* L.) que tem um papel importante na manutenção do homem no campo, devido às suas diversas formas de uso (grãos, forragem, silagem, energia e etanol) e do cultivo em diferentes condições edafoclimáticas, deve ser melhor estudada em relação à

associação com bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal. O sorgo é o quinto cereal mais importante, em termos de produção e área colhida no mundo, consistindo em uma das mais relevantes culturas alimentares em terras áridas em mais de 100 países, e é um alimento dietético de mais de 500 milhões de pessoas com maior insegurança alimentar (KUMAR et al., 2011). Culturas que visem à facilidade do manejo pelos produtores desprovidos de tecnologias devem ser mais estudadas, como a cultura do sorgo, que, em comparação com o milho, demanda uma menor quantidade de nutrientes, além de apresentar maior tolerância às pragas, às doenças e ao déficit hídrico. A adição de diazotrofos tem possibilitado aos produtores diminuir a dependência dos adubos químicos nitrogenados, que geralmente dificultam atingir o superávit econômico na atividade agrícola, em virtude dos custos elevados com esses insumos.

A inovação tecnológica por meio da utilização de bactérias diazotróficas, como biofertilizantes no campo, tem promovido uma agricultura com maior prestação de serviços ambientais, possibilitando a inclusão social de micro e pequenos produtores rurais na cadeia produtiva agropecuária. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal na cultura do sorgo, em condições gnotobióticas e em casa de vegetação, nos municípios de Seropédica-RJ e Colorado do Oeste-RO.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Experimento gnotobiótico de bactérias diazotróficas associadas ao sorgo forrageiro BRS 655

O experimento gnotobiótico foi conduzido no Laboratório de Gramíneas e em casa de vegetação na EMBRAPA Agrobiologia, no período de 10 de agosto a 05 de setembro de 2014. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 89 tratamentos e quatro repetições, totalizando 356 parcelas experimentais. Os tratamentos foram distribuídos em: 73 estirpes bacterianas isoladas de sorgo, 14 bactérias padrão, um não inoculado sem nitrogênio (N) e o outro sem inoculação e com N (100 kg ha^{-1}) (Tabelas 1 e 2). Nos tratamentos com bactérias não foi adicionado N. Um dia antes do início do experimento, as sementes de sorgo forrageiro BRS 655 foram colocadas para pré-germinar. As sementes foram inicialmente imersas em álcool 70% por 1 minuto e lavadas duas vezes sucessivas com água destilada estéril. A seguir, foram imersas em hipoclorito de sódio (NaOCl, 5%) por 5 minutos e posteriormente lavadas cinco vezes consecutivas com água destilada estéril. Após esse procedimento, as sementes foram alocadas em placas de petri contendo água-ágar (1%) e transferidas para câmara tipo B.O.D. Concomitantemente à pré-germinação, as estirpes bacterianas foram colocadas para crescer em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) por um período de 24 horas, sem luminosidade, a 30°C . No dia da inoculação foi preparada a solução de Hoagland para tubos sem N (HOAGLAND e ARNON, 1950), agarizada com 6 g L^{-1} . Os tubos apresentavam dimensão de 19,5 cm de comprimento e 2,9 cm de diâmetro, com capacidade para 120 mL. Em cada tubo de ensaio, foram adicionados 70 mL de solução de Hoagland, sendo vedados na parte superior com algodão e transferidos para esterilização em autoclave. Em

seguida à esterilização, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente, até que atingissem temperatura entre 30-35°C. Assim, foi inoculado 1 mL de cada estirpe bacteriana crescida no meio DYGS com população mínima de 10⁹ células bacterianas mL⁻¹ em cada tubo e colocado em uma célula de bandeja de isopor (144 células). Após a solidificação da solução de Hoagland nos tubos, foi efetuada a semeadura com as sementes pré-germinadas de sorgo em capela de fluxo laminar vertical. As sementes foram dispostas de modo que facilitasse a introdução da radícula na solução e o crescimento epígeo do caulículo.

Tabela 1 – Tratamentos do experimento gnotobiótico compostos por estirpes bacterianas diazotróficas isoladas de sorgo, bactérias padrão, testemunha sem inoculação e sem N, e tratamento sem inoculação e com adubação nitrogenada, em sorgo forrageiro BRS 655.

Espécie	Est./Trat.	Espécie	Est./Trat.	Espécie	Est./Trat.	Espécie	Est./Trat.
<i>A. formosense</i>	N1	<i>A. zeae</i>	J24	<i>A. melinis</i>	JV47	<i>A. amazonense</i>	L70
<i>A. brasilense</i>	N2	<i>A. zeae</i>	J25	<i>A. melinis</i>	JV48	<i>A. amazonense</i>	L71
<i>B. aerius</i>	N3	<i>A. zeae</i>	J26	<i>A. melinis</i>	JV49	<i>A. amazonense</i>	L72
<i>B. safensis</i>	N4	<i>A. formosense</i>	J27	<i>A. melinis</i>	JV50	<i>A. amazonense</i>	L73
<i>B. safensis</i>	N5	<i>A. melinis</i>	J28	<i>A. lipoferum</i>	JV51	<i>A. lipoferum</i>	S65 (74)
<i>B. safensis</i>	N6	<i>A. brasilense</i>	J29	<i>A. lipoferum</i>	JV52	<i>A. lipoferum</i>	S82 (75)
<i>B. safensis</i>	N7	<i>B. safensis</i>	J30	<i>A. lipoferum</i>	JV53	<i>A. amazonense</i>	Aam82 (76)
<i>B. safensis</i>	N8	<i>B. safensis</i>	J31	<i>A. amazonense</i>	L54	<i>A. amazonense</i>	AamS91 (77)
<i>B. safensis</i>	N9	<i>H. frisingense</i>	J32	<i>A. amazonense</i>	L55	<i>A. amazonense</i>	CBAmC (78)
<i>B. safensis</i>	N10	<i>H. frisingense</i>	J33	<i>A. amazonense</i>	L56	Inoculante	(79)
<i>A. brasilense</i>	N11	<i>A. melinis</i>	J34	<i>A. amazonense</i>	L57	Ni	J9 (80)
<i>A. brasilense</i>	N12	<i>A. melinis</i>	J35	<i>A. amazonense</i>	L58	Ni	1A (81)
<i>S. maltophilia</i>	N13	<i>A. formosense</i>	J36	<i>A. amazonense</i>	L59	Ni	37C (82)
<i>A. brasilense</i>	N14	<i>A. zeae</i>	J37	<i>A. amazonense</i>	L60	<i>G. diazotrophicus</i>	PAL5 (83)
<i>A. brasilense</i>	N15	<i>A. melinis</i>	J38	<i>A. amazonense</i>	L61	<i>A. brasilense</i>	Sp245 (84)
<i>A. brasilense</i>	N16	<i>A. brasilense</i>	J39	<i>A. amazonense</i>	L62	<i>H. seropedicae</i>	ZAE94(85)
<i>S. pavanii</i>	N17	<i>A. formosense</i>	J40	<i>A. amazonense</i>	L63	<i>H. seropedicae</i>	ZAE95 (86)
<i>A. brasilense</i>	J18	<i>A. brasilense</i>	J41	<i>A. amazonense</i>	L64	<i>Burkholderia</i> sp.	109 (87)
<i>H. seropedicae</i>	J19	<i>A. brasilense</i>	J42	<i>H. seropedicae</i>	L65	Test. s/i	88
<i>A. formosense</i>	J20	<i>A. brasilense</i>	J43	<i>A. amazonense</i>	L66	Trat. N	89
<i>A. formosense</i>	J21	<i>A. melinis</i>	JV44	<i>A. amazonense</i>	L67		
<i>A. formosense</i>	J22	<i>A. melinis</i>	JV45	<i>A. amazonense</i>	L68		
<i>A. zeae</i>	J23	<i>A. melinis</i>	JV46	<i>A. amazonense</i>	L69		

Est.=Estirpe bacteriana; Trat.=Tratamento; Tratamento 79=Inoculante comercial com *A. brasilense* estirpes AbV5 e AbV6; Tratamento 82=Ni, bactéria não identificada isolada da cultura do arroz; Test. s/i=Tratamento 88, testemunha sem inoculação com bactérias e sem adubação nitrogenada; Trat. N= Tratamento 89, tratamento sem inoculação com bactérias e adubado, proporcionalmente, com a dose de 100 kg de N ha⁻¹.

Tabela 2 – Bactérias utilizadas no experimento gnotobiótico em sorgo forrageiro BRS 655 em Seropédica-RJ.

Isolado	Espécie	Planta	Referência
S65	<i>Azospirillum lipoferum</i>	Sorgo	Pereira et al. 1988.
S82	<i>Azospirillum lipoferum</i>	Sorgo	Pereira et al. 1988.
Aam82	<i>Azospirillum amazonense</i>	Arroz	Pereira et al. 1988.
AamS91	<i>Azospirillum amazonense</i>	Sorgo	Pereira et al. 1988.
CBAmC	<i>Azospirillum amazonense</i>	Cana-de-açúcar	--
AbV5 e AbV6 ¹	<i>Azospirillum brasilense</i>	--	--
J9	Sem identificação	Milho	Santos et al. 2015.
1A	Sem identificação	Arroz	Viana, 2012.
37C	Sem identificação	Arroz	Viana, 2012.
Pal5	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Cana-de-açúcar	--
Sp245	<i>Azospirillum brasilense</i>	Trigo	--
ZAE94	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Arroz	--
ZAE95	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Arroz	Pereira et al. 1988.
109	<i>Burkholderia kururiensis</i>	Arroz	Santos et al. 2017.

¹Estirpes bacterianas utilizadas para produção de Inoculante comercial recomendado para gramíneas como milho, arroz e trigo.

Aos 26 dias após a semeadura (DAS), foi efetuada a colheita das plantas de sorgo dos tubos de ensaio. As plantas de sorgo foram seccionadas em parte aérea e raiz. Inicialmente, mediu-se o comprimento da parte aérea (CPA), com régua milimetrada da base do caule até a inserção da folha do ápice, sendo posteriormente pesada e transportada em saco de papel para secagem em estufa a 55°C até atingir peso constante (~ 48 h). Em seguida à secagem, a parte aérea foi pesada e determinada a sua massa seca (MSPA). As raízes foram secas em papel toalha e pesadas para obtenção do peso fresco. Logo em seguida, foram avaliadas a morfologia radicular por intermédio do *software* WinRHIZO Arabidopsis (Regent Instruments Inc., Canada), acoplado a um scanner profissional EPSON Expression 10000 XL. O *software* WinRHIZO determina as características morfológicas das raízes (comprimento e área superficial), utilizando o método de interseção de Tennant (1975), exceto para o volume. As imagens geradas foram negativas com resolução de 600 dpi em formato tiff. As

raízes foram dispostas em cuba com 2 cm de profundidade, 40 cm de comprimento e 30 cm de largura, e preenchidas com uma lâmina de água de 1 cm. Foram colocadas as quatro raízes de cada tratamento, para a realização da leitura. Foram determinadas as seguintes características morfológicas das raízes: comprimento total de raiz (CTR, em cm); comprimento de raízes grossas (CRG, >3,0 mm de diâmetro); comprimento de raízes finas (CRF, 1,5 a 3,0 mm de diâmetro); comprimento de raízes muito finas (CRMF, até 1,5 mm de diâmetro); volume total de raiz (VTR, em mm³); volume de raízes grossas (VRG, >3,0 mm de diâmetro); volume de raízes finas (VRF, 1,5 a 3,0 mm de diâmetro); volume de raízes muito finas (VMRF, até 1,5 mm de diâmetro); área superficial total de raiz (ATR, em cm²); área superficial de raízes grossas (ARG, >3,0 mm de diâmetro); área superficial de raízes finas (ARF, 1,5 a 3,0 mm de diâmetro); área superficial de raízes muito finas (ARMF, até 1,5 mm de diâmetro); número de pontas total de raízes (PTR); número de pontas de raízes grossas (PRG, >3,0 mm de diâmetro); número de pontas de raízes finas (PRF, 1,5 a 3,0 mm de diâmetro); número de pontas de raízes muito finas (PRMF, até 1,5 mm de diâmetro). Após o escaneamento, as raízes foram colocadas em sacos de papel e transferidas para a secagem em estufa a 55°C, até obtenção de peso constante (~48 h), sendo pesadas e determinadas as massas secas de raiz (MSR). O comprimento específico radicular (CER) foi definido pela razão entre o CTR e a MSR.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de agrupamento de médias Scott-Knott, a 5% de significância.

2.2 Bactérias diazotróficas associadas aos sorgos forrageiro e granífero em casa de vegetação

Os experimentos em casa de vegetação foram conduzidos na EMBRAPA Agrobiologia, em Seropédica-RJ, e no Instituto Federal de

Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Campus Colorado do Oeste, em Colorado do Oeste-RO. Os solos foram classificados como PLANOSSOLO Háptico distrófico em Seropédica-RJ e ARGISSOLO Vermelho eutrófico em Colorado do Oeste – RO (SANTOS et al., 2013). Foram coletados solos em cada localidade na profundidade de 0-20 cm, para enchimento dos vasos e para as análises químicas conforme estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise química dos solos coletados nas áreas experimentais para os experimentos em casa de vegetação.

Localidade	pH (H ₂ O)	P mg dm ⁻³	cmol, dm ⁻³ de solo							V ³ (%)	MO ⁴ g dm ⁻³
			K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H ⁺	SB ¹	T ²		
SD ⁵	5,4	8,3	0,1	1,1	0,7	0,06	3,5	1,9	5,4	35,2	11,0
CO ⁶	6,6	32,2	0,4	7,5	2,1	0,0	1,4	10,0	11,4	87,7	47,1

¹Soma de bases trocáveis; ²CTC a pH 7,0; ³V= Saturação de bases; ⁴MO=Matéria orgânica; ⁵SD=Seropédica-RJ; ⁶CO=Colorado do Oeste-RO.

O delineamento estatístico foi em bloco casualizados, com 21 tratamentos e 5 repetições, totalizando 105 parcelas experimentais. Foram selecionadas 13 estirpes bacterianas do experimento gnotobiótico e incluídas duas bactérias padrão (Sp245 e ZAE94) e o inoculante comercial (AbV5 e AbV6), além dos tratamentos sem inoculação (Tabela 4). Foram realizados dois experimentos em cada localidade, um com sorgo granífero BRS 332 e o outro com sorgo forrageiro BRS 655.

Os solos coletados foram peneirados e colocados em betoneira por 5 min para homogeneização com os fertilizantes. Os solos foram fertilizados com 50 mg dm⁻³ de P₂O₅, 100 mg dm⁻³ de K₂O e 100 kg FTE BR ha⁻¹ (micronutrientes). O nitrogênio foi aplicado conforme os tratamentos (Tabela 4). Os vasos utilizados apresentavam capacidade para 15 L, sendo desinfestados previamente com hipoclorito de sódio a 3% e, posteriormente, preenchidos com 14 kg de solo. Para cada recipiente, foram aplicados 3,7 g de superfosfato simples, 2,9 g

de sulfato de potássio e 700 mg de FTE BR. Nos tratamentos com nitrogênio, foram adicionados 0,7 g (20 kg de N ha⁻¹), 1,4 g (40 kg de N ha⁻¹), 2,8 g (80 kg de N ha⁻¹) e 4,2 g de sulfato de amônio (120 kg de N ha⁻¹) por vaso. No solo de Seropédica-RJ, foi efetuada a correção do solo aplicando calcário de reação rápida (*filler*), 15 dias antes da semeadura.

Tabela 4 – Tratamentos utilizados em casa de vegetação nos sorgos granífero BRS 332 e forrageiro BRS 665 cultivados em Seropédica – RJ e Colorado do Oeste – RO.

*Trat.	Estirpe/Tratamento	Espécie
1	N5	<i>B. safensis</i>
2	N11	<i>A. brasilense</i>
3	N17	<i>S. pavanii</i>
4	J36	<i>A. formosense</i>
5	J39	<i>A. brasilense</i>
6	JV49	<i>A. melinis</i>
7	JV50	<i>A. melinis</i>
8	L60	<i>A. amazonense</i>
9	L66	<i>A. amazonense</i>
10	L72	<i>A. amazonense</i>
11	Aam82	<i>A. amazonense</i>
12	J9	<i>H. frisingense</i>
13	1A	<i>H. seropedicae</i>
14	Inoculante (AbV5 e AbV6)	<i>A. brasilense</i>
15	Sp245	<i>A. brasilense</i>
16	ZAE94	<i>H. seropedicae</i>
17	0 kg N ha ⁻¹	Não inoculado
18	20 kg N ha ⁻¹ (Testemunha das estirpes)	Não inoculado
19	40 kg N ha ⁻¹	Não inoculado
20	80 kg N ha ⁻¹	Não inoculado
21	120 kg N ha ⁻¹	Não inoculado

*Todos os tratamentos inoculados com estirpes bacterianas foram aplicados uma dose de 20 kg N ha⁻¹ na semeadura do sorgo.

Paralelamente à adubação dos solos e enchimento dos vasos, foi preparado o inoculante turfoso com as estirpes bacterianas selecionadas no experimento gnotobiótico, bem como das duas estirpes de bactérias padrão, *A. brasilense* Sp245 e *H. seropedicae* ZAE94 (Tabela 4). Foram preparados 15

sacos com 35 g de turfa corrigida (pH 6,0) esterilizada por duas vezes. As colônias puras de estirpes bacterianas foram crescidas inicialmente em tubos contendo 5 mL de DYGS por 24 h, em temperatura constante de 30°C e sem luz. Posteriormente, os 5 mL do caldo (DYGS com estirpe bacteriana) foram transferidos para erlenmeyer contendo 100 mL de DYGS, por 24 h, a 30°C, sem luminosidade. Do novo caldo, foram injetados 20 mL em saco contendo turfa, para cada estirpe bacteriana individualmente. O caldo foi homogeneizado com a turfa, para maior uniformidade na distribuição das bactérias no interior do saco, sendo transferido para estufa a 30°C, por 24 h.

Nos inoculantes turfosos, foi realizada a diluição seriada de 10^{-2} a 10^{-9} para confirmação da população, para posterior inoculação das sementes, de acordo com o método do número mais provável (NMP), conforme descrito por Döbereiner et al. (1995).

No dia da semeadura, foi preparada uma solução de polvilho doce (3%) para aplicação do inoculante turfoso. As turfas contendo as estirpes bacterianas foram misturadas com uma alíquota de solução de polvilho e aplicadas sobre as sementes de sorgo até a cobertura total das mesmas. Os tratamentos com ausência de bactérias (17 a 21) também foram cobertos com turfa estéril sem estirpe bacteriana.

2.2.1 Bactérias diazotróficas associadas ao sorgo forrageiro em casa de vegetação

Inicialmente, foi implantado um experimento para avaliação das estirpes bacterianas no desenvolvimento inicial do sorgo forrageiro BRS 655 em casa de vegetação na EMBRAPA Agrobiologia em Seropédica-RJ. Foram testados 21 tratamentos (Tabela 4), com cinco repetições, totalizando 105 parcelas experimentais. Foram semeadas quatro sementes por vaso e aos 10 dias após a

semeadura (DAS), ocorreu a retirada de duas plantas, mantendo duas plantas por vaso. No período da fase experimental, foram avaliados a altura nos estádios de crescimento (EC1), V4 (AV4) e V8 (AV8), bem como o diâmetro do colmo no estádio V8 (DV8). Aos 30 dias após a emergência, houve a colheita das plantas de sorgo, sendo separadas em parte aérea e raízes. A parte aérea foi pesada em balança analítica para obtenção da massa fresca (MFPA) e acondicionadas em saco de papel para secagem em estufa de circulação forçada de ar, sob temperatura de 60°C, por um período de 48 h, aproximadamente. Em seguida, a parte aérea seca foi pesada e obtida a massa seca de parte aérea (MSPA). As raízes colhidas também foram acondicionadas em sacos de papel e transferidas para estufa com temperatura de 60°C, até atingir peso constante. Então, foram pesadas para aquisição de massa seca de raiz (MSR). Para o cálculo do índice de colheita, foi realizado o somatório de MSR mais MSPA, para obtenção da massa seca total da planta (MSTP). A porcentagem de matéria seca de raiz (PMR) e de parte aérea (PMPA) foram obtidas pela equação: $MSR \times 100/MFR$ e $MSPA \times 100/MFPA$, respectivamente.

O índice de colheita (IC, em %) foi calculado pela equação: $MSPA/MSTP \times 100$.

Os experimentos de estirpes bacterianas associadas ao sorgo forrageiro BRS 655 em casa de vegetação foram conduzidos, concomitantemente, no período de 04 de fevereiro a 21 de março de 2015 em Seropédica-RJ e Colorado do Oeste-RO.

Foram semeadas quatro sementes por vaso, na profundidade aproximada de 2 cm. A emergência ocorreu no quarto DAS. Aos 11 DAS foi efetuado o desbaste das plantas, mantendo duas plantas por vaso. A altura foi efetuada com o auxílio de uma régua milimetrada da base do colmo até a lígula da folha, nos estádios fenológicos determinados. A altura foi mensurada nos estádios fenológicos V4, V6, V8 e V10. O diâmetro foi efetuado nos estádios fenológicos

V4, V6 e V10 com o auxílio de um paquímetro digital na base do colmo, acima do primeiro nó. No final do estágio vegetativo, aos 45 DAS, foram colhidas as duas plantas de cada vaso. Inicialmente, foi retirada a parte aérea, sendo seccionadas em folhas e colmos, e pesadas em balança analítica, para a obtenção da massa fresca média de colmo (MFC) e folhas (MFF). Em seguida à pesagem, as folhas e colmos, separadamente, foram acondicionados em sacos de papel e transferidos para estufa a 60°C, até atingirem peso constante. Então, as plantas secas foram pesadas para obtenção da massa seca média de colmo (MSC) e de folhas (MSF). De cada peso obtido foi calculada a média entre as duas plantas. A MFPA foi obtida pelo somatório de MFC e MFF, bem como a MSPA, resultante da soma de MSC e MSF.

No mesmo dia da colheita da parte aérea, foram coletadas as raízes dos vasos, as quais foram colocadas sobre peneiras e lavadas em água corrente para retirada do solo aderido entre as raízes. As raízes limpas ficaram expostas ao ar sobre papel toalha para saída do excesso de água, e então, foram empacotadas em sacos de papel e transferidas para secagem em estufa a 60° até atingirem peso constante. As raízes secas foram então pesadas em balança analítica de precisão, para obtenção da MSR. Com os dados de MSR e MSPA foi obtido o IC.

As amostras foram moídas em moinho de facas com peneira de malha de 1 mm e, posteriormente, foram submetidas à análise de determinação de N segundo o método Kjeldahl (SILVA e QUEIROZ, 2004). De cada tratamento, foram utilizadas apenas três amostras de cada componente morfológico para esta análise.

Os valores de N foram utilizados para adquirir a porcentagem de N total (%NT), os teores e a partição percentual de N nos componentes morfológicos e na planta inteira de sorgo. As equações utilizadas foram: **Teor de N do tecido vegetal (TN)** = $[(\%N \text{ no tecido vegetal} \times \text{massa seca do tecido vegetal})/100] \times$

1000, em mg; $\%NT = (\Sigma N \times 100)/PST$, em que ΣN = somatório dos teores de N da planta e MSPI = massa seca total da planta inteira, em mg; **Partição percentual do tecido vegetal (PN)** = (teor de N do tecido vegetal/MSPI) x 100.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de agrupamento de médias Scott-Knott, a 5% de significância, utilizando o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011).

Para observação do efeito do N isoladamente, foi realizada a análise de regressão para as variáveis MSR, MSC, MSF, MSPA e (MSPI) em relação aos tratamentos sem inoculação e com doses crescentes de N.

2.2.2 Bactérias diazotróficas associadas ao sorgo granífero em casa de vegetação

O experimento de sorgo granífero BRS 332 foi cultivado em casa de vegetação, em Seropédica-RJ, no período de 03 de junho a 22 de setembro de 2015. Em Colorado do Oeste-RO, foi no período de 29 de junho a 07 de setembro de 2015.

Foram semeadas quatro sementes por vaso, e aos 15 DAS realizou-se o desbaste, mantendo duas plantas por vaso. Durante a fase experimental de crescimento vegetativo do sorgo granífero foram realizadas as avaliações biométricas. No experimento em Seropédica-RJ, as avaliações biométricas (altura e diâmetro) foram realizadas nos estádios V4, V6, V8, V10 e VT (emissão da panícula) para altura e nos estádios V4, V6 e V10 para diâmetro no experimento em Seropédica-RJ. No experimento em Colorado do Oeste-RO, as avaliações biométricas foram efetuadas nos estádios V2, V4, V6, V8 e V10 para altura e V2, V4, V6 e V8 para diâmetro.

No final da fase vegetativa do sorgo (VT), foi realizada a colheita da parte aérea de uma planta, aos 46 DAS. A parte aérea foi separada em colmo e

folhas, sendo pesadas e secas a 60°C, em estufa de circulação forçada de ar, por 72 h. Após a secagem, as folhas e colmos foram pesados em balança analítica para a obtenção da MSC e MSF. A MSPA foi obtida pela soma das MSC e MSF.

As plantas de sorgo remanescentes nos vasos foram mantidas até completarem o ciclo reprodutivo. Aos 110 DAS, as plantas foram colhidas começando pela parte aérea. A parte aérea foi seccionada em colmo, folhas e panícula para pesagem e secagem. A panícula foi pesada com os grãos, e depois, separadamente. Todos os componentes morfológicos foram secos em estufa a 60°C por 72 h. Assim, obtiveram-se as MFC, MFF, massa fresca de panícula com grãos (MFP), MSC, MSF, massa seca de panícula com grãos (MSP). Os grãos de cada panícula foram contabilizados e pesados para obtenção do número de grãos (NG), massa seca de grãos (MSG) e massa seca por grão (MG). A massa seca de folha e colmo (MSFC) foi calculada pelo somatório de MSC e MSF. A MFPA foi obtida pela soma das MFC, MFF e MFP, ao passo que a MSPA, considerou-se os pesos secos destes mesmos componentes morfológicos.

Paralelamente à colheita da parte aérea, removeram-se as raízes dos vasos para lavagem em água corrente, as quais foram secas em estufa a 60°C, por 72 h. Então, as raízes foram pesadas para obtenção de MSR. A MSPI foi obtida pela soma de MSR e MSPA. O IC foi calculado pela equação: $MSG/MSTP \times 100$.

As amostras de tecidos vegetais foram moídas em moinho de facas com peneira de malha de 1 mm para análise de determinação de N, pela metodologia descrita por Silva e Queiroz (2004). As análises de N foram realizadas em três repetições por tratamento. Os valores de N foram utilizados para determinar os teores de N nas raízes (TNR), no colmo (TNC), nas folhas (TNF), na panícula sem grãos (TNP) e nos grãos (TNG), e o somatório de todos os teores resultou

no teor de nitrogênio na planta inteira (TNPI). O %NT foi utilizado para determinar os teores de N por tecido vegetal.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de agrupamento de médias Scott-Knott, a 5% de significância. Os tratamentos sem inoculação bacteriana e com doses crescentes de N foram avaliados pela análise de regressão, por intermédio do SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Bactérias diazotróficas associadas com sorgo forrageiro em condições gnotobióticas

Houve diferença significativa para as variáveis MFR, MSR, PMR, MFPA, MSPA e PMPA (Tabela 5). O tratamento com N, simulando o suprimento de 100 kg ha⁻¹, foi superior para as MFR, MSR, MFPA e MSPA, demonstrando a importância do N no desenvolvimento da planta. Dos 87 tratamentos inoculados com estirpes bacterianas, aproximadamente, 50% foram superiores à testemunha sem inoculação em MFR, sendo que os tratamentos N5, N11, N16, J36, JV49, JV51, L66 e L68 destacaram-se apresentando incremento acima de 25%. No entanto, este aumento na MFR não foi suficiente para influenciar significativamente a MSR em relação à testemunha devido, principalmente, aos PMR serem menores nestes tratamentos. A testemunha apresentou PMR superior a 83% dos tratamentos, o que conferiu similaridade na MSR com os tratamentos inoculados com estirpes bacterianas. As bactérias J36, J39, JV49, JV50, L60, L72, J9, PAL5 e L66 apresentaram acréscimos acima de 10% na MSR, em relação à testemunha. As MFPA e MSPA também não foram influenciadas significativamente pela inoculação com estirpes bacterianas. Os isolados N9, J36, JV49, L66, L72 e Aam82 proporcionaram MFPA acima de 16% em relação ao teste sem inoculação, enquanto que para MSPA os diazotrofos J36, JV50, L58, L66 e Aam82 condicionaram acréscimo superior a 20%. É provável que, em virtude do coeficiente de variação alto para este tipo de estudo, não foi possível detectar diferença estatística. Em relação a PMPA o coeficiente de variação baixo possibilitou diferenciar estatisticamente os tratamentos, onde se constatou que 37 estirpes apresentaram PMPA superior à testemunha. De acordo com Bashan e Levanony (1990), aumentos moderados, em torno de 20%, atribuídos à inoculação com diazotróficos endofíticos, podem ser considerados comercialmente significativos na agricultura moderna.

Tabela 5 – Efeito de estirpes bacterianas diazotróficas isoladas do sorgo e bactérias tipo diazotróficas sobre a massa fresca de raiz (MFR), massa seca de raiz (MSR), porcentagem de matéria seca de raiz (PMR), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa seca de parte aérea (MSPA) e porcentagem de matéria seca de parte aérea (PMPA) de sorgo forrageiro BRS 655 em experimento gnotobiótico.

Estirpe/ Tratamento	MFR (mg)	MSR (mg)	PMR (%)	MFPA (mg)	MSPA (mg)	PMPA (%)	Estirpe/ Tratamento	MFR (mg)	MSR (mg)	PMR (%)	MFPA (mg)	MSPA (mg)	PMPA (%)
N1	503,0c	30,1b	6,1c	234,8b	42,8b	18,2b	J27	515,6c	33,3b	6,5c	255,1b	48,0b	18,7a
N2	603,2b	30,7b	5,2d	293,0b	50,0b	17,0b	J28	558,4b	37,4b	6,8b	261,9b	50,9b	19,4a
N3	610,1b	26,2b	4,3d	260,2b	45,3b	17,4b	J29	563,1b	38,2b	6,7b	275,7b	55,4b	20,1a
N4	573,0b	27,9b	4,8d	258,4b	45,8b	17,7b	J30	388,8c	27,1b	7,0b	189,8b	37,0b	19,5a
N5	636,4b	34,9b	5,4d	278,3b	46,3b	16,5b	J31	537,4c	36,7b	6,8b	270,1b	54,6b	20,2a
N6	579,2b	34,1b	5,8c	255,8b	44,8b	17,4b	J32	552,7b	37,4b	6,9b	273,9b	53,7b	19,7a
N7	548,7b	30,0b	5,5d	222,8b	38,3b	17,1b	J33	559,3b	37,0b	6,6c	273,7b	53,8b	19,6a
N8	520,8c	31,5b	6,1c	252,1b	44,7b	17,7b	J34	546,5b	34,7b	6,3c	262,7b	51,2b	19,4a
N9	565,6b	38,0b	6,7b	311,3b	55,5b	17,8b	J35	443,4c	30,9b	7,0b	213,4b	43,2b	20,0a
N10	633,7c	36,8b	6,2c	276,9b	50,1b	17,9b	J36	687,9b	41,3b	5,9c	300,7b	57,4b	19,0a
N11	638,1b	37,1b	5,8c	282,5b	50,6b	17,8b	J37	495,8c	31,1b	6,4c	229,9b	45,5b	19,4a
N12	567,3b	34,6b	6,1c	272,1b	48,6b	17,9b	J38	441,2c	27,6b	6,3c	194,3b	38,0b	19,3a
N13	616,4b	36,9b	6,0c	289,9b	51,3b	17,7b	J39	579,9b	43,7b	7,6a	284,7b	51,7b	18,1b
N14	452,2c	31,6b	7,1b	203,8b	35,9b	17,4b	J40	500,0c	33,8b	6,8b	246,2b	43,8b	17,7b
N15	494,7c	34,5b	7,1b	255,6b	46,2b	18,1b	J41	467,3c	34,3b	7,3b	243,5b	43,4b	17,8b
N16	772,8b	37,5b	4,9d	271,6b	49,7b	18,2b	J42	492,9c	36,2b	7,4b	234,8b	43,6b	18,6 ^a
N17	603,7b	39,8b	6,6c	280,5b	50,2b	17,9b	J43	477,4c	34,6b	7,4b	258,0b	46,5b	18,0b
J18	507,5c	30,1b	5,9c	239,8b	41,8b	17,4b	JV44	527,8c	38,6b	7,3b	277,9b	52,9b	19,1 ^a
J19	479,3c	31,9b	6,6c	239,5b	41,5b	17,3b	JV45	547,1b	38,4b	7,0b	254,0b	47,1b	18,5b
J20	527,4c	32,3b	6,2c	218,6b	39,3b	17,9b	JV46	470,0c	33,4b	7,1b	219,7b	48,3b	22,0a
J21	519,8c	35,2b	6,8b	258,9b	46,4b	17,9b	JV47	559,3b	37,2b	6,8b	263,7b	48,3b	18,4b
J22	564,2b	35,8b	6,4c	255,6b	43,2b	16,8b	JV48	529,4c	36,2b	6,8b	264,7b	47,7b	18,1b
J23	611,7b	38,2b	6,3c	273,7b	50,4b	18,4b	JV49	670,6b	43,9b	6,6c	309,7b	56,3b	18,1b
J24	534,3c	36,6b	6,8b	257,9b	45,6b	17,7b	JV50	599,7b	46,5b	7,7a	293,5b	57,1b	19,3 ^a
J25	603,2b	40,1b	6,7b	275,0b	50,0b	18,2b	JV51	645,2b	38,5b	6,0c	266,8b	48,6b	18,3b
J26	606,5b	35,3b	5,8c	273,7b	49,8b	18,2b	JV52	587,4b	39,4b	7,0b	254,7b	50,1b	19,6 ^a

Tabela 5 – Continuação.

Estirpe/ Tratamento	MFR (mg)	MSR (mg)	PMR (%)	MFPA (mg)	MSPA (mg)	PMPA (%)	Estirpe/ Tratamento	MFR (mg)	MSR (mg)	PMR (%)	MFPA (mg)	MSPA (mg)	PMPA (%)
JV53	534,7c	32,2b	6,0c	239,2b	45,7b	19,1a	L72	540,3c	42,2b	7,9a	305,7b	59,0b	19,2a
L54	615,8b	35,8b	5,9c	284,7b	56,0b	19,5a	L73	422,9c	31,5b	7,5b	215,7b	39,6b	18,6a
L55	530,0c	37,3b	7,0b	275,9b	53,5b	19,3a	S65	505,7c	38,8b	7,0b	260,9b	49,6b	18,6a
L56	497,0c	38,6b	7,7a	271,6b	52,2b	19,2a	S82	459,3c	35,2b	7,6a	255,2b	48,9b	19,1a
L57	531,6c	38,6b	7,2b	289,6b	53,3b	18,4b	Aam82	566,7b	40,3b	7,1b	322,7b	61,5b	19,1a
L58	518,1c	38,8b	7,5b	287,1b	56,1b	19,5a	AamS91	471,8c	37,4b	7,9a	271,4b	51,0b	18,8a
L59	425,0c	33,2b	7,9a	258,3b	50,3b	19,5a	CBAmC	482,5c	39,5b	8,2a	266,6b	50,9b	19,1a
L60	564,2b	41,4b	7,3b	262,0b	49,4b	18,8a	Inoculante	455,9c	34,7b	7,7a	228,2b	42,0b	18,5b
L61	479,7c	38,6b	8,0a	266,6b	49,1b	18,4b	J9	543,6b	41,6b	7,7a	287,3b	53,3b	18,3b
L62	489,2c	34,8b	7,2b	243,5b	46,2b	19,0a	1^a	530,8c	40,4b	7,6a	272,9b	52,4b	19,2 ^a
L63	494,7c	35,4b	7,2b	242,4b	46,0b	19,1a	37C	548,5b	38,7b	7,4b	265,4b	51,2b	19,2 ^a
L64	404,6c	33,3b	8,2a	247,0b	49,2b	20,1a	PAL5	457,0c	41,1b	8,7a	285,4b	54,7b	19,0a
L65	567,6b	33,3b	6,8b	287,7b	58,3b	20,2a	Sp245	430,1c	36,0b	8,2a	229,6b	40,8b	18,0b
L66	661,0b	48,8b	7,3b	359,4b	71,2b	19,7a	ZAE94	495,7c	36,9b	7,2b	279,7b	46,0b	15,4b
L67	498,2c	35,7b	7,1b	215,4b	41,6b	19,3a	ZAE95	481,9c	38,4b	8,0a	264,1b	49,0b	18,5b
L68	636,3b	36,5b	5,7c	278,2b	53,7b	19,2a	109	437,3c	37,0b	8,4a	253,7b	47,2b	18,5b
L69	526,2c	38,8b	7,3b	281,0b	49,9b	17,8b	Test. s/i¹	463,2c	37,0b	8,0a	250,3b	45,7b	18,3b
L70	466,8c	31,4b	6,8b	276,7b	51,4b	18,5b	Trat. N²	1482,5a	110,1a	7,4b	913,7a	145,8a	15,9b
L71	516,9c	37,5b	7,3b	275,9b	52,1b	18,8a							
CV(%)	20,25	18,43	11,84	18,61	21,04	6,40	CV(%)	20,25	18,43	11,84	18,61	21,04	6,40

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes entre as colunas de mesma variável diferem entre si pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade; ¹Test. s/i=Testemunha sem inoculação com bactérias e sem adubação nitrogenada; ²Trat. N=Testemunha sem inoculação com bactérias e adubada com 100 kg N ha⁻¹.

Apesar de não ter havido diferença estatística em MSR e MSPA entre os isolados bacterianos e a testemunha, foi possível observar durante a fase experimental que as plantas inoculadas expressavam fenotipicamente maior desenvolvimento vegetal da parte aérea e das raízes, como demonstrado na Figura 1, representado pelos isolados *A. brasilense* J39 e *A. amazonense* L72. Ademais, o efeito de N é facilmente observado no tratamento 89, demonstrando sua importância no crescimento da parte aérea e raízes das plantas.

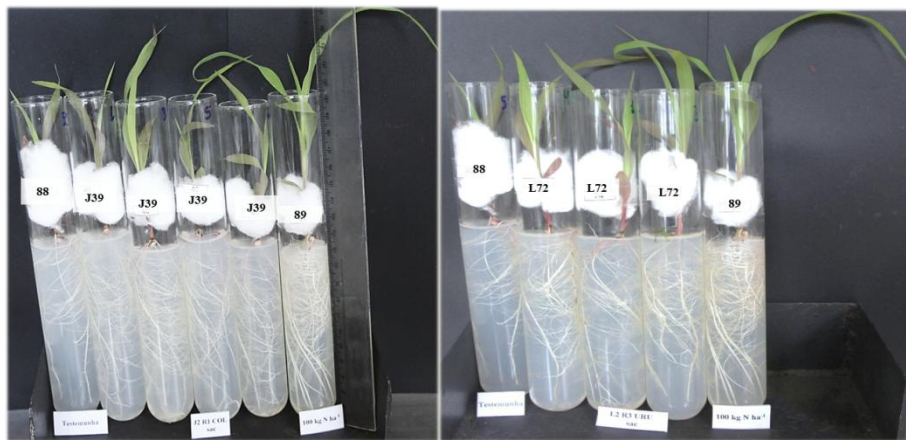


Figura 1 – Efeito das estirpes bacterianas *Azospirillum brasilense* J39 e *Azospirillum amazonense* L72 sobre o sorgo forrageiro BRS 655 em comparação com a testemunha (88, sem inoculação) e com tratamento sem inoculação e fertilizado, proporcionalmente, com 100 kg N ha⁻¹ (89):

O comprimento da parte aérea (CPA) não foi influenciado pelos isolados bacterianos e pela fertilização nitrogenada. O comprimento total de raízes (CTR), comprimento de raízes grossas (CRG) e o comprimento de raízes mais finas (CRMF) foram superiores em 39%, 54% e 49% dos tratamentos isolados com diazotrofos quando contrastados com a testemunha, respectivamente. Entretanto, para o CRF a testemunha foi similar a 54% das estirpes bacterianas e superiores às demais (Tabela 6). Assim, considerando o CTR demonstrou a capacidade de diversas bactérias diazotróficas promoverem o crescimento de

raízes nas plantas de sorgo. De acordo com alguns pesquisadores, isolados de *Azospirillum* spp promovem diversas modificações na morfologia das raízes, como aumento em número, comprimento, área e incremento em absorção mineral, que podem estar relacionados a substâncias promotoras de crescimento secretadas por estes microrganismos (MARTIN et al., 1989; ROESCH et al., 2005).

Bactérias de diversas espécies comprovaram a potencialidade em estimular o CTR acima de 15%, principalmente, as estirpes de *A. amazonense* Aam82, *A. formosense* J36, *A. melinis* JV50, *H. frisingense* J9, *A. melinis* JV49, *A. brasilense* J39, *B. safensis* N4, *B. safensis* N5, *S. pavanii* N17 e *B. safensis* J31, em ordem decrescente. Destas, duas são bactérias heterólogas, a Aam82 e J9, enquanto as demais são homólogas, ou seja, isoladas de sorgo, demonstrando que o crescimento radicular da planta de sorgo independe da espécie vegetal em que foi isolado. Considerando estes isolados para o CRG, apenas as estirpes N4 e N5 não foram superiores à testemunha.

A maior extensão radicular oportuniza as plantas atingirem novos nichos no ambiente edáfico para absorção de água e nutrientes, além de beneficiar a interação com microrganismos. Os isolados bacterianos L66, JV50, J36, JV49, J9, ZAE95, L71, L69, L72 e PAL5, em ordem decrescente, possibilitaram um aumento entre 20 a 28% no CRG. Battarai e Hess (1998) concluíram que, ao lado da FBN, o efeito de estimulação de crescimento pela bactéria no desenvolvimento das raízes, nos primeiros estádios de crescimento da planta, pode ser responsável pelo impacto positivo da inoculação. Observa-se que os diazotróficos do gênero *Azospirillum* foram os que propiciaram o maior crescimento radicular das plantas de sorgo. Considerando que estas bactérias relativamente fixam quantidade relativamente pequena de N, outros fatores podem estar envolvidos na contribuição para o crescimento das plantas, entre eles a síntese de hormônios vegetais (RUDNICK et al., 1997).

Tabela 6 – Efeito das estirpes bacterianas na morfologia radicular de sorgo forrageiro BRS 655 cultivado em condições gnotobióticas em casa de vegetação no município de Seropédica - RJ.

Estirpe/ Tratamento	CPA (cm)	CTR (cm)	CRG (cm)	CRF (cm)	CRMF (cm)	VTR (mm ³)	VRG (mm ³)	VRF (mm ³)	VRMF (mm ³)	ATR (cm ²)	ARG (cm ²)	ARF (cm ²)	ARMF (cm ²)
N1	15,0	630,4b	115,1c	310,1b	204,4b	502,7c	342,6c	134,3	19,4b	62,9b	21,0c	22,3	6,8b
N2	15,3	675,0b	135,0b	327,1b	212,1b	578,9b	410,6c	147,9	19,4b	69,9b	24,7b	24,0	6,8b
N3	15,6	685,8b	119,7c	313,0b	252,0a	493,8c	370,8c	132,2	22,5a	65,2b	22,3c	22,2	8,1a
N4	16,0	807,9a	126,4c	382,1a	298,2a	556,5b	383,0c	162,5	26,8a	75,0b	22,9c	27,2	9,6a
N5	16,1	804,0a	123,3c	380,4a	299,0a	571,3b	355,6c	162,7	26,4a	75,8b	22,3c	27,2	9,5a
N6	16,5	659,8b	122,9c	304,5b	231,5a	499,0b	416,2c	128,5	20,7a	64,3b	23,2c	21,6	7,4a
N7	14,8	671,7b	106,9c	307,9b	255,8a	437,7c	295,4c	128,4	23,0a	60,6b	18,9c	21,7	8,2a
N8	16,3	515,0b	116,4c	271,1b	126,8b	500,2c	349,8c	115,8	11,8b	56,7b	21,2c	19,3	4,1b
N9	15,5	673,4b	133,1b	352,1a	187,3b	680,4b	401,7c	154,6	17,4b	75,1b	24,3c	25,4	6,2b
N10	14,9	556,9b	121,7c	281,0b	153,5b	530,4c	380,4c	124,9	13,8b	60,5b	22,8c	20,5	4,9b
N11	16,3	758,1a	136,1b	362,2a	258,7a	568,6b	432,1b	156,9	23,7a	73,5b	25,2b	26,0	8,4a
N12	16,3	636,8b	113,6c	323,4b	198,9b	490,6c	356,8c	143,5	18,4b	62,5b	20,8c	23,5	6,5b
N13	14,3	751,6a	141,8b	347,4a	261,3a	573,6b	438,9b	147,3	24,0a	73,5b	26,2b	24,6	8,5a
N14	14,8	537,8b	116,5c	274,4b	146,2b	481,2c	354,6c	119,5	13,7b	57,0b	21,3c	19,7	4,7b
N15	16,4	617,6b	125,8c	315,8b	175,2b	527,1c	405,6c	140,2	15,9b	63,8b	23,4c	22,9	5,6b
N16	14,6	610,2b	113,3c	288,6b	207,5b	468,0c	386,7c	122,8	17,7b	59,8b	21,6c	20,5	6,4b
N17	15,1	799,8a	140,6b	366,2a	291,9a	567,9b	453,5b	155,7	26,6a	75,5b	25,9b	26,0	9,5a
J18	14,1	629,0b	115,6c	321,4b	191,0b	483,8c	338,2c	134,7	17,1b	61,8b	20,7c	22,7	6,1b
J19	15,1	603,6b	123,3c	285,5b	194,0b	511,6c	384,4c	121,2	17,5b	61,9b	22,9c	20,3	6,2b
J20	15,5	620,5b	108,8c	298,1b	212,7b	459,2c	368,2c	125,2	19,7b	59,8b	20,4c	21,1	6,9b
J21	16,2	668,4b	129,5c	312,3b	225,7a	520,0c	403,6c	132,2	20,1b	66,0b	23,8c	22,1	7,2b
J22	16,3	755,7a	131,2c	363,5a	259,9a	549,7c	400,1c	157,7	23,2a	72,2b	23,9c	26,1	8,3a
J23	12,5	710,3b	130,0c	343,4a	235,9a	559,5b	443,9b	148,0	21,4a	70,5b	24,4c	24,6	7,6a
J24	13,6	529,0b	128,4c	260,8b	139,2b	521,1c	449,7b	117,7	13,4b	58,8b	24,7b	19,1	4,6b
J25	15,0	676,6b	141,3b	329,4b	204,9b	587,1b	478,9b	147,7	18,7b	70,3b	26,5b	24,1	6,6b
J26	16,5	651,4b	140,5b	321,0b	189,0b	583,6b	458,0b	143,6	17,4b	69,1b	26,5b	23,4	6,2b
J27	15,7	680,8b	132,2b	335,2b	212,4b	556,9b	401,9c	147,7	19,8b	68,9b	24,1c	24,2	6,9b
J28	15,6	695,5b	119,5c	329,1b	245,9a	521,9c	419,6c	144,9	22,4a	67,5b	22,8c	23,8	8,0a
J29	15,2	695,0b	137,9b	338,4a	217,8b	584,7b	489,1b	149,0	19,9b	71,3b	26,1b	24,4	7,0b
J30	15,9	533,4b	99,2b	278,5b	155,0b	434,2c	320,4c	121,1	13,4b	53,8b	18,4c	20,0	4,8b
J31	16,7	799,7a	128,5b	371,7a	298,3a	557,7b	455,9b	161,2	26,5a	74,8b	24,0c	26,6	9,5a
J32	14,9	684,0b	133,6b	321,5b	227,9a	567,2b	523,4b	143,5	20,7a	69,7b	25,8b	23,4	7,4a

Tabela 6 – Continuação.

Estirpe/ Tratamento	CPA (cm)	CTR (cm)	CRG (cm)	CRF (cm)	CRMF (cm)	VTR (mm³)	VRG (mm³)	VRF (mm³)	VRMF (mm³)	ATR (cm²)	ARG (cm²)	ARF (cm²)	ARMF (cm²)
J33	15,2	705,3b	134,4b	345,7a	224,2b	574,5b	488,7b	150,6	20,0b	71,3b	25,5b	24,9	7,2b
J34	15,7	711,8b	125,4c	352,8a	232,6a	540,3c	440,3b	152,7	21,8a	69,5b	23,4c	25,3	7,6a
J35	15,8	545,3b	105,7c	273,1b	165,8b	454,7c	368,3c	118,9	14,8b	55,5b	19,8c	19,6	5,3b
J36	15,9	938,3a	158,2b	419,0a	359,7a	653,6b	487,8b	171,4	32,6a	87,7b	29,2b	29,2	11,6a
J37	13,2	589,2b	114,5c	302,3b	171,6b	483,4c	376,2c	132,8	15,7b	59,8b	21,1c	21,8	5,5b
J38	14,5	554,5b	103,0c	250,8b	199,8b	401,3c	303,7c	105,1	18,4b	52,7b	18,6c	17,7	6,5b
J39	15,8	844,4a	145,8b	407,6a	289,8a	630,2b	489,0b	168,2	27,2a	81,7b	27,2b	28,6	9,6a
J40	15,3	742,4a	140,1b	368,6a	232,7a	643,3b	444,1b	157,0	21,9a	77,3b	25,6b	26,2	7,7a
J41	16,0	636,6b	140,3b	323,7b	171,9b	606,4b	479,6b	142,2	16,2b	69,6b	26,9b	23,4	5,6b
J42	15,3	608,0b	130,9c	294,2b	181,9b	564,6b	449,5b	128,6	16,6b	65,1b	24,8b	21,2	5,9b
J43	14,1	675,6b	126,8c	314,1b	233,8a	534,1c	481,5b	136,2	21,8a	67,2b	24,5c	22,5	7,7 ^a
JV44	15,1	654,8b	133,8b	325,0b	195,1b	567,7b	509,8b	138,9	18,7b	68,2b	25,8b	23,2	6,5b
JV45	15,1	710,3b	138,4b	353,8a	217,2b	642,2b	506,8b	152,3	20,9a	75,5b	26,8b	25,3	7,3 ^a
JV46	14,4	674,5b	127,1c	330,5b	216,0b	611,9b	393,7c	141,2	20,9a	71,9b	23,4c	23,6	7,3 ^a
JV47	13,0	748,5a	136,4b	354,6a	256,5a	563,3b	464,8b	147,2	23,6a	72,6b	25,6b	24,9	8,4 ^a
JV48	15,0	765,1a	126,7c	369,0a	268,3a	545,2c	408,5c	156,2	24,9a	72,4b	23,3c	26,2	8,8 ^a
JV49	15,1	860,9a	158,0b	415,5a	286,3a	707,7b	567,6b	177,6	27,7a	87,4b	30,5b	29,6	9,6 ^a
JV50	15,5	881,1a	164,7b	408,4a	306,8a	698,1b	595,4b	173,5	28,7a	87,7b	31,7b	29,1	10,1 ^a
JV51	15,1	765,2a	141,2b	406,6a	216,4b	616,2b	418,1c	178,9	21,1a	76,9b	25,4b	29,4	7,3 ^a
JV52	14,1	704,6b	141,8b	375,0a	186,8b	616,8b	443,2b	165,2	17,7b	73,7b	26,3b	27,2	6,2b
JV53	15,4	600,5b	130,0c	303,4b	166,3b	530,8c	410,2c	134,2	15,8b	63,2b	23,8b	22,0	5,5b
L54	14,8	785,3a	142,3b	361,4a	280,6a	568,9b	433,7b	153,5	25,8a	74,7b	25,8b	25,7	9,2 ^a
L55	16,9	756,0a	138,6b	364,9a	251,4a	570,6b	412,6c	160,0	23,5a	73,5b	25,0b	26,4	8,3 ^a
L56	15,1	701,9b	132,9b	324,1b	243,9a	529,3c	398,7c	141,1	23,0a	68,3b	24,3c	23,3	8,1 ^a
L57	16,0	758,1a	145,6b	360,4a	251,1a	591,1b	447,3b	153,6	22,9a	74,9b	26,6b	25,6	8,1 ^a
L58	16,2	551,5b	133,9b	282,7b	134,2b	552,9b	459,5b	128,4	12,1b	61,8b	25,5b	20,8	4,3b
L59	15,5	424,7b	102,4c	218,3b	103,3b	421,1c	347,6c	100,5	8,9b	47,4b	19,4c	16,2	3,2b
L60	15,6	788,5a	146,2b	352,4a	288,7a	574,8b	449,2b	150,3	25,7a	75,5b	26,8b	25,1	9,2 ^a
L61	17,4	728,8a	123,1c	347,8a	266,8a	533,9c	424,9b	148,8	23,8a	70,3b	23,5c	24,8	8,5 ^a
L62	16,3	693,2a	119,1c	313,9b	259,3a	486,8c	373,4c	135,8	22,7a	65,1b	21,8c	22,5	8,2 ^a
L63	16,7	692,3b	122,2c	323,1b	245,9a	499,1c	371,2c	138,7	21,7a	65,8b	22,5c	23,1	7,8 ^a
L64	15,6	443,2b	118,1c	203,1b	121,3b	448,4c	382,2c	94,2	10,3b	49,9b	22,2c	15,1	3,7b

Tabela 6 – Continuação.

Estirpe/ Tratamento	CPA (cm)	CTR (cm)	CRG (cm)	CRF (cm)	CRMF (cm)	VTR (mm ³)	VRG (mm ³)	VRF (mm ³)	VRMF (mm ³)	ATR (cm ²)	ARG (cm ²)	ARF (cm ²)	ARMF (cm ²)
L65	14,8	530,3b	126,3c	254,9b	148,4b	510,5c	455,1b	112,4	13,1b	58,2b	24,3c	18,4	4,7b
L66	15,2	699,6b	165,2b	330,4b	203,0b	672,3b	608,1b	146,2	18,7b	76,8b	32,2b	23,9	6,6b
L67	17,9	494,5b	122,1c	242,8b	128,9b	528,4c	470,9b	111,5	11,2b	57,2b	24,0c	17,9	4,0b
L68	14,2	683,8b	140,1b	315,8b	226,9a	603,8b	478,5b	143,0	20,9a	71,8b	26,7b	23,2	7,4a
L69	16,8	756,1a	148,8b	376,6a	229,6a	617,9b	448,4b	168,3	21,3a	76,6b	27,2b	27,5	7,5a
L70	17,0	590,3b	126,4c	287,6b	175,5b	573,2b	403,0c	127,4	16,6b	64,5b	23,5c	20,9	5,8b
L71	13,5	697,5b	150,4b	354,8a	191,5b	631,5b	482,5b	156,9	17,9b	74,3b	27,8b	25,7	6,3b
L72	16,9	743,1a	148,3b	365,2a	228,7a	654,2b	609,8b	162,2	21,4a	78,1b	29,2b	26,5	7,5a
L73	15,8	600,9b	121,6c	311,7b	166,6b	520,1c	389,4c	140,1	15,3b	62,4b	22,3c	22,8	5,4b
S65	16,3	740,8a	133,2b	402,8a	203,8b	612,8b	449,8b	175,6	19,2b	75,5b	24,9b	29,0	6,7b
S82	15,9	682,3b	135,6b	324,1b	221,7b	560,4b	488,9b	139,9	21,4a	69,3b	25,7b	23,2	7,4 ^a
Aam82	15,3	938,5a	149,9b	438,8a	348,6a	659,6b	493,2b	184,9	32,1a	88,2b	27,9b	31,0	11,4 ^a
AamS91	13,9	761,3a	138,0b	373,6a	248,6a	601,3b	477,4b	158,4	23,6a	75,7b	26,0b	26,5	8,3 ^a
CBAmC	15,0	797,9a	133,8b	385,6a	277,5a	583,0b	475,6b	162,8	26,1a	76,4b	25,0b	27,3	9,2 ^a
Inoculante	13,8	662,7b	124,1c	314,4a	223,3b	517,6c	436,5b	132,7	19,8b	65,6b	23,6c	22,3	7,1b
J9	15,6	865,1a	156,9b	430,5a	276,6a	676,5b	501,7b	185,1	25,0a	85,6b	28,9b	30,8	8,9 ^a
1A	15,8	858,7a	146,3b	421,8a	289,4a	645,6b	478,3b	177,2	27,1a	83,4b	26,9b	29,8	9,5 ^a
37C	15,8	660,8b	130,6c	301,6b	238,2a	559,6b	565,7b	127,2	21,6a	67,8b	26,7b	21,4	7,7 ^a
PAL5	14,2	790,3a	148,2b	377,2a	238,3a	638,2b	492,3b	158,8	21,4a	79,4b	27,9b	26,7	7,6 ^a
Sp245	16,9	620,2b	144,8b	305,8b	170,7b	594,4b	473,8b	136,3	16,0b	68,0b	26,9b	22,3	5,4b
ZAE94	14,0	732,0a	145,1b	381,5a	210,5b	636,5b	489,4b	174,5	20,0b	76,5b	26,9b	28,2	7,0b
ZAE95	15,1	667,6b	153,1b	341,9a	171,8b	698,2b	586,7b	154,2	16,4b	76,2b	26,9b	25,1	5,7b
109	14,4	679,7b	136,8b	349,0a	193,0b	608,1b	440,2b	157,5	17,7b	71,8b	25,3b	25,6	6,3b
Test. s/i	15,8	677,3b	118,6c	347,2a	210,6b	527,7b	384,5c	153,6	19,7b	66,9b	21,6c	25,2	6,9b
Trat. N	15,5	1203,1a	335,4a	483,5a	382,6a	1439,5a	1888,0a	215,5	36,0a	147,3a	76,6a	35,2	12,6 ^a
CV(%)	13,37	23,78	17,37	23,57	34,33	19,09	20,99	23,42	34,47	20,4	17,70	23,40	34,65

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. CPA=Comprimento de parte aérea; CTR=Comprimento total de raiz; CRG=Comprimento de raízes grossas com diâmetro maior que 3,5 mm; CRF=Comprimento de raízes finas com diâmetro entre 1,5 a 3,5 mm; CRMF=Comprimento de raízes mais finas com diâmetro até 1,5 mm; VTR=Volume total de raiz; VRG=Volume de raízes grossas com diâmetro maior que 3,5 mm; VRF=Volume de raízes finas com diâmetro entre 1,5 a 3,5 mm; VRMF=Volume de raízes mais finas com diâmetro até 1,5 mm. ATR=Área superficial total de raízes; ARG=Área de raízes grossas com diâmetro maior que 3,5 mm; ARF=Área de raízes finas com diâmetro entre 1,5 a 3,5 mm; ARMF=Área de raízes mais finas com diâmetro até 1,5 mm; Test. s/i=Testemunha sem inoculação com bactérias e sem adubação nitrogenada; Trat. N=Tratamento sem inoculação com bactérias e adubado proporcionalmente com 100 kg N ha⁻¹.

O CRF foi similar entre o tratamento com adubação nitrogenada e sem inoculação, testemunha e 54% dos isolados. Não obstante, algumas estirpes apresentaram valores não significativos maiores que 15% como Aam82, J9, 1A, J36 e JV49 em comparação à testemunha. O CRF representa em média aproximadamente 50% do CTR, sendo composto principalmente por raízes laterais, de primeira ordem, de diâmetro intermediário (1,5 a 3,5 mm), incumbidas basicamente pela absorção de água e nutrientes minerais. Além disso, as raízes mais finas (<1,5 mm), chamadas de raízes de nutrição, também proporcionam grande absorção de água e íon minerais pelas plantas, bem como maior penetração nos microporos do solo, podendo alcançar sítios de absorção que as outras raízes, de maior diâmetro, não conseguem atingir. Desse modo, o estímulo à formação de raízes laterais mais finas, que representam cerca de 30% do CTR, é fundamental para maior adaptação das plantas ao meio e, por conseguinte, possibilita o maior crescimento vegetal. Dos isolados bacterianos testados, 49% foram superiores em CRMF em relação à testemunha, comprovando a eficácia destas bactérias na emissão de raízes laterais mais finas. As estirpes mais eficientes em estimular a emissão de raízes laterais mais finas foram J36, Aam82, JV50, N5, J31, N4, J39, 1A, L60 e JV49, as quais permitiram uma extensão no crescimento maior que 25%. Em outras culturas, como trigo, tomate e pimentão, Bashan (1998) detectou que estirpes de bactérias *A. brasilense* e *A. lipoferum* aumentaram a formação de pelos radiculares e produziram maior número de raízes laterais. Contudo, observa-se que algumas estirpes bacterianas não promoveram o crescimento radicular; pelo contrário, apresentaram redução no comprimento das raízes. Assim, a capacidade de bactérias promotoras de crescimento de plantas de produzir altas concentrações de indóis *in vitro* não é necessariamente um pré-requisito para que ocorra aumento de crescimento e de produção das plantas na presença de tais bactérias, pois o efeito benéfico depende de sua concentração. Os fitormônios estimulam o

crescimento das raízes em baixas concentrações, porém, causam efeito inibitório em altas, sugerindo que a inoculação com grande número de células bacterianas viáveis pode causar inibição, ao invés de estimular o crescimento das raízes (DOBBELAERE et al., 2002).

No presente estudo, o volume das raízes foi distribuído em média 75% para VRG, 22% para VRF e 3% para VRMF (Tabela 6). O volume está relacionado diretamente com o espaço ocupado pelo sistema radicular no solo. Para o VTR, o tratamento com N foi superior aos demais. A testemunha sem inoculação foi similar a 61% dos tratamentos inoculados com bactérias e obviamente superior a 39%. Por sua vez, as estirpes JV49, ZAE95, JV50, N9, J9, L66, Aam82, L72, J36 e 1A se destacaram por incrementar volume de 18 a 25%, em valores não significativos.

O tratamento com fertilização nitrogenada foi, novamente, superior aos demais, para VRG. Dentre os tratamentos inoculados, 58% foram superiores em relação à testemunha e aos demais tratamentos com estirpes bacterianas. Dentre os isolados que foram superiores à testemunha, destacaram-se L72, L66, JV50, ZAE95, JV49, 37C, J32, JV44, JV45 e J9, com aumentos variando de 23 a 37%. Este fato revela a importância da inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de sorgo, para melhorar a eficiência na exploração do solo, oportunizando ao sistema radicular maior capacidade no processo de absorção de água e nutrientes minerais, além da interação com microrganismos. A inoculação e a adubação nitrogenada não foram suficientes para influenciar estatisticamente o VRF, mesmo havendo diferença no CRF.

O tratamento adubado com N e 53% dos tratamentos inoculados com os diazotrofos foram superiores à testemunha e aos outros tratamentos com estirpes bacterianas, para o VRMF. O tratamento com N apresentou o maior valor para VRMF. Contudo, salienta-se que os outros tratamentos não receberam nenhuma dose de N, o que explica a superioridade em comprimento e volume para essas

variáveis no tratamento nitrogenado. Nas estirpes que proporcionaram maior VRMF, verificou-se um acréscimo de 23 a 38% neste volume, destacando os isolados, em ordem decrescente, J36, Aam82, JV50, JV49, J39, N4, N17, J31, CBAmC e L54. A maior parte destas estirpes (80%) pertence ao gênero *Azospirillum*.

Considerando o comprimento e o volume radicular, observam-se mudanças na arquitetura das raízes em função da inoculação com as bactérias diazotróficas em comparação à testemunha, principalmente na ocupação do espaço em que foram cultivadas, possivelmente devido à maior formação de raízes laterais, mesmo que estatisticamente para algumas variáveis não tenham sido diferentes.

Os dados referentes à ATR, ARG, ARF, ARMF estão descritos na Tabela 6. A distribuição da área superficial radicular foi, em média para os tratamentos, de 45% para ARG, 41% para ARF e 14% para ARMF.

O tratamento com N foi superior aos demais para ATR e similar entre estes. Dentre os tratamentos inoculados, sobressaíram-se as estirpes Aam82, J36, JV50, JV49, J9, 1A, J39, L72, J40 e L66, com o incremento de 12 a 24% em relação à testemunha. Considerando a ARG, o tratamento com N foi, também, superior aos demais. Apesar disso, 53% dos tratamentos inoculados com bactérias tiveram maior influência na ARG do que a testemunha. A área superficial das raízes é essencial no contato da superfície radicular com o solo, o que viabiliza a maior absorção de nutrientes minerais e água, principalmente de nutrientes imóveis, como o fósforo (P). Ademais, a maior área de contato das raízes com as partículas do solo facilita a extração de nutrientes e, conseqüentemente, o transporte de íons por intermédio dos pelos radiculares. Todos estes fatores permitem inferir que a associação das bactérias diazotróficas com as plantas leva a um *feedback*, considerando que as bactérias, por intermédio da FBN, síntese de fitormônios e antagonismo de fitopatógenos,

estimulam o crescimento radicular, prioritariamente pela emissão de raízes laterais, enquanto que estes estímulos facilitam a absorção de maiores quantidades de nutrientes minerais e água pelas plantas, que são também revertidos para a sobrevivência e crescimento destes diazotrofos, como o fornecimento de P. O aumento na absorção de íons pode ser devido às modificações na demanda nutricional da planta quando associada à bactéria. Os maiores aumentos para ARG, de 20 a 31%, foram propiciados pelas estirpes JV50, JV49, L72, J36, J9, PAL5, Aam82, L71, J39 e L69.

A ARF, igualmente ao VRF, foi similar entre os tratamentos. Esperava-se que, com o incremento no CRF para determinados tratamentos, houvesse incremento no VRF e na ARF. Mesmo assim, as estirpes Aam82, J9, 1A, JV49, J36, JV50, JV51, S65, J39 e ZAE94 aumentaram a ARF de 10 a 18%. Desempenho diferente foi encontrado para a ARMF, onde o tratamento com N foi similar a 50% dos tratamentos inoculados e superiores à testemunha e aos outros tratamentos com bactérias. O aumento foi significativo entre as dez melhores bactérias (J36, Aam82, JV50, JV49, J39, N4, 1A, N5 e J31), estimulando o crescimento de ARMF entre 27 a 39%.

Nesse contexto, um grupo de estirpes bacterianas promoveu maior incremento em CRMF, VRMF e ARMF, em comparação à testemunha, o que é possível inferir que estes procariontes fixadores de N favorecem, principalmente, o estímulo à formação de raízes mais finas e, por conseguinte, melhoraram indiretamente a absorção de íons minerais e água nas plantas de sorgo. Estes microrganismos, em virtude da síntese de fitormônios, alteram a plasticidade radicular, elevando a cinética de absorção de íons e água pelo maior número de pelos radiculares, onde existe menor suberização e lignificação. A taxa de absorção representa o produto da intensidade do influxo do nutriente pelo tamanho do sistema radicular (área superficial total). Quanto menor a espessura, menor o caminho que o elemento tem para percorrer desde a

plasmalema até os vasos do xilema e do floema (CORRÊA et al., 2006). Batista (2012), em avaliação morfoanatômica de raízes de milho e sorgo com diferentes concentrações de P, afirmou que plantas de sorgo que aumentam o comprimento, a área superficial e o volume radicular das raízes muito finas e ou finas podem ter vantagem adaptativa em ambiente de baixa disponibilidade deste íon mineral.

O CER não foi influenciado pela inoculação com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada (Tabela 7). O CER é um indicador frequente de finura de raiz. Plantas com alto CER podem apresentar vantagem sobre as plantas com baixo CER, por apresentarem custo com C mais baixo para aumentarem o comprimento de raízes (EISSENSTAT, 1992). As estirpes N4, N3, Aam82, J9, J36, N5, L54, N7, N2 e N31 apresentaram valores maiores, não significativos, entre 15 e 39% para o CER. Entretanto, o custo com C para a manutenção da produção de raízes finas é elevado, uma vez que a frequência de reposição dessas raízes é alta (PERSSON, 1982). O diâmetro das raízes tem forte influência no CER, que é o crescimento da raiz em comprimento, utilizando a mesma massa radicular. Assim, alterações na morfologia radicular podem ocorrer sem que haja variações na biomassa radicular (HODGE, 2004).

Houve efeito significativo entre os tratamentos para PTR, PRG, PRF e PRMF (Tabela 7). O tratamento com N e 42 tratamentos inoculados com estirpes bacterianas diazotróficas foram superiores em PTR comparativamente à testemunha e aos outros tratamentos inoculados. Os tratamentos J9, J36, 1A, L63, L60, JV50, L62, Inoculante, L61 e L66 apresentaram um PTR variando de 31 a 43% maior em relação à testemunha. Este fato demonstra que parte dos diazotrofos, estimulam a emissão de raízes laterais, possivelmente, pela síntese de compostos indólicos e outros fitormônios, e que são capazes de suprir parcialmente o N para as plantas. A auxina seria necessária para a iniciação e subsequente crescimento das raízes laterais (LLORET e PULGARIN, 1992;

REED et al., 1998). Dos 87 isolados, 42 condicionaram as plantas de sorgo a emitirem raízes similarmente ao tratamento com fertilização nitrogenada. Isto demonstra a contribuição dos diazotrofos para o crescimento radicular da planta, possibilitando maior alcance do sistema radicular no ambiente edáfico. O crescimento espacial do sistema radicular determina a habilidade da planta em explorar recursos que estão mal distribuídos e a arquitetura pode alterar o custo dessa exploração em termos de C e definir a capacidade de competição deste sistema (FAN et al., 2003).

O tratamento com N foi superior em PRG. Ainda, 52% dos tratamentos inoculados foram superiores à testemunha e aos demais tratamentos. As bactérias diazotróficas JV47, JV45, L57, L69, L60, Sp245, J9, L66, L67 e L65 proporcionaram incrementos entre 36 e 48% maiores que a testemunha. A emissão de raízes mais grossas assegura às plantas um melhor suporte e ancoragem da planta, entretanto essas raízes absorvem menor quantidade de água e nutrientes (WILCOX et al., 2004).

Para o PRF, houve similaridade entre o tratamento com N, testemunha e 47 tratamentos com isolados bacterianos. Os procariontes diazotróficos J9, JV49, JV50, J40, JV44, L66, L58, S65, 1A e Aam82 emitiram de 15 a 23% mais raízes finas em relação à testemunha. As raízes finas, com diâmetro intermediário (1,5 a 3,5 mm), apresentaram a maior extensão do CTR (com aproximadamente 48%) e também são responsáveis pela absorção de água e nutrientes minerais. Entretanto, as raízes finas correspondem em torno de 9% do número total de raízes.

Em relação ao PRMF, o tratamento com N foi similar a 39 bactérias diazotróficas, e superiores à testemunha e a 56% dos isolados bacterianos. As raízes mais finas representam, aproximadamente, 90% do número total de raízes das plantas de sorgo. As raízes mais finas são as principais responsáveis pela absorção de nutrientes minerais e água, em virtude do seu menor diâmetro.

Ainda, a formação de novas raízes laterais mais finas, aumentará o número de pelos radiculares, provendo o sistema radicular de uma nova superfície capaz de absorver novos suprimentos de água e íons minerais. O acréscimo no número de pontas de raízes (coifa) indica mais formações de mucigel, que é favorável às bactérias diazotróficas benéficas, devido à liberação de polissacarídeos.

A síntese de auxina e citocinina pelas bactérias diazotróficas é reconhecida na literatura. As células do periciclo se dividem e iniciam a formação das raízes laterais estimuladas pela auxina, entretanto, grande porção deste fitormônio é transportado basipetamente das folhas. Assim, possivelmente as bactérias alojadas na rizosfera e no interior radicular favorecem a formação das raízes laterais por estarem localizadas próximas a esta região. Por outro lado, a síntese de citocinina por estes microrganismos pode favorecer a formação do centro quiescente responsável pelo desenvolvimento radicular e posteriormente sendo transportada acropetamente para a parte aérea e estimulando o crescimento caulinar.

Estirpes bacterianas que promovem a formação de raízes laterais mais finas devem ser almejadas para produção de biofertilizantes. Os diazotrofos J9, 1A, L63, J36, L60, Inoculante, N5, JV50 e J31 destacaram-se por promover em uma maior emissão destas raízes entre 36 e 45%.

Combinando todas as respostas das plantas de sorgo, como massa de parte aérea, massa de raízes, e os efeitos promovidos na morfologia radicular, como comprimento, volume, área superficial, número de pontas de raízes e o comprimento específico radicular sob o efeito de bactérias diazotróficas, foram selecionadas 13 estirpes bacterianas para serem avaliadas em casa de vegetação. Além destas estirpes, foram acrescentadas a ZAE94, Sp245 e o inoculante comercial à base dos isolados AbV5 e AbV6 por apresentarem respostas positivas em gramíneas como milho, arroz e trigo.

Tabela 7 – Efeito das estirpes bacterianas no comprimento específico radicular (CER, mm mg⁻¹) e nos números de pontas total de raízes (PTR), pontas de raízes grossas (PRG), pontas de raízes finas (PRG) e pontas de raízes mais finas (PRMF) de sorgo forrageiro BRS 655 cultivado em condições gnotobióticas em casa de vegetação no município de Seropédica - RJ.

Estirpe/ Tratamento	CER (mm mg ⁻¹)	PTR (n°)	PRG (n°)	PRF (n°)	PRMF (n°)	Estirpe/ Tratamento	CER (mm mg ⁻¹)	PTR (n°)	PRG (n°)	PRF (n°)	PRMF (n°)
N1	210,8	1283,0b	14,7c	135,0b	1133,2b	J27	201,2	1574,5b	23,7b	147,5b	1403,2b
N2	219,8	1509,2b	17,5c	144,0b	1348,2b	J28	186,6	1802,5b	18,7c	173,7b	1610,0b
N3	267,1	1744,7b	14,0c	118,7b	1612,0b	J29	185,2	1804,2b	18,0c	171,7b	1614,5b
N4	307,6	2132,5a	15,7c	139,0b	1977,7a	J30	193,2	1792,5b	13,7c	159,0b	1619,7b
N5	227,8	2262,5a	16,2c	148,2b	2098,0a	J31	218,9	2240,7a	17,2c	171,5b	2052,0a
N6	208,3	1821,2b	14,2c	131,7b	1675,2a	J32	178,2	1852,0a	20,5b	154,5b	1677,0a
N7	223,5	2107,5a	16,2c	122,5b	1968,7a	J33	190,9	2143,5a	22,0b	178,7 ^a	1942,7a
N8	163,9	1232,2b	14,2c	160,2b	1057,7b	J34	204,2	1974,0a	19,7c	161,5b	1792,7a
N9	176,4	1475,2b	14,7c	161,2b	1299,2b	J35	174,2	1941,5a	19,2c	188,0a	1734,2a
N10	145,1	1288,2b	14,2c	153,5b	1120,5b	J36	229,1	2571,2a	19,2c	197,0a	2355,0a
N11	202,6	1529,2b	14,0c	121,5b	1393,7b	J37	188,6	1909,2a	21,0b	180,2 ^a	1708,0a
N12	190,2	1592,7b	18,0c	155,0b	1419,7b	J38	194,2	1513,2b	12,5c	124,5b	1376,2b
N13	203,6	1889,5a	16,0c	136,7b	1736,7a	J39	199,3	2245,0a	22,5b	205,2 ^a	2017,2a
N14	170,3	1584,0b	14,0c	153,5b	1416,5b	J40	217,6	1926,0a	23,0b	225,5 ^a	1677,5a
N15	193,7	1719,0b	19,2c	150,2b	1549,5b	J41	186,7	1745,5b	21,5b	206,0a	1518,0b
N16	166,4	1980,7a	22,2b	144,2b	1814,2a	J42	167,8	1634,2b	24,7b	180,0a	1429,5b
N17	202,3	2124,2a	20,0c	140,7b	1963,5a	J43	197,2	1723,7b	21,0b	161,2b	1541,5b
J18	205,9	1963,2a	18,7c	157,0b	1787,5a	JV44	171,2	1694,7b	21,5b	222,7 ^a	1450,5b
J19	184,1	1608,7b	11,5c	123,5b	1473,7b	JV45	184,5	1719,5b	28,0b	203,2 ^a	1488,2b
J20	189,1	1592,7b	17,0c	125,0b	1450,7b	JV46	198,6	1657,2b	19,5c	208,5 ^a	1429,2b
J21	190,5	2109,5a	18,7c	148,5b	1942,2a	JV47	201,1	2030,2a	29,7b	211,5 ^a	1789,0a
J22	210,2	2070,7a	21,5b	146,5b	1902,7a	JV48	211,8	2069,2a	25,7b	215,2 ^a	1828,7a
J23	185,3	2000,2a	20,0c	146,5b	1833,7a	JV49	196,0	2041,7a	25,7b	233,2 ^a	1782,7a
J24	143,4	1087,5b	14,2c	149,0b	924,2b	JV50	196,7	2331,0a	25,2b	226,2 ^a	2079,5a
J25	165,4	1422,5b	19,7c	165,0b	1237,5b	JV51	199,7	1390,0b	19,0c	183,5 ^a	1187,5b
J26	183,9	1434,7b	21,0b	161,0b	1252,7b	JV52	173,2	1453,5b	21,2b	203,5 ^a	1228,7b

Tabela 7 – Continuação.

Estirpe/ Tratamento	CER (mm mg⁻¹)	PTR (n°)	PRG (n°)	PRF (n°)	PRMF (n°)	Estirpe/ Tratamento	CER (mm mg⁻¹)	PTR (n°)	PRG (n°)	PRF (n°)	PRMF (n°)
JV53	187,4	1253,5b	23,5b	163,0b	1067,0b	L73	199,5	1291,7b	23,2b	153,7b	1114,7b
L54	224,9	1591,2b	20,7b	178,7a	1391,7b	S65	217,5	1703,5b	21,2b	219,2a	1463,0b
L55	202,5	1688,7b	21,7b	192,0a	1475,0b	S82	196,6	1292,5b	15,5c	155,7b	1121,2b
L56	182,4	1458,2b	20,2b	148,5b	1289,5b	Aam82	238,9	2185,7a	21,0b	217,7a	1947,0a
L57	194,5	2032,5a	25,7b	190,0a	1816,7a	AamS91	208,7	1819,2b	23,5b	195,5a	1600,2b
L58	140,8	1787,2b	23,0b	221,5a	1542,7b	CBAmC	204,2	2080,0a	24,0b	211,5a	1844,5a
L59	129,5	1472,5b	19,5c	184,0b	1269,0b	Inoculante	191,4	2305,0a	20,2b	176,7a	2108,0a
L60	190,4	2454,7a	25,2b	194,0a	2235,5a	J9	233,6	2657,7a	25,0b	241,5a	2391,2a
L61	195,4	2252,5a	19,5c	188,7a	2044,2a	1A	213,2	2509,7a	21,5b	209,2a	2279,0a
L62	201,0	2306,2a	21,5b	179,2a	2105,5a	37C	176,7	2157,2a	19,6c	176,4a	1961,2a
L63	198,0	2491,7a	22,0b	206,5a	2263,2a	PAL5	184,9	2255,7a	21,0b	204,5a	2030,2 ^a
L64	133,4	1735,2b	19,0c	159,0b	1557,2b	Sp245	176,5	1087,5b	25,2b	155,5b	906,7b
L65	142,3	2081,0a	24,2b	217,7a	1839,0a	ZAE94	216,0	1237,0b	15,3c	181,3a	1040,3b
L66	141,9	2206,5a	24,5b	222,0a	1960,0a	ZAE95	198,1	1261,5b	13,2c	191,7a	1056,5b
L67	139,6	1879,2a	24,2b	183,0a	1672,0a	109	186,5	1497,2b	21,5b	194,0a	1281,7b
L68	193,2	1365,7b	21,2b	172,0b	1172,0b	Test. s/i	185,4	1514,5b	15,5c	184,7a	1314,2b
L69	196,5	1592,2b	25,5b	207,7a	1359,0b	Trat. N	110,0	2667,5a	42,7a	292,2a	2332,5 ^a
L70	186,8	982,5b	16,7c	152,7b	813,0b						
L71	184,0	1365,0b	22,0b	187,0a	1156,0b						
L72	174,4	1513,0b	25,0b	189,0a	1299,0b						
						CV(%)	23,21	23,56	28,13	21,73	24,77

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. Test. s/i=Testemunha sem inoculação com bactérias e sem adubação nitrogenada; Trat. N=Tratamento sem inoculação com bactérias e adubado proporcionalmente com 100 kg N ha⁻¹.

3.2 Bactérias diazotrófica associadas com sorgo forrageiro BRS 655 em casa de vegetação

No crescimento inicial de plantas de sorgo, observou-se efeito apenas sobre as variáveis MFPA, IC e DV8 (Tabela 8). Todos os tratamentos com estirpes bacterianas foram fertilizadas com 20 kg de N ha⁻¹. Assim o tratamento sem inoculação e adubado com 20 kg N ha⁻¹ serve de parâmetro de comparação (testemunha) com os tratamentos inoculados. Não houve influência sobre a MSR, tanto pela inoculação com bactérias diazotróficas, quanto pelas doses de 40, 80 e 120 kg de N ha⁻¹.

A MFPA foi incrementada principalmente pelas maiores doses de N. O tratamento sem adubação nitrogenada obteve o menor rendimento de MFPA. As estirpes N17, J9 e J36 incrementaram 8,6%, 8,3% e 7,7%, respectivamente em MFPA, em comparação com a testemunha. A inoculação com as bactérias e as doses de N não influenciaram a MSPA. As estirpes JV50, J9 e JV49 promoveram acréscimo na MSPA entre 20,2 a 23,4% em referente à testemunha. Apesar da não significância estatística, estes incrementos na MSPA demonstram a regulação das bactérias no crescimento vegetal inicial das plantas de sorgo.

O IC foi superior nas três maiores doses de N e nos tratamentos inoculados JV49, JV50, L66, L72 e Sp245. O IC determina a eficiência de partição de fotoassimilados, direcionando-os preferencialmente para o rendimento da parte vegetal a ser utilizada. Neste caso, determina o quanto a planta utilizou da massa seca total para a produção de folhas e colmo. Admite-se, portanto, que os tratamentos que expressaram maior IC foram aqueles que, provavelmente, translocaram maior reserva da MSR para a parte aérea.

Os tratamentos inoculados e as doses crescentes de N não promoveram maiores alturas de plantas no estágio inicial de crescimento de plantas de sorgo. Contudo, as doses de 40 e 120 kg de N ha⁻¹ promoveram maior DV8 nas plantas

de sorgo. A dose de 80 kg de N ha⁻¹ e as estirpes N5, J36 e Aam82 promoveram maior DV8 em relação aos demais tratamentos.

Tabela 8 – Efeito de estirpes bacterianas e doses crescentes de nitrogênio no crescimento inicial (30 DAE) de plantas de sorgo forrageiro BRS 655 cultivado em casa de vegetação no município de Seropédica-RJ.

*Estirpe/ Tratamento	MSR (g)	MFPA (g)	MSPA (g)	IC (%)	AV4 (cm)	AV8 (cm)	DV8 (mm)
N5	14,80	95,20b	14,77	50,25b	13,80	27,06	18,39b
N11	15,73	91,60b	17,78	52,81b	13,49	27,46	17,85c
N17	16,86	96,13b	16,62	49,57b	13,29	27,32	18,13c
J36	14,56	95,28b	15,38	51,78b	13,54	27,93	18,33b
J39	15,79	90,63b	17,51	51,93b	12,53	27,05	17,35c
JV49	12,42	89,97b	18,96	59,45a	13,62	28,34	17,00c
JV50	14,34	90,94b	19,76	57,20a	13,41	29,23	17,45c
L60	14,41	93,00b	16,03	53,10b	13,35	27,13	17,84c
L66	14,24	90,66b	17,86	55,60a	13,37	27,45	17,62c
L72	14,45	87,27b	17,64	55,72a	12,74	26,02	17,62c
Aam82	15,37	86,24b	15,46	49,81b	12,79	26,85	18,58b
J9	18,43	95,86b	19,69	52,88b	13,39	27,04	17,93c
1A	15,28	94,89b	16,68	52,51b	13,43	26,94	17,71c
Inoculante	18,49	90,38b	16,40	48,21b	14,34	26,58	17,74c
Sp245	13,93	93,90b	17,31	55,15a	13,41	28,62	17,81c
ZAE94	16,30	91,66b	17,37	51,70b	13,26	25,60	17,67c
0 kg N ha ⁻¹	15,84	75,96c	14,96	48,74b	12,49	27,94	16,06c
20 kg N ha ⁻¹ (Test.)	15,91	87,89b	15,13	49,13b	12,93	28,75	17,27c
40 kg N ha ⁻¹	14,06	102,18a	18,16	55,43a	12,72	25,43	19,45 ^a
80 kg N ha ⁻¹	13,55	107,25a	20,70	60,63a	12,88	27,24	18,55b
120 kg N ha ⁻¹	11,73	106,68a	18,41	60,65a	13,58	27,50	19,94 ^a
CV(%)	25,67	5,81	23,78	12,40	6,23	7,07	5,74

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. *Os tratamentos inoculados com bactérias diazotróficas receberam a dose de 20 kg N ha⁻¹ na semeadura; MSR=Massa seca média de raiz; MFPA=Massa fresca média de parte aérea; MSPA=Massa seca média de parte aérea; AV4=Altura média de plantas no estágio vegetativo V4; AV8=Altura média de plantas no estágio vegetativo V8; DV8=Diâmetro médio de plantas no estágio vegetativo V8; Test.=Testemunha não inoculada e adubada com 20 kg N ha⁻¹.

As variáveis MFC, MSC, MFF, MSF, MFPA e MSPA foram influenciadas pelas estirpes bacterianas e pela adubação nitrogenada, exceto a MSR e o IC, para o cultivo de sorgo forrageiro BRS 655 em Seropédica-RJ (Tabela 9). Os isolados Aam82, L66 e J36 incrementaram a MSR entre 10,1 e

19,1% respectivamente em comparação à testemunha, e entre 11,1 e 37,3% em referência para as três maiores doses de N. Estes resultados constatarem dois efeitos: o primeiro, em que os diazotrofos geralmente estimulam o crescimento radicular; e o segundo, em que o fácil acesso ao N, em virtude da maior disponibilidade desse nutriente, induz as plantas a investirem no crescimento da parte aérea em detrimento do sistema radicular, para que na fase reprodutiva possa redistribuir o N para o enchimento de grãos.

Considerando a MFC, a dose de 120 kg de N ha⁻¹ proporcionou a maior resposta, enquanto as doses de 40 e 80 kg N ha⁻¹ apresentaram efeito intermediário, sendo superiores aos tratamentos inoculados e ao tratamento sem adubação. Em contrapartida, as bactérias diazotróficas causaram efeito similar aos tratamentos nitrogenados e superiores ao tratamento sem adubação, para a MSC. As plantas que receberam maior suprimento de N apresentaram maior percentual de umidade, provavelmente, em consequência do acréscimo de compostos orgânicos nos vacúolos e, por conseguinte, aumento da turgescência celular devido a maior absorção de água.

As doses de 80 e 120 kg de N ha⁻¹ promoveram maiores valores para MFF, MSF, MFPA e MSPA em relação aos outros tratamentos. Entretanto, a maior dosagem foi superior a de 80 kg de N ha⁻¹ para MFF e MFPA. O tratamento sem adubação nitrogenada foi inferior a todos para MFF, MSF, MFPA e MSPA. O N é o macronutriente mais requerido pelas plantas, devido à sua função na constituição da clorofila, na síntese das enzimas e na composição do DNA e RNA. A carência de N na planta dificulta, principalmente, a biossíntese de aminoácidos o que interfere em todo o metabolismo vegetal e consequentemente no desenvolvimento das plantas. As cepas bacterianas utilizadas nesse estudo apresentaram respostas similares à dose de 40 kg de N ha⁻¹ para as MFF, MSF, MFPA e MSPA, exceto para a estirpe J39 em MSPA (Tabela 9).

Tabela 9 – Massas médias dos componentes morfológicos e índices de colheita de plantas de sorgo forrageiro BRS 655 inoculadas com estirpes bacterianas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação nos municípios de Seropédica – RJ e Colorado do Oeste-RO, colhidas aos 45 dias, após a semeadura.

*Estirpe/ Trat.	Seropédica-RJ								Colorado do Oeste-RO							
	MSR (g)	MFC (g)	MSC (g)	MFF (g)	MSF (g)	MFPA (g)	MSPA (g)	IC (%)	MSR (g)	MFC (g)	MSC (g)	MFF (g)	MSF (g)	MFPA (g)	MSPA (g)	IC (%)
N5	9,2	67,6c	9,4a	42,1c	9,3b	109,7c	18,7b	67,2	9,4	84,5	23,1	30,8b	10,0a	115,3	33,2	78,0
N11	9,5	68,7c	9,6a	42,5c	9,6b	111,2c	19,2b	66,8	10,0	90,7	29,7	29,1c	9,5b	119,8	39,3	79,4
N17	9,6	66,8c	9,3a	41,9c	9,2b	108,8c	18,5b	66,3	11,5	89,2	30,8	29,0c	9,5b	118,2	40,3	77,1
J36	9,9	68,5c	9,6a	43,2c	9,6b	111,7c	19,2b	66,3	10,2	85,7	26,5	31,3b	9,8 ^a	116,9	36,3	77,9
J39	8,5	66,8c	9,1a	41,0c	8,8b	107,9c	17,9c	67,8	10,3	86,5	25,2	30,3b	9,7b	116,8	34,9	76,7
JV49	9,4	67,3c	9,8a	42,4c	9,0b	109,6c	18,8b	67,1	10,5	87,5	29,8	30,9b	9,7 ^a	118,5	39,5	78,4
JV50	7,6	64,7c	8,7a	39,8c	8,4b	104,5c	17,1b	69,9	9,8	84,3	31,2	30,1b	9,4b	114,3	40,6	79,9
L60	9,8	70,5c	9,6a	42,9c	9,4b	113,4c	19,0b	66,5	9,7	88,8	27,4	31,3b	9,9 ^a	120,2	37,3	78,5
L66	10,9	66,2c	9,4a	41,6c	9,1b	107,8c	18,5b	62,9	9,8	84,6	28,6	28,5c	9,3b	113,2	37,9	78,8
L72	10,7	66,7c	9,5a	41,7c	9,4b	108,4c	18,7b	64,2	10,4	83,5	24,2	30,3b	9,8 ^a	113,8	33,9	76,5
Aam82	11,0	68,5c	9,5a	43,3c	9,1b	111,9c	18,9b	63,8	11,0	75,4	23,3	26,3c	8,9b	101,7	32,3	74,4
J9	9,3	67,9c	9,4a	42,8c	9,4b	110,8c	18,8b	67,1	10,3	88,1	26,6	29,9b	9,2 ^a	118,0	36,2	77,4
1A	9,1	67,7c	9,7a	41,7c	9,1b	109,4c	18,8b	67,5	10,0	85,5	25,6	28,2c	9,3b	113,7	34,8	77,2
Inoc.	9,0	67,2c	8,9a	41,4c	9,4b	108,3c	18,4b	67,8	10,7	84,9	26,8	28,3c	9,3b	113,2	36,1	77,0
Sp245	9,3	68,7c	9,7a	40,8c	9,2b	109,6c	18,9b	67,2	10,7	82,3	20,2	28,9c	9,5b	111,2	29,8	73,4
ZAE94	8,6	66,7c	9,3a	41,2c	9,1b	107,9c	18,4b	68,5	9,9	83,5	23,5	29,2c	9,6b	112,7	33,1	76,5
0 N	5,6	39,2d	6,5b	28,9d	6,4c	68,1d	12,9c	69,5	9,8	75,5	23,8	28,7c	9,2b	104,2	31,6	75,9
20 N	8,9	62,7c	9,0a	41,4c	8,9b	104,2c	18,0b	67,2	9,8	84,6	22,3	30,9b	9,6b	115,6	33,4	76,9
40 N	8,7	77,0b	9,4a	47,0c	9,7b	123,9c	19,1b	68,7	10,4	90,8	20,0	32,2a	9,8a	123,0	29,9	74,2
80 N	8,8	83,7b	9,7a	55,4b	11,6a	139,1b	21,3a	70,8	10,7	90,3	27,1	35,5a	10,2a	127,8	37,3	76,8
120 N	6,9	91,5a	10,1a	62,0a	12,1a	153,5a	22,2a	76,4	10,6	94,1	27,3	34,1a	9,9a	128,2	37,2	77,8
CV(%)	22,32	8,15	8,48	7,30	7,76	7,01	7,01	7,20	10,80	8,88	25,19	7,26	4,62	7,73	18,58	4,29

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. *Os tratamentos inoculados com bactérias diazotróficas receberam a dose de 20 kg N ha⁻¹ na semeadura; Trat.=Tratamento; MSR=Massa seca média de raiz; MFC=Massa fresca média de colmo; MSC=Massa seca média de colmo; MFF=Massa fresca média de folhas; MSF=Massa seca média de folhas; MFPA=Massa fresca média de parte aérea; MSPA=Massa seca média de parte aérea; IC=Índice de colheita; Inoc.=Inoculante; 0 N=0 kg de N ha⁻¹; 20 N=20 kg de N ha⁻¹ (Tratamento testemunha); 40 N=40 kg de N ha⁻¹; 80 N=0 kg de N ha⁻¹; 120 N=0 kg de N ha⁻¹.

O IC foi similar entre todos os tratamentos aos 45 dias após a semeadura, com valores superiores a 62% constatando que as plantas convergiram a maior parte da produção para a parte aérea.

No experimento conduzido com sorgo forrageiro BRS 655 em Colorado do Oeste-RO foi obtido respostas significativas apenas para a produção de MFF e MSF (Tabela 8). De maneira geral, as plantas cultivadas em Colorado do Oeste-RO apresentaram maior desenvolvimento vegetal em relação às de Seropédica-RJ. As características físico-químicas do solo utilizado em Colorado do Oeste-RO resultaram em maior saturação por bases e CTC, bem como em maiores teores de P e matéria orgânica. De fato, a condição química inicial do solo e a adubação aplicada permitiu o desenvolvimento normal das plantas revelado pelas produções similares de MSR, MFC, MSC, MFPA e MSPA entre os tratamentos. O uso de doses crescentes de N, não interferiu no rendimento destes componentes. O acúmulo de MSC foi de 22 a 30,80% acrescentado pelas bactérias diazotróficas JV50, N17, JV49, N11 e L66 em comparação à testemunha.

As três maiores doses de N (40, 80 e 120 kg de N ha⁻¹) expressaram maiores acúmulos de MFF. As estirpes N5, J36, J39, JV50, L60, L72 e Aam82 juntamente com a testemunha (sem inoculação e 20 kg de N ha⁻¹), obtiveram respostas intermediárias, superiores ao tratamento sem N e as outras estirpes. Interessantemente, para o acúmulo de MSF os diazotrofos N5, J36, JV49, L60, L72 e J9 obtiveram respostas significativas similares às maiores adubações nitrogenadas e superiores à testemunha e aos demais tratamentos inoculados.

A produção de MSPA obteve incrementos de 15,0 a 17,7% para as estirpes N11, JV49, N17 e JV50 em relação à testemunha. O IC não foi influenciado pelos tratamentos, entretanto apresentaram melhores respostas em referência ao experimento conduzido em Seropédica-RJ. As plantas convergiram mais de 73% da massa seca total para a produção de parte aérea.

Diante dos resultados gerais, sugere-se que as estirpes do gênero *Azospirillum* J36, N11, L60, JV49 e Aam82, apresentaram uma tendência de acúmulos maiores, em valores absolutos, principalmente na massa seca de parte aérea nas condições edafoclimáticas de Seropédica-RJ e Colorado do Oeste-RO. As folhas e colmos do sorgo forrageiro, geralmente são utilizados na alimentação animal na forma de forragem ou silagem. Santos et al. (2017), avaliando bactérias dos gêneros *Burkholderia* spp. e *Herbaspirillum* spp. em sorgo forrageiro BRS 655, não encontraram resultados positivos para a produção de massa seca de parte aérea, utilizando substrato estéril em casa de vegetação. Estes autores reportaram apenas resultados positivos para a massa seca de raiz. No presente estudo, as bactérias foram avaliadas em solo não estéril, competindo com a microbiota nativa. A habilidade das bactérias em sobreviver em grandes números no solo é um importante fator a determinar seu sucesso na colonização subsequente da rizosfera, ou seja, há que se considerar também a presença dos outros microrganismos do solo, que, em última análise, são os competidores que uma bactéria promotora de crescimento vegetal introduzida deve sobrepujar para manter-se no solo ou até mesmo para conseguir penetrar na raiz (JJEMBA e ALEXANDER, 1999).

Assim, estudos mais aprimorados e repetitivos devem ser realizados entre estas estirpes bacterianas e genótipos de sorgo forrageiro para confirmação dos efeitos na produção de massa seca dos tecidos vegetais. A variabilidade dos resultados é um dos maiores problemas associados a experimento de inoculação de bactérias promotoras do crescimento de plantas e é devida, provavelmente, à complexidade das interações envolvidas na rizosfera entre a planta, a bactéria introduzida e o resto da microbiota rizosférica, neutra ou deletéria (ANTOUN et al., 1998). Outro fator a ser considerado, é que normalmente o cultivo de sorgo forrageiro é praticado pelos agricultores familiares, desprovidos economicamente, e por isso, não realizam a aplicação de fertilizantes químicos.

Portanto, a seleção de uma bactéria diazotrófica que promova um incremento de pelo menos 15% na produção de folhas e colmo, pode ser vantajosa para estes produtores rurais, devido o baixo custo com inoculante por área.

Os dados referentes ao percentual, teores e partição de N por planta de sorgo forrageiro BRS 655 em Seropédica-RJ e Colorado do Oeste, estão descritos nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

As doses de 80 e 120 kg de N ha⁻¹ obtiveram a maior porcentagem de N para a raiz e o colmo, enquanto as bactérias N11, N17, J36, J39, JV50, L60, L66, L72, J9 e 1A e a dose de 40 kg de N ha⁻¹ foram superiores aos outros tratamentos, incrementando de 25,1 a 33,8% no NR em relação à testemunha. Estes percentuais interferiram diretamente no TNR, principalmente, para as estirpes N11, N17, J36, L66, L72, J9 e 1A que obtiveram rendimentos similares às doses de 80 e 120 kg de N ha⁻¹ e superiores aos outros tratamentos. Estas respostas demonstram a importância da FBN realizada por estes procariotos para o suprimento de N para as raízes. Analisando a MSR (Tabela 9) e o TNR, percebe-se que vários mecanismos estão agindo no crescimento e acúmulo de biomassa do sistema radicular, principalmente, pela FBN e síntese de fitormônios. A inoculação não substitui o adubo nitrogenado, porém, promove a melhor absorção e utilização do N disponível (SAUBIDET et al., 2002). Se considerarmos a densidade populacional de 120000 plantas ha⁻¹, teríamos um acréscimo de 1,7 a 3,0 kg de N para as melhores estirpes. Este incremento reestabeleceria uma maior quantidade de N por intermédio da decomposição da raiz, proporcionando, posteriormente, melhoria nas condições químicas e biológicas do solo.

O NC foi superior para as duas maiores doses de N e similares para os outros tratamentos. O aumento no NC foi inferior ao NR, tendo como resultados mais expressivos para os diazotrofos N5, J9, N11, N17 e L66 com incrementos de 8,1 a 20,9%. Estes resultados refletiram obviamente no TNC, onde a dose

maior de N foi superior, seguida pela dose de 80 kg de N ha⁻¹ e esta superior ao restante dos tratamentos. Os procariotos fixadores de N J9, N5, N11, L72, N17, J36 e L66 adicionaram teores de N entre 9,3% a 22,6% comparados à testemunha.

Em relação às folhas, o maior NF foi proporcionado pela maior adubação nitrogenada, seguida pelas doses de 40 e 80 kg de N ha⁻¹ e a estirpe 1^a, que se destacou perante as outras. Entretanto, este maior NR na estirpe 1^a não refletiu em um maior TNF. As doses de N foram diferentes entre si para o TNR, sendo o efeito decrescente da maior para a menor dose. Os tratamentos inoculados foram semelhantes à testemunha, destacando as estirpes N5, J36, Aam82, Inoculante e L60, com incrementos variando de 9,6 a 26,9%.

O NPA foi superior para a maior adubação nitrogenada, seguida pela segunda maior dose. Os tratamentos inoculados foram similares à testemunha e ao tratamento sem adubação. As doses de N foram diferentes entre si para o TNPA, sendo o efeito decrescente da maior para a menor dose, enquanto que os tratamentos inoculados foram semelhantes à testemunha e maiores que o tratamento sem adubação. As estirpes N5, J9, J36, Aam82 e N11, adicionaram quantidades de N na parte aérea variando de 9,8 a 18,2%. Extrapolando estes resultados para 1 ha com uma densidade populacional de 120000 plantas, teríamos um incremento variando de 2,5 a 5,0 kg de N. Por outro lado, as plantas colhidas nesse estudo estavam com 45 DAS e nas condições em campo, geralmente são colhidas entre 100 a 110 DAS, o que permite o maior crescimento e acúmulo de massa seca da parte aérea e, por conseguinte, maior TNPA. Assim, estes resultados são expressivos considerando que aumentaria a quantidade de PB da forragem ou ensilagem de sorgo, melhorando a qualidade do alimento fornecido para os animais.

A maior dose de N foi superior para o NT nas plantas de sorgo, seguido pela segunda maior dose de N e os demais tratamentos foram semelhantes.

Tabela 10 – Porcentagem, teor e partição de nitrogênio por planta de sorgo forrageiro BRS 665 sob o efeito de estirpes bacterianas e doses crescentes de nitrogênio, cultivadas em casa de vegetação em Seropédica – RJ.

*Estirpe/ Tratamento	NR (%)	NC (%)	NF (%)	NPA (%)	NT (%)	TNR (mg)	TNC (mg)	TNF (mg)	TNPA (mg)	TNPI (mg)	PNR (%)	PNC (%)	PNF (%)
N5	0,52c	0,86b	1,58c	1,21c	0,97c	52,0b	79,7c	149,9d	229,6d	281,6d	18,5b	28,1b	53,4 ^a
N11	0,58b	0,76b	1,39c	1,06c	0,90c	56,7 ^a	74,9c	133,5d	208,4d	265,2d	21,4 ^a	28,2b	50,4b
N17	0,62b	0,74b	1,37c	1,06c	0,89c	65,1 ^a	69,9c	129,6d	199,5d	264,6d	24,6 ^a	26,2b	49,2b
J36	0,62b	0,73b	1,41c	1,07c	0,92c	67,4 ^a	69,9c	140,8d	210,4d	277,8d	24,1 ^a	25,1b	50,7b
J39	0,59b	0,63b	1,47c	1,06c	0,91c	48,8b	55,1c	131,8d	186,9d	235,7d	20,9 ^a	23,5b	55,6 ^a
JV49	0,55c	0,66b	1,37c	1,00c	0,86c	49,9b	66,8c	126,2d	193,0d	242,9d	20,3 ^a	27,7b	51,9b
JV50	0,57b	0,72b	1,52c	1,10c	0,97c	35,4b	58,4c	116,1d	174,5d	209,8d	16,8b	27,6b	55,4 ^a
L60	0,57b	0,59b	1,46c	1,01c	0,87c	53,1b	58,2c	137,8d	195,9d	249,1d	21,0a	23,4b	55,5 ^a
L66	0,65b	0,74b	1,36c	1,05c	0,91c	65,4 ^a	69,9c	127,3d	196,9d	262,4d	24,9 ^a	26,5b	48,5b
L72	0,59b	0,72b	1,33c	1,03c	0,87c	66,2 ^a	70,8c	129,1d	199,9d	266,1d	24,7 ^a	26,7b	48,6b
Aam82	0,51c	0,70b	1,45c	1,07c	0,87c	51,3b	68,8c	140,4d	209,3d	260,6d	19,5 ^a	26,4b	54,1b
J9	0,63b	0,84b	1,38c	1,12c	0,96c	59,8 ^a	81,9c	133,0d	214,9d	274,8d	22,2 ^a	29,1b	48,7b
1A	0,64b	0,69b	1,36b	1,02c	0,89c	59,7 ^a	65,8c	125,1d	190,9d	250,3d	23,5 ^a	26,5b	49,9b
Inoculante	0,48c	0,72b	1,51c	1,11c	0,90c	44,6b	65,1c	138,7d	203,8d	248,4d	17,7b	26,4b	55,8 ^a
Sp245	0,46c	0,69b	1,38c	1,03c	0,82c	49,2b	68,9c	129,1d	198,0d	247,2d	19,8 ^a	27,8b	52,3b
ZAE94	0,53c	0,57b	1,36c	0,97c	0,83c	46,6b	52,1c	128,8c	180,8d	227,5d	19,9 ^a	23,2b	56,8 ^a
0 kg N ha⁻¹	0,42c	0,42b	0,89d	0,65c	0,58c	23,4b	26,7c	55,4e	82,1e	105,5e	22,4 ^a	25,3b	52,3b
20 kg N ha⁻¹ (Test.)	0,43c	0,68b	1,31c	1,00c	0,79c	42,4b	63,4c	124,6d	187,9d	230,4d	18,3b	27,6b	54,1 ^a
40 kg N ha⁻¹	0,64b	1,10b	1,88b	1,50c	1,25c	50,2b	103,2c	197,5c	300,8c	351,0c	14,2b	29,5b	56,3 ^a
80 kg N ha⁻¹	0,76 ^a	1,66 ^a	2,06b	1,88b	1,56b	65,4 ^a	159,4b	236,6b	396,0b	461,5b	14,0b	34,7 ^a	51,2b
120 kg N ha⁻¹	0,85 ^a	1,90 ^a	2,58 ^a	2,26 ^a	1,94 ^a	57,8 ^a	194,3 ^a	306,1 ^a	500,4 ^a	558,2 ^a	10,5b	34,7 ^a	54,8 ^a
CV(%)	16,29	17,18	10,83	11,16	10,96	22,07	16,67	10,26	10,31	8,98	20,31	12,43	6,82

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. *Os tratamentos inoculados receberam a dose de 20 kg N ha⁻¹ na semeadura; NR=Percentual de nitrogênio nas raízes; NC= Percentual de nitrogênio no colmo; NF=Percentual de nitrogênio nas folhas; NPA=Percentual de nitrogênio na parte aérea; NT=Percentual de nitrogênio na planta inteira; TNR=Teor de nitrogênio na raiz; TNC=Teor de nitrogênio no colmo; TNF=Teor de nitrogênio nas folhas; TNPA=Teor de nitrogênio na parte aérea; TNPI=Teor de nitrogênio na planta inteira; PNR=Teor percentual de nitrogênio na raiz em relação ao teor de nitrogênio na planta inteira; PNC=Teor percentual do teor de nitrogênio no colmo em relação ao teor de nitrogênio na planta inteira; PNF=Teor percentual de nitrogênio nas folhas em relação ao teor de nitrogênio na planta inteira; Test.=Testemunha não inoculada e adubada com 20 kg N ha⁻¹.

As estirpes bacterianas N5, JV50, J9, J36, L66, N11 e o inoculante, proporcionaram aumento de NT variando de 12,2 a 18,6%.

As doses de N foram diferentes entre si para o TNPI, sendo o efeito decrescente da maior para a menor dose. Os tratamentos inoculados foram semelhantes à testemunha, destacando-se os procariotos diazotróficos N5, J36, J9, L72, N11, L66 e Aam82 com incrementos variando de 12,2 a 18,2%. Assim, o total de N adicionado por ha pela inoculação com estas bactérias diazotróficas seria de 3,6 a 6,1 kg, considerando uma população de 120000 plantas.

A partição de N foi significativa para a PNR, PNC e PNF para o sorgo forrageiro cultivado em Seropédica-RJ (Tabela 10). A grande maioria das estirpes apresentou maior PNR juntamente com o tratamento sem adubação, exceto para a JV50 e o inoculante que foram similares à testemunha e aos tratamentos com as três maiores doses de N. A população de bactérias diazotróficas se concentram, principalmente, no sistema radicular das plantas. Este fato comprova a maior PNR nos tratamentos inoculados. Entretanto, para o PNC os dois tratamentos com as maiores doses de N foram superiores aos demais, acima de 34%. Ademais, para o PNF as estirpes bacterianas N5, J39, JV50, L60, inoculante, ZAE94 foram similares à testemunha e as doses de 40 e 120 kg N ha⁻¹. Estas respostas indicam que há uma tendência de translocação de N do sistema radicular para a parte aérea em plantas adubadas com doses maiores de N. Outro fato constatado, é que a testemunha, provavelmente, transloca grande parte do N para as folhas com a finalidade de sintetizar clorofila para a realização da fotossíntese, como uma forma de compensação pela menor disponibilidade de N nas raízes. Observa-se, geralmente, que as plantas inoculadas não particiona com tanta intensidade o N para a parte aérea, provavelmente, pela maior disponibilidade de N oriundo da FBN e maior população de bactérias nas raízes.

Os resultados para o percentual, o teor e a partição de N do ensaio com sorgo forrageiro BRS 655 associadas com bactérias diazotróficas, encontram-se na Tabela 11. As respostas foram significativas apenas para o NR, NPA e TNF. Analisando o efeito das bactérias e das adubações nitrogenadas para o NR, observou superioridade para a dose de 120 kg de N ha⁻¹, testemunha e das estirpes J36, L60, L66, L72, Aam82, 1A, inoculante e ZAE94. Estes resultados apresentaram respostas diferentes para o ensaio realizado em Seropédica-RJ. Entretanto, demonstra que metade das estirpes, por meio da FBN, incrementa nitrogênio no tecido radicular.

Interessantemente, não houve diferença para o NC e NF entre os tratamentos. Esperava-se que com a adição de doses maiores de N interferisse diretamente no acréscimo desse elemento nesses tecidos. Contudo, o NPA foi superior para a maior dose de N, enquanto que as doses intermediárias (40 e 80 kg de N ha⁻¹), testemunha e as estirpes Aam82, Sp245 e ZAE94 foram similares entre si e, superiores aos demais tratamentos.

As doses de N e à inoculação com bactérias diazotróficas não foram suficientes para modificar o NT nas plantas de sorgo. Os NT encontrados nesse ensaio, geralmente, apresentam valores médios maiores que os encontrado no ensaio em Seropédica-RJ. Possivelmente, devido a maior concentração de MO e da microbiota nativa, as estirpes inoculadas não tiveram competitividade para colonizar adequadamente as plantas de sorgo e incrementar o N por intermédio da FBN. O estabelecimento de um novo organismo pode ser prejudicado pela dinâmica do ecossistema que ele está tentando invadir, como uma forma de mutualismo defensivo (FREITAS, 2007). Os TNR e TNC também não foram influenciados significativamente pela inoculação e pela adubação nitrogenada. As respostas reportadas para TNR, não seguiram um comportamento adequado para os processos conhecidos como a absorção de N pela adubação nitrogenada

e a inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas. A dose de 120 kg de N ha⁻¹ e as estirpes JV50, J36, 1A e JV49 incrementaram de 9,8 a 31,3% o TNC comparativamente com a testemunha. Entretanto, nove estirpes apresentaram valores de TNC menores.

Ainda, considerando os teores de N nas plantas, não houve efeito da adubação e inoculação nos TNPA e TNPI. Observa-se, em valores não significativos, um efeito positivo nestes teores apenas com a dose de 120 kg de N ha⁻¹.

A partição de N ficou distribuída em 13%, 42,8% e 39,5% em média para os tratamentos, não havendo diferença significativa. Constata-se que a maior parte do N da planta foi translocada para o colmo, diferentemente do experimento em Seropédica-RJ, onde o N foi distribuído principalmente para as folhas. Desse modo, percebe-se variabilidade nos resultados entre os dois ensaios. Um dos aspectos dessa variação ocorre, sobretudo, pelo tipo de solo com suas características físico-químicas e, possivelmente, pela microbiota nativa de cada ambiente. O que resta resolver, nos dias atuais, são as causas dessa variabilidade. Um caminho seguido por muitos autores para explicá-la tem sido a colonização das raízes das plantas. Está bem estabelecido que, para interagir com as plantas, quaisquer microrganismos devem, antes de tudo, estabelecer-se em sua rizosfera (ANTOUN et al., 1998; DAVIES e WHITBREAD, 1989; FREITAS, 2007; JJEMBA e ALEXANDER, 1999). A maioria das estirpes utilizadas nesse estudo pertence ao gênero *Azospirillum*, consideradas bactérias rizosféricas e/ou endofíticas facultativas. Algumas espécies do gênero *Azospirillum* possuem mecanismos específicos de interação com as raízes e são aptas a colonizar todo o interior das mesmas, enquanto outras, apenas colonizam a camada de mucilagem ou células do córtex danificadas das raízes (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Um outro aspecto que poderia

reduzir a variabilidade dos resultados, seria o uso de bactérias endofíticas, característica que evitaria, pelo menos parcialmente, o efeito da competição com outros microrganismos nesse habitat reconhecidamente colonizado com tanta intensidade (BARKA et al., 2000). No entanto, também foram utilizadas bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum* (J9, 1A e ZAE94), que não reduziu a variabilidade dos resultados entre os ensaios.

A altura e o diâmetro médio de plantas de sorgo foram influenciados pela inoculação com bactérias diazotróficas e pela fertilização nitrogenada (Figuras 2 e 3). No estágio fenológico V4, as estirpes N11, J36, L72, 1A e Sp245 e as três maiores doses de N estimularam a maiores alturas das plantas de sorgo. Para o diâmetro, os diazotrofos N11, N17, J39, JV49, Sp245 e as três maiores doses de N foram superiores aos demais tratamentos. Isto demonstra que algumas estirpes favorecem o crescimento inicial mais rapidamente que outras bactérias. No estágio V6 não houve diferença estatística entre os tratamentos para altura, enquanto que para o diâmetro dos isolados N11, J39, JV49, 1A e três maiores doses de N determinaram maior expansão do colmo. No estágio V8, a altura foi superior para as doses de 40, 80 e 120 kg de N ha⁻¹ juntamente com 15 estirpes bacterianas, exceto para a JV50 que foi inferior a estes tratamentos, bem como para a testemunha. O tratamento sem adubação e inoculação obteve a menor altura. Nesse estágio não foi avaliado o diâmetro para as plantas de sorgo. Não houve diferença estatística para a altura no estágio fenológico V10. Embora, a testemunha, em valores não significativos, foi maior apenas que o tratamento sem adubação nitrogenada, chegando a ser menor em 3,9 cm do que a estirpe JV49. A bactéria L66 e as três maiores doses de N proporcionaram maior diâmetro para as plantas de sorgo no estágio fenológico V10, enquanto, o tratamento sem adubação e inoculação foi inferior a todos os tratamentos.

Tabela 11 – Porcentagem, teor e partição de nitrogênio por planta de sorgo forrageiro BRS 665 sob o efeito de estirpes bacterianas e doses crescentes de nitrogênio, cultivadas em casa de vegetação em Colorado do Oeste – RO.

*Estirpe/ Tratamento	NR (%)	NC (%)	NF (%)	NPA (%)	NT (%)	TNR (mg)	TNC (mg)	TNF (mg)	TNPA (mg)	TNPI (mg)	PNR (%)	PNC (%)	PNF (%)
N5	0,58b	1,02	2,19	1,35c	1,17	55,1	257,6	219,4b	477,0	532,1	10,4	48,3	41,3
N11	0,56b	0,94	2,08	1,24c	1,08	60,2	259,6	195,9b	455,6	515,8	11,7	49,8	38,4
N17	0,64b	1,05	2,35	1,41c	1,22	74,3	270,4	222,8b	493,3	567,6	13,1	47,1	39,8
J36	0,75 ^a	1,13	2,23	1,42c	1,27	74,5	311,9	217,8b	529,7	604,2	12,4	51,4	36,2
J39	0,59b	1,05	2,25	1,39c	1,21	64,1	257,0	219,1b	476,1	540,2	11,9	47,4	40,6
JV49	0,66b	1,07	2,33	1,40c	1,23	74,4	299,6	221,9b	521,5	595,9	12,7	49,3	37,9
JV50	0,63b	1,13	2,24	1,40c	1,25	61,6	361,4	212,6b	573,8	635,5	10,3	55,4	34,3
L60	0,82 ^a	1,10	2,28	1,47c	1,31	82,4	238,1	230,3b	468,4	550,8	15,1	42,9	41,9
L66	0,77 ^a	1,03	2,38	1,38c	1,25	76,7	279,8	219,8b	499,8	576,5	13,7	47,7	38,5
L72	0,72 ^a	1,05	2,35	1,42c	1,26	77,3	264,8	234,9b	499,7	577,0	13,4	45,8	40,7
Aam82	0,69 ^a	1,22	2,28	1,51b	1,30	74,2	278,6	194,4b	473,0	547,2	13,8	50,2	35,9
J9	0,63b	1,00	2,21	1,33c	1,16	69,8	246,3	213,6b	459,9	529,8	13,3	46,2	40,4
1A	0,78 ^a	1,11	2,29	1,43c	1,27	81,2	305,7	206,8b	512,6	593,8	14,0	50,2	35,8
Inoculante	0,72 ^a	1,01	2,30	1,36c	1,21	81,3	246,4	213,2b	459,6	540,9	15,0	45,5	39,4
Sp245	0,63b	1,16	2,29	1,55b	1,29	65,8	202,0	213,5b	415,6	481,3	13,6	41,8	44,5
ZAE94	0,78 ^a	1,09	2,29	1,48b	1,31	76,9	222,2	216,7b	438,9	515,8	15,1	42,7	42,2
0 kg N ha⁻¹	0,65b	1,06	2,27	1,45c	1,23	65,9	203,4	204,0b	407,5	473,5	13,8	43,0	43,2
20 kg N ha⁻¹ (Test.)	0,73 ^a	1,17	2,38	1,53b	1,34	71,3	270,2	227,5b	497,7	568,9	12,6	47,0	40,4
40 kg N ha⁻¹	0,60b	1,20	2,37	1,58b	1,31	66,9	239,5	228,6b	468,1	535,1	12,4	44,7	42,8
80 kg N ha⁻¹	0,67b	1,23	2,19	1,53b	1,31	76,2	275,4	222,0b	497,4	573,6	14,0	46,8	39,1
120 kg N ha⁻¹	0,69 ^a	1,46	2,73	1,81 ^a	1,55	76,7	393,1	274,7 ^a	667,8	744,6	10,4	52,5	37,1
CV(%)	13,26	10,30	6,62	7,78	7,05	15,57	25,70	7,42	15,66	13,30	21,53	12,61	10,64

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. *Os tratamentos inoculados receberam a dose de 20 kg N ha⁻¹ na semeadura; NR=Percentual de nitrogênio nas raízes; NC= Percentual de nitrogênio no colmo; NF=Percentual de nitrogênio nas folhas; NPA=Percentual de nitrogênio na parte aérea; NT=Percentual de nitrogênio na planta inteira; TNR=Teor de nitrogênio na raiz; TNC=Teor de nitrogênio no colmo; TNF=Teor de nitrogênio nas folhas; TNPA=Teor de nitrogênio na parte aérea; TNPI=Teor de nitrogênio na planta inteira; PNR=Teor percentual de nitrogênio na raiz em relação ao teor de nitrogênio na planta inteira; PNC=Teor percentual do teor de nitrogênio no colmo em relação ao teor de nitrogênio na planta inteira; PNF=Teor percentual de nitrogênio nas folhas em relação ao teor de nitrogênio na planta inteira; Test.=Testemunha não inoculada e adubada com 20 kg N ha⁻¹.

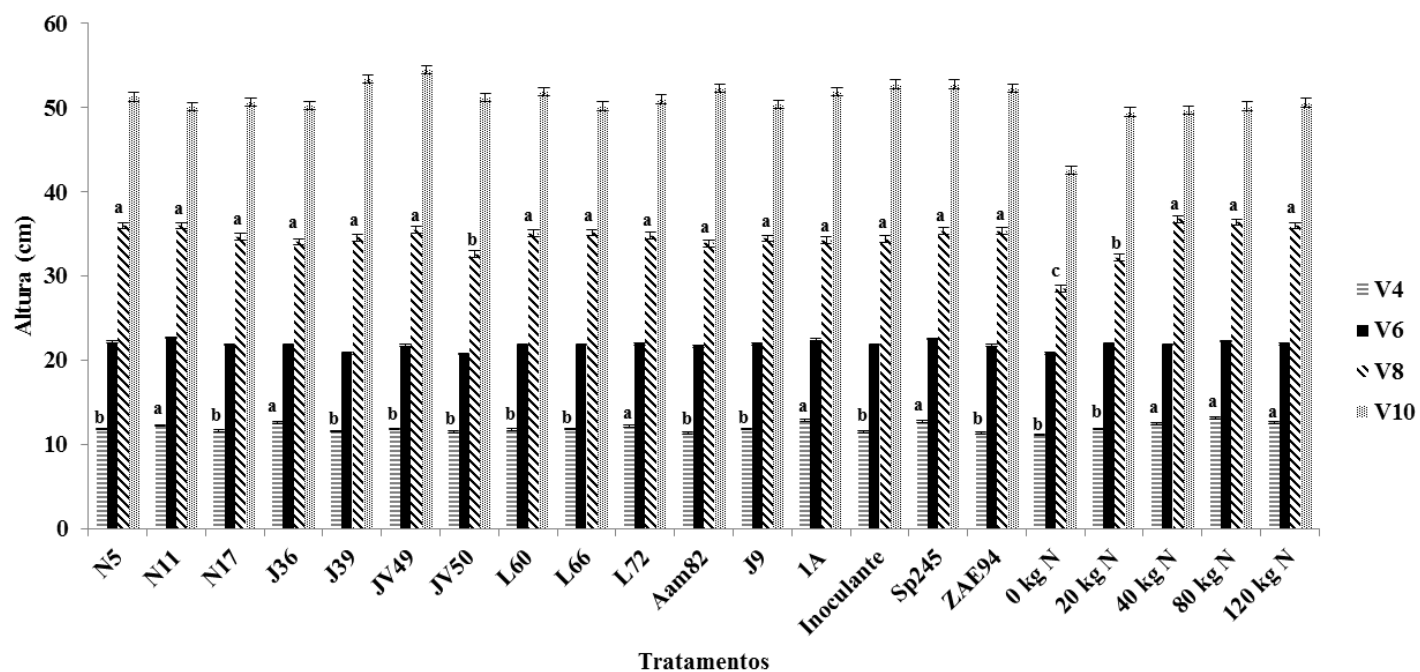


Figura 2 – Altura média de plantas de sorgo forrageiro BRS 665 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterianas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.

Letras minúsculas diferentes entre as colunas dentro do mesmo estágio fenológico, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. As barras acima das colunas representam o erro padrão. CV: V4=7,36%; V6=4,55%; V8=6,66%; V10=8,69. V4=Planta com quatro folhas totalmente desenvolvidas; V6=Planta com seis folhas totalmente desenvolvidas; V8=Planta com oito folhas totalmente desenvolvidas; V10=Planta com dez folhas desenvolvidas.

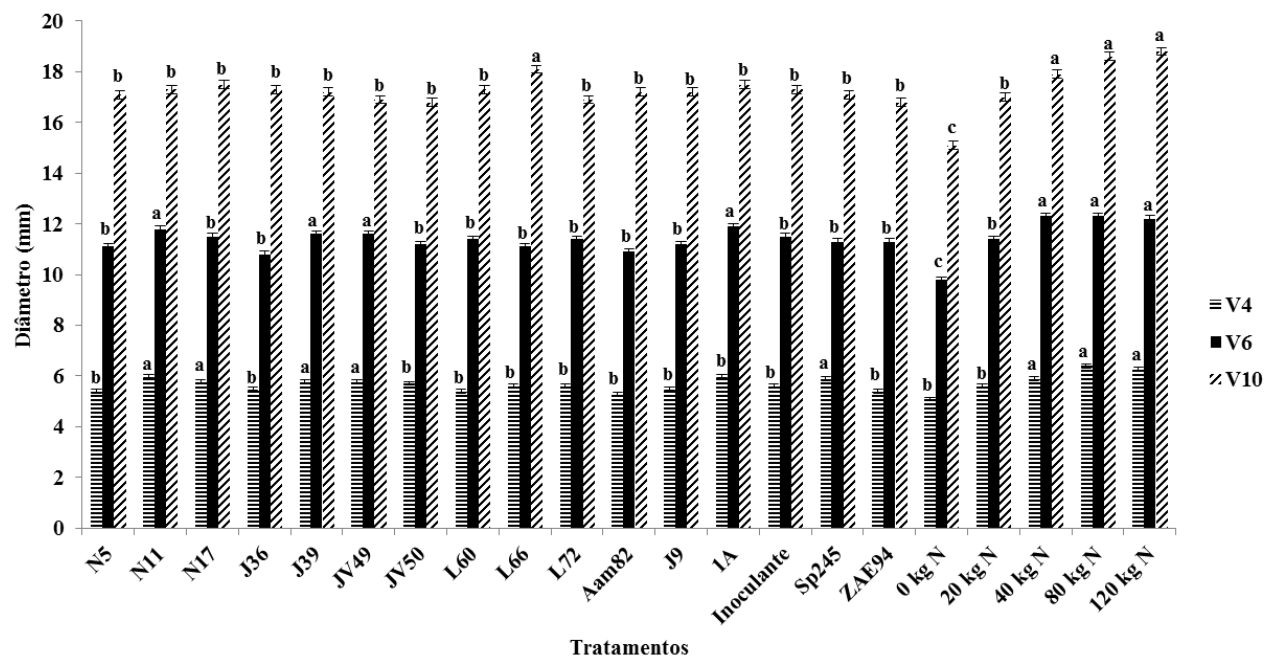


Figura 3 – Diâmetro médio de plantas de sorgo forrageiro BRS 665 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterinas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.

Letras minúsculas diferentes entre as colunas dentro do mesmo estágio fenológico, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. As barras acima das colunas representam o erro padrão. CV: V4=7,16%; V6=5,40%; V10=5,19%. V4=Planta com quatro folhas totalmente desenvolvidas; V6= Planta com seis folhas totalmente desenvolvidas; V10=Planta com dez folhas desenvolvidas.

As plantas de sorgo parecem compensar o crescimento caulinar com a expansão do colmo. As plantas mais altas tendem a ficarem com um colmo menos espesso, em contrapartida as plantas mais baixas alargam mais o colmo. Até um determinado estágio, as plantas, como estratégia, investem mais no espessamento caulinar do que no crescimento vertical, possivelmente, para armazenar substâncias que depois serão redistribuídas para os grãos. Obviamente que outros aspectos estão interagindo como as características genéticas do cultivar, competição por luz, nutrientes e espaço, além da disponibilidade de nutrientes no solo.

O efeito da inoculação em sorgo forrageiro BRS 655 com estirpes de *A. brasilense* N11, *A. formosense* J36, *A. melinis* JV49 e *A. amazonense* L60, cultivado em Seropédica-RJ, pode ser observado na Figura 4.

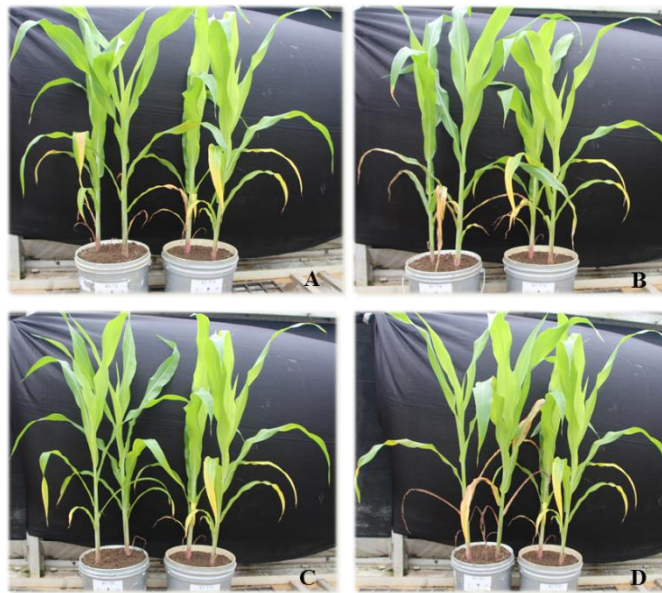


Figura 4 – Efeito da inoculação de sorgo forrageiro BRS 655 com as estirpes de *Azospirillum brasilense* N11 (A), *Azospirillum formosense* J36 (B), *Azospirillum melinis* JV49 (C) e *Azospirillum amazonense* L60 (D) em relação à testemunha (plantas à direita) em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.

Na inoculação com estas bactérias pode verificar o maior desenvolvimento das plantas, como maior altura e coloração mais verde, provavelmente pelo maior teor de clorofila.

Analisando o efeito da inoculação com bactérias diazotróficas e a fertilização nitrogenada para a altura de plantas, não foi verificada influência sobre os estádios fenológicos V4, V6, V8 e V10 para o sorgo forrageiro cultivado em Colorado do Oeste – RO (Figura 5). O diâmetro do colmo das plantas de sorgo forrageiro não foi influenciado nos estádios iniciais de desenvolvimento V4 e V8, entretanto, observou-se efeito no último estágio fenológico avaliado V10 (Figura 6). A estirpe N5 apresentou o maior diâmetro de planta, seguida pelos isolados J36, JV49 e a dose de 80 kg de N ha⁻¹. Na sequência, as estirpes N11, N17, J39, JV50, L60, L72, Aam82 e as doses de 40 e 120 kg de N ha⁻¹ apresentaram diâmetros intermediários. Ainda, com respostas mais inferiores estão às estirpes J9 e 1A. E o tratamento sem adubação, e os isolados L66 e o inoculante, apresentaram os diâmetros de menor espessura. Assim, observa uma grande variação nas respostas em diâmetro de colmos nesse ensaio.

Diante desse cenário observa-se que os resultados obtidos com o sorgo forrageiro cultivado em Colorado do Oeste-RO, não apresenta uma dinâmica de acordo o pressuposto para inoculação e adubação nitrogenada. Nesse sentido, é fundamental estudos mais precisos sobre a interação desses microrganismos nas condições edáficas demonstradas, bem como da microbiota nativa e do genótipo. A mesma espécie vegetal pode estimular comunidades microbianas diversas entre um local e outro, o que leva a respostas diferentes à inoculação de um mesmo isolado promotor de crescimento (CHANWAY et al., 2000). O genótipo da planta afeta a exsudação radicular, sustentando comunidades microbianas diferentes não só para cada espécie vegetal (GU e MAZZOLA, 2001) como para cada variedade dentro de uma mesma espécie (RENGEL et al., 1998).

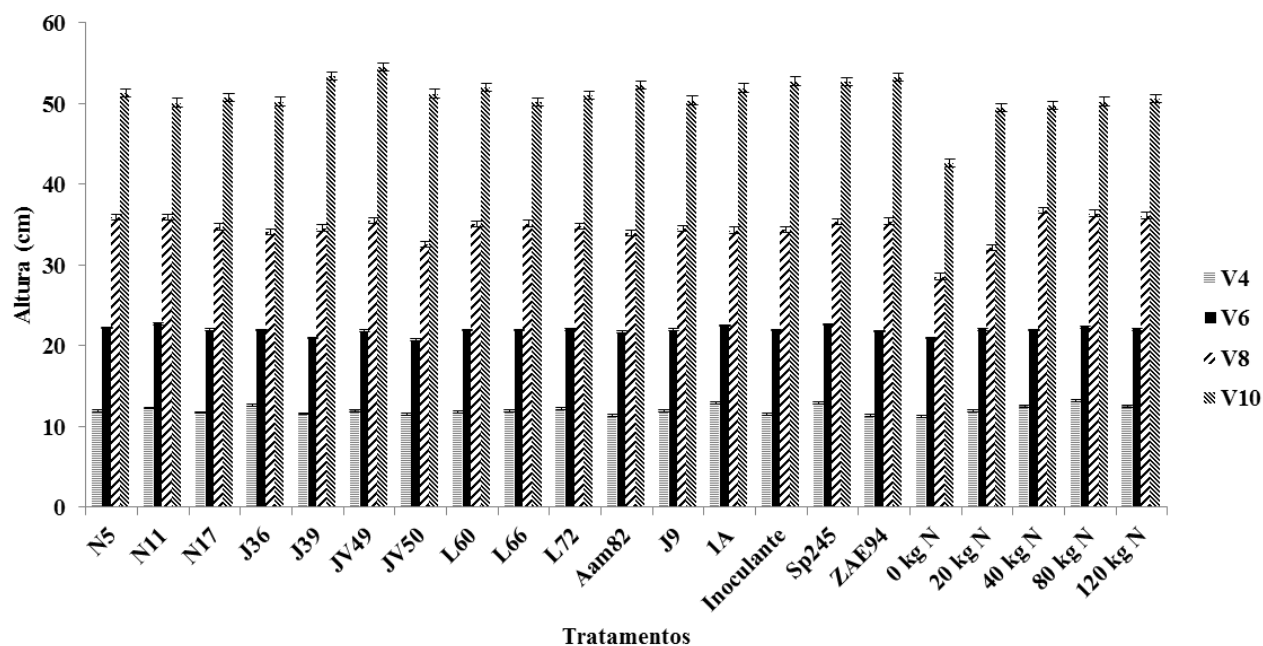


Figura 5 – Altura média de plantas de sorgo forrageiro BRS 665 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterianas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Colorado do Oeste – RO.

Letras minúsculas diferentes entre as colunas dentro do mesmo estágio fenológico, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. As barras acima das colunas representam o erro padrão. CV: V4=31,47%; V6=5,55%; V8=10,12%; V10=12,81%. V4=Planta com quatro folhas totalmente desenvolvidas; V6= Planta com seis folhas totalmente desenvolvidas; V8=Planta com oito folhas totalmente desenvolvidas; V10=Planta com dez folhas desenvolvidas.

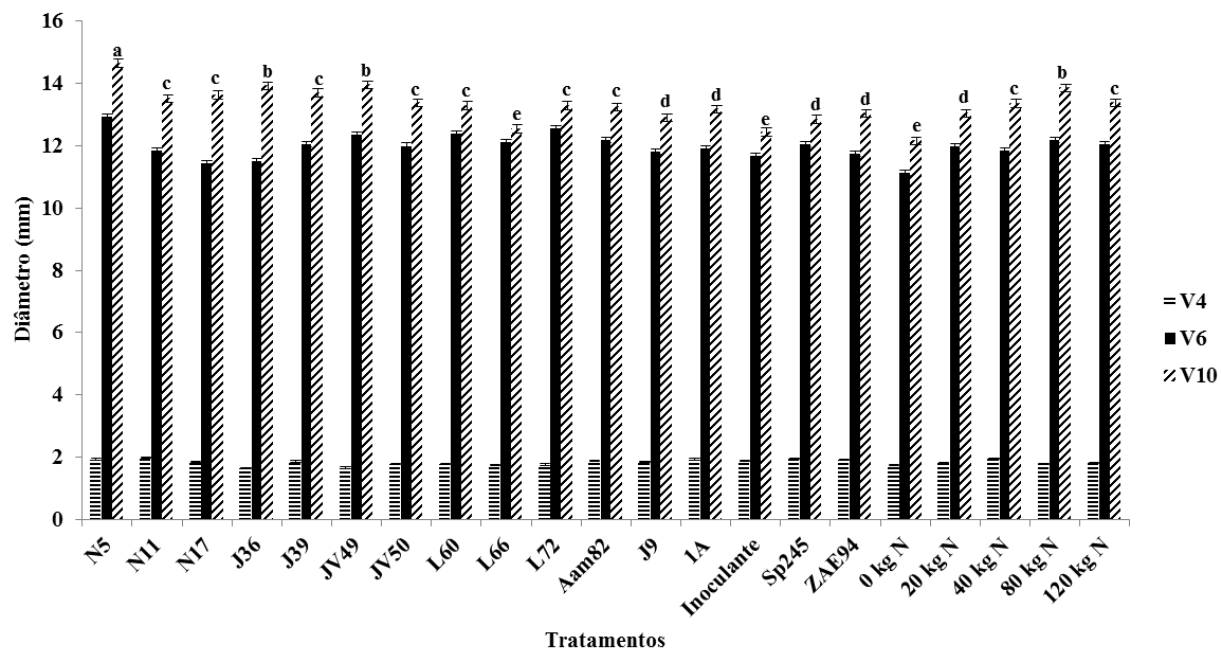


Figura 6 – Diâmetro médio de plantas de sorgo forrageiro BRS 665 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterinas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Colorado do Oeste – RO.

Letras minúsculas diferentes entre as colunas dentro do mesmo estágio fenológico, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. As barras acima das colunas representam o erro padrão. CV: V4=9,32%; V6=5,19%; V10=3,97%. V4=Planta com quatro folhas totalmente desenvolvidas; V6= Planta com seis folhas totalmente desenvolvidas; V10=Planta com dez folhas desenvolvidas.

O efeito das doses crescentes de N foram avaliadas, isoladamente, sobre a MSR, MSC, MSF, MSPA e MSPI em sorgo forrageiro BRS 655 em casa de vegetação nos municípios de Seropédica-RJ e Colorado do Oeste-RO (Figura 7).

Os estudos de regressão apresentaram efeito quadrático para a MSR e MSPI, enquanto que para a MSC, MSF e MSPA houve efeito linear, para o experimento conduzido em Seropédica-RJ. A MSR, inicialmente aumentou da ausência de adubação nitrogenada para a dose de 20 kg de N ha⁻¹ e, posteriormente, reduziu linearmente com o incremento de N. Em contrapartida, as MSC, MSF e MSPA tiveram aumento linear positivo com as doses crescentes de N. Assim, grande porção do N absorvido pelas plantas, não são armazenados nas raízes, mas são, prioritariamente, translocados para a parte aérea das plantas de sorgo forrageiro.

A MSPI revelou comportamento quadrático, aumentando progressivamente até a dose de 80 kg de N ha⁻¹ e logo após, reduzindo com a adubação de 120 kg de N ha⁻¹. A MSPI reduz com a dose maior de N devido a menor de MSR nesta dosagem.

Os estudos de regressão apresentaram comportamento quadrático para todas as massas secas avaliadas em plantas de sorgo forrageiro com adição crescente de N, em Colorado do Oeste-RO.

As MSR e MSF comportaram semelhantemente com as doses crescentes de N, sendo incrementadas até a dose de 80 kg de N ha⁻¹ e reduzidas com o aumento para a dose de 120 kg de N ha⁻¹. As MSC, MSPA e MSPI, apresentaram comportamentos similares, onde houve um incremento com a adição de 20 kg de N ha⁻¹. Logo, com o incremento da dose para 40 kg de N ha⁻¹, as massas foram reduzidas e, posteriormente, acrescentadas linearmente até a dose 120 kg de N ha⁻¹.

Não tem uma elucidação para a redução das MSC, MSPA e MSPI quando houve um aumento na adubação de 20 para 40 kg de N ha⁻¹.

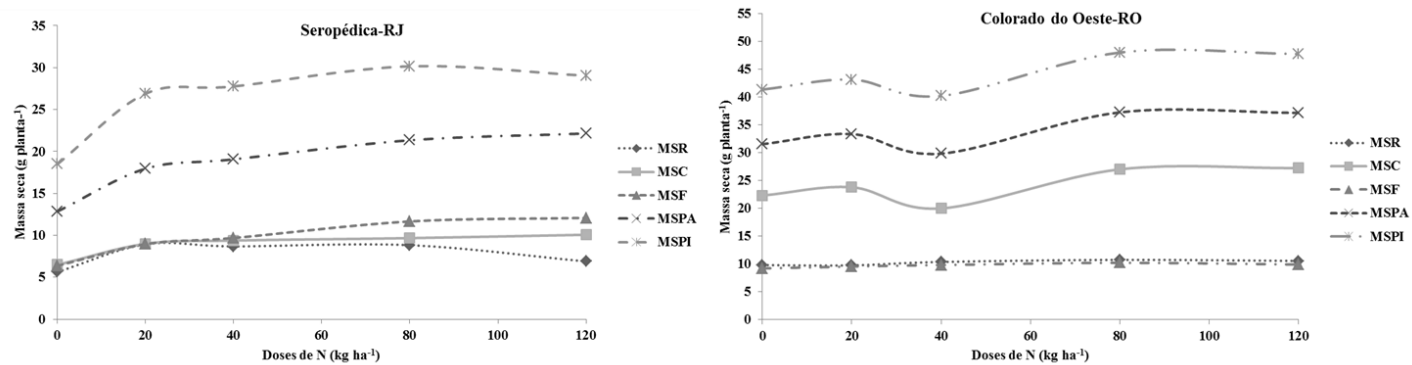


Figura 7 – Massas secas médias de raiz (MSR), colmo (MSC), folha (MSF), parte aérea (MSPA) e planta inteira (MSPI) por planta de sorgo forrageiro BRS 665 cultivados em casa de vegetação sob o efeito de doses crescentes de nitrogênio nos municípios de Seropédica-RJ e Colorado do Oeste-RO.

Equações de regressão, Seropédica-RJ: $\hat{y}=6,1842+0,103x-0,008x^2$, $R^2=81,84\%$ (MSR); $\hat{y}=7,7024+0,0234x$, $R^2=63,74\%$ (MSC); $\hat{y}=7,4315+0,044x$, $R^2=87,27\%$ (MSF); $\hat{y}=15,1333+0,068x$, $R^2=80,12\%$ (MSPA); $\hat{y}=19,7543+0,2792x-0,0017x^2$, $R^2=90,81\%$ (MSPI). Equações de regressão, Colorado do Oeste-RO: $\hat{y}=9,6836+0,0206x-0,0001x^2$, $R^2=86,01\%$ (MSR); $\hat{y}=22,1953+0,006x+0,0003x^2$, $R^2=59,13\%$ (MSC); $\hat{y}=9,1937+0,0235x-0,0001x^2$, $R^2=97,69\%$ (MSF); $\hat{y}=9,1937+0,0235x-0,0001x^2$, $R^2=97,69\%$ (MSPA); $\hat{y}=42,0831-0,1328x+0,000024x^2$, $R^2=80,95\%$ (MSPI).

Analisando os efeitos da inoculação de bactérias sobre o acúmulo de N nos tecidos vegetais de sorgo forrageiro BRS 655, observou-se que as estirpes N5, J9 e L66 tiveram maior influência para o acúmulo dos teores de N nos tecidos vegetais das plantas de sorgo. Além destas, as estirpes N11 e J36 também proporcionaram maiores incrementos de N nos tecidos vegetais, e, em menores proporções, os isolados L72 e Aam82. Nesse sentido, combinando os resultados de produção de massa seca e acúmulo de N nos tecidos vegetais, as estirpes N5, N11, J36, JV49, L60, L66 e J9 devem ser estudadas para avaliação mais precisa dos resultados em plantas de sorgo forrageiro.

3.3 Bactérias diazotróficas associadas à cultura de sorgo granífero BRS 332 em casa de vegetação

Durante o ciclo vegetativo do sorgo granífero BRS 332 foram avaliadas as produções de MFC, MSC, MFF, MSF, MFPA, MSPA em dois experimentos em casa de vegetação nos municípios de Seropédica-RJ e Colorado do Oeste-RO (Tabela 12). Inicialmente serão considerados os efeitos da inoculação e adubação nitrogenada no sorgo granífero em Seropédica-RJ. A produção de MFC foi maior na dose de 80 kg de N ha⁻¹. Em seguida, as doses de 40 e 120 kg de N ha⁻¹ proporcionaram maior acúmulo em relação aos demais tratamentos. A adubação promove um efeito acumulativo máximo na MFC até a adubação com 80 kg de N ha⁻¹ e reduziu quando a fertilização foi aumentada para 120 kg de N ha⁻¹. Este mesmo comportamento foi observado significativamente para a produção de MFPA e em valores não significativos, para as MSC, MFF e MSPA. Este fato comprova que o efeito positivo do N apresenta um ponto máximo de resposta na produção de massa seca da parte aérea de plantas de sorgo cultivados em vasos.

As estirpes bacterianas N11, J39, inoculante, L66, J9 e J36 incrementaram, não significativamente, de 14,3 a 24,2% no acúmulo de MFC

nas plantas de sorgo granífero, quando comparadas à testemunha. Em contrapartida, não houve diferença estatística entre os tratamentos para a MSC. No entanto, houve acréscimo de 12 a 17,1% para as estirpes N11, N17, L66, J39 e o inoculante em comparação à testemunha.

As produções de MFF, MFC, MFPA e MSPA de sorgo granífero não foram influenciadas pela inoculação e pela adubação nitrogenada. Para os acúmulos de MFPA, destacam-se as estirpes N11 e N17 com incrementos de 13,6 e 10,4%, respectivamente em relação à testemunha. As bactérias diazotróficas N11, N17, J39 e L66 promoveram aumentos de 9,4 a 12,1% relacionadas à testemunha.

Os acúmulos de MSC, MFF, MSF, MFPA e MSPA de plantas de sorgo granífero foram influenciados pela inoculação com bactérias diazotróficas e pelas doses crescentes de N, exceto para a produção de MFC, no ensaio conduzido em Colorado do Oeste-RO. Entretanto, os procariotos L60, N17 e Aam82 promoveram aumentos de 12,4 a 17,7% na MFC em relação à testemunha. Analisando o efeito da inoculação e da adubação nitrogenada na MSC, observou-se a superioridade das três maiores doses de N e das estirpes N5, N11, N17, L60, L66, L72, Aam82 e do inoculante sobre a testemunha, o tratamento sem adubação e as outras bactérias.

Com relação ao acúmulo de MFF e MFC, os tratamentos adubados com N, à testemunha e as bactérias diazotróficas N5, N11, N17, J36, L60, L72, Aam82 e o inoculante estimularam maiores incrementos nestas massas secas. Por outro lado, os diazotrofos N11, N17, L60, L72 e Aam82 foram superiores para a MFPA comparando com a testemunha, juntamente com as três maiores aplicações de N. Para a produção de MSPA, as estirpes N5, N11, N17, J36, L60, L66, L72 e o inoculante mais as adubações com 40, 80 e 120 kg de N ha⁻¹, promoveram maior acréscimo em comparação aos outros tratamentos. Dentre, as características de produção avaliadas, a mais almejada é o acúmulo de MSPA.

Tabela 12 – Efeito das estirpes bacterianas isoladas do sorgo e de bactérias padrão na produção de componentes da parte aérea de sorgo granífero BRS 332 em casa de vegetação, colhidos aos 45 dias após a semeadura (estádio vegetativo) nos municípios de Seropédica-RJ e Colorado do Oeste-RO.

*Estirpe/ Tratamento	Seropédica - RJ						Colorado do Oeste – RO					
	MFC (g)	MSC (g)	MFF (g)	MSF (g)	MFPA (g)	MSPA (g)	MFC (g)	MSC (g)	MFF (g)	MSF (g)	MFPA (g)	MSPA (g)
N5	35,56c	5,10	24,27	4,66	59,83c	9,76	72,41	24,25 ^a	52,16 ^a	19,95a	124,57b	44,20a
N11	43,58c	6,43	25,39	5,13	68,98c	11,56	78,52	24,73 ^a	55,79 ^a	20,20a	134,31a	44,93 ^a
N17	40,45c	6,34	26,12	4,92	66,58c	11,26	83,35	25,64 ^a	50,70 ^a	20,67a	134,05a	46,31 ^a
J36	38,58c	5,71	25,85	4,96	64,44c	10,67	74,20	22,54b	50,14 ^a	20,37a	124,34b	42,91 ^a
J39	41,05c	6,06	24,84	5,16	65,89c	11,23	64,36	20,79b	43,23b	18,23b	107,60b	39,02b
JV49	37,99c	5,62	25,73	4,89	63,73c	10,51	68,88	21,71b	41,57b	18,13b	110,45b	39,84b
JV50	35,97c	5,33	25,43	4,57	61,40c	9,90	72,39	22,52b	46,28b	19,41b	118,68b	41,93b
L60	38,09c	5,72	23,85	4,41	61,94c	10,14	87,59	25,98a	50,81a	20,63a	138,41a	46,62 ^a
L66	39,33c	6,10	25,91	5,10	65,24c	11,21	78,08	24,13a	45,84b	19,12b	123,92b	43,25 ^a
L72	32,78c	4,95	23,61	4,29	56,39c	9,24	80,61	23,59a	49,56a	20,18a	130,18a	43,77 ^a
Aam82	38,38c	5,81	25,42	4,82	63,81c	10,63	82,37	24,26a	49,68a	20,12a	132,06a	44,38 ^a
J9	38,94c	5,77	25,74	4,98	64,69c	10,75	74,10	22,97b	46,37b	19,22b	120,47b	42,19b
1A	38,22c	5,54	27,03	5,02	65,25c	10,55	71,56	21,60b	42,66b	18,58b	114,22b	40,18b
Inoculante	39,43c	6,06	26,27	5,00	65,70c	11,07	77,02	23,68a	48,55a	20,09a	125,57b	43,77 ^a
Sp245	38,35c	5,79	25,98	5,11	64,33c	10,90	70,69	22,83b	40,52b	17,76b	111,21b	40,42b
ZAE94	33,04c	4,68	24,47	4,27	57,52c	8,95	72,86	22,03b	42,13b	18,39b	114,99b	40,59b
0 kg N ha⁻¹	25,02c	3,74	20,88	4,03	45,92c	7,76	62,41	20,24b	47,25b	18,15b	109,67b	38,40b
20 kg N ha⁻¹ (Test.)	33,03c	5,33	26,59	4,84	59,63c	10,16	72,13	21,78b	48,25a	19,76a	120,38b	41,54b
40 kg N ha⁻¹	47,16b	6,21	29,06	4,92	76,22b	11,13	77,96	23,92a	51,66a	20,41a	129,62a	44,33 ^a
80 kg N ha⁻¹	62,06a	7,25	29,78	5,47	91,85a	12,73	89,82	25,30a	57,22a	21,83a	147,05a	47,14 ^a
120 kg N ha⁻¹	50,51b	6,21	26,55	4,74	77,06b	10,95	82,56	25,44a	55,78a	21,09a	138,34a	46,54 ^a
CV(%)	18,48	22,80	14,08	16,23	15,57	18,80	15,68	12,13	14,80	6,71	12,49	8,85

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. *Os tratamentos inoculados receberam a dose de 20 kg N ha⁻¹ na semeadura; MFC=Massa fresca de colmo; MSC=Massa seca de colmo; MFF=Massa fresca de folhas; MSF=Massa seca de folhas; MFPA=Massa fresca de parte aérea; MSPA=Massa seca de parte aérea; Test.=Testemunha não inoculada e adubada com 20 kg de N ha⁻¹.

Na combinação geral dos resultados para os dois ensaios de crescimento inicial de sorgo granífero, destacaram-se as estirpes de *A. brasilense* N11 e *S. pavanii* N17, que promoveram maiores adições nas massas secas dos componentes morfológicos da parte aérea. Em segundo plano, observa efeitos intermediários para as estirpes L60, L66, J36, Aam82, L72 e N5.

As bactérias diazotróficas e a adubação nitrogenada influenciaram significativamente nas produções de MSC, MSFC, MFP, MSP, MFG, MSG, MFPA, MSPA, MSPI e MG, bem como no NG de plantas de sorgo granífero cultivadas em casa de vegetação em Seropédica-RJ (Tabela 13).

As bactérias diazotróficas JV50 e L66 possibilitaram as plantas de sorgo granífero incrementar de 13,6 a 22,4% na MSR. Enquanto, que para a MFC, não foram obtidos incrementos relevantes. Já para a MSC, as estirpes N5 e L72, sobressaíram em relação aos outros isolados bacterianos e acrescentaram de 12,1 a 14,8%, no entanto, similares às maiores doses de N (40, 80 e 120 kg ha⁻¹). Para a MFF, as estirpes J36 e Sp245 acrescentaram 11,6 e 11,3%, respectivamente, em relação à testemunha. Por sua vez, os procariotos J39, J36, N17 e Aam82 acumularam uma quantidade de 13,3 a 15,6% de MSF maior em referência à testemunha.

A produção de folhas e colmo pelas plantas de sorgo foram superiores nos tratamentos adubados com 80 e 120 kg de N ha⁻¹. Em seguida, as respostas mais significativas foram dadas pelas estirpes N5 e L72, com adições de 11,6 a 13,4% de MSFC comparadas à testemunha. Os outros tratamentos foram similares entre si.

As duas maiores doses de N proporcionaram maior acúmulo de MFP e MSP. Na produção de MSP, as estirpes foram similares à dose de 40 kg de N ha⁻¹ e à testemunha, exceto para o inoculante que foi inferior a estes. O tratamento não adubado foi inferior a todos os tratamentos para MSP. As adubações com 80 e 120 kg de N ha⁻¹ foram superiores para MFG e MSG, enquanto, as estirpes,

exceto o inoculante, foram similares ao tratamento adubado com 40 kg de N ha⁻¹ e superiores à testemunha. O tratamento sem adubação nitrogenada foi inferior tanto para MFG e MSG. As aplicações de 80 e 120 kg de N ha⁻¹ foram superiores para os acúmulos de MFPA, MSPA e MSPI. As estirpes bacterianas N5 e Sp245, incrementaram de 10,8 a 11,7% em relação à testemunha para MFPA. A maioria das estirpes obtiveram respostas significativas para MSPA e MSPI em relação à testemunha, exceto para as J36, J9 e o inoculante comercial. O tratamento sem N obteve a menor resposta para estas massas.

Dentre os tratamentos, as doses de 80 e 120 kg de N ha⁻¹ produziram NG acima de 1400. O tratamento não adubado produziu em média, apenas 448 grãos por panícula, obtendo a menor produção. Os outros tratamentos obtiveram respostas similares com grãos variando de 771 a 990 grãos por panícula. Contudo, avaliando o PG as duas maiores doses de N, o tratamento não adubado e as estirpes N5, J39, J9 e 1A produziram grãos mais pesados. Interessantemente, o tratamento não inoculado produziu grãos pesados, compensando dessa forma o menor NG.

A parte econômica da cultura do sorgo granífero obviamente está na produção de grãos. Assim, estirpes bacterianas que promovam, prioritariamente, o incremento na MSG, devem ser almejadas. No ensaio em Seropédica – RJ, das 16 estirpes avaliadas, 13 proporcionaram efeito positivo para a maior massa da panícula com grãos. Ademais, diversos isolados apresentaram efeito no incremento na massa total das plantas de sorgo, demonstrando, provavelmente, o efeito combinado da FBN e da síntese de reguladores de crescimento. Ainda as plantas inoculadas, no estágio reprodutivo, manifestaram uma coloração verde mais intensa do colmo e das folhas, provavelmente, em virtude da maior concentração de clorofila, podendo assim, sintetizar mais fotoassimilados. Possivelmente, estas bactérias com o incremento de N, favorece a manutenção do *stay green*, o que pode ter influenciado no aumento do rendimento de grãos.

Tabela 13 – Massas dos componentes morfológicos da parte aérea, massa de raízes e número de grãos de sorgo granífero BRS 332 cultivado em casa de vegetação (ciclo reprodutivo) inoculado com estirpes bacterianas e com doses crescentes de nitrogênio em Seropédica – RJ.

Estirpe/ Trat. ¹	MSR (g)	MFC (g)	MSC (g)	MFF (g)	MSF (g)	MSFC (g)	MFP (g)	MSP (g)	MFG (g)	MSG (g)	MFPA (g)	MSPA (g)	MSPI (g)	NG	MG (mg)
N5	4,2c	34,5	12,8a	12,0	7,4	20,2b	25,5b	19,8b	21,5b	17,8b	72,1b	40,0b	44,2b	731b	24,4 ^a
N11	3,9c	32,6	10,8b	11,2	7,2	17,9c	24,8b	19,7b	20,9b	17,6b	68,7b	37,7b	41,6b	859b	21,3b
N17	3,8c	28,8	10,2b	11,5	7,5	17,7c	24,3b	19,5b	20,7b	17,5b	64,5b	37,2b	40,9b	839b	20,9b
J36	3,6c	27,7	9,8b	12,3	7,5	17,4c	22,8b	18,2b	19,1c	16,2c	62,8b	35,6c	39,2c	800b	20,8b
J39	3,8c	24,9	9,7b	12,0	7,7	17,4c	25,1b	21,0b	21,7b	18,7b	62,1b	38,4b	42,2b	817b	23,2 ^a
JV49	3,8c	33,1	11,1b	10,4	6,9	17,9c	24,2b	19,6b	20,6b	17,5b	67,7b	37,5b	41,4b	782b	21,3b
JV50	4,9c	32,1	11,2b	11,7	7,3	18,5c	24,9b	20,1b	21,3b	18,0b	68,8b	38,6b	43,6b	824b	20,9b
L60	4,1c	32,1	10,8b	11,2	7,3	18,2c	24,1b	19,5b	20,8b	17,5b	67,4b	37,7b	41,7b	851b	20,3b
L66	4,4c	26,1	9,8b	10,3	7,2	17,1c	23,2b	19,5b	20,4b	17,6b	59,6b	36,5b	40,9b	912b	19,9b
L72	3,8c	32,2	12,4a	10,6	7,3	19,8b	25,2b	20,6b	21,5b	18,4b	68,0b	40,4b	44,2b	990b	20,1b
Aam82	3,7c	31,2	11,1b	11,8	7,5	18,6c	25,0b	20,3b	21,4b	18,1b	67,9b	38,9b	42,7b	871b	21,4b
J9	3,7c	25,4	9,5b	8,6	7,0	16,4c	22,2b	18,5b	19,1c	16,5c	56,2b	34,9c	38,7c	734b	23,2 ^a
1A	4,3c	32,7	11,3b	11,5	6,7	18,0c	24,6b	19,8b	21,1b	17,8b	68,8b	37,7b	42,0b	735b	23,5 ^a
Inoc.*	4,2c	30,5	10,2b	10,6	6,6	16,9c	21,7b	17,2c	18,3c	15,4c	62,8b	34,1c	38,3c	802b	19,8b
Sp245	4,1c	33,3	11,3b	12,4	7,3	18,6c	25,6b	20,4b	23,0b	18,3b	71,4b	38,9b	43,0b	861b	21,2b
ZAE94	4,1c	29,8	11,1b	11,3	6,8	17,9c	24,6b	20,2b	20,9b	17,8b	65,7b	38,1b	42,1b	820b	19,8b
0 kg N	3,2c	24,3	8,5b	9,8	6,2	14,7c	17,4b	13,7d	14,6d	12,2d	51,5b	28,5d	31,7d	448c	23,6 ^a
20 kg N	3,8c	31,0	10,9b	11,0	6,5	17,5c	23,8b	19,4b	18,6c	15,7c	63,7b	34,9c	38,7c	834b	19,6b
40 kg N	4,1c	31,8	12,1a	11,4	7,2	19,2c	29,3b	23,9b	25,3b	21,5b	72,5b	43,2b	47,2b	976b	22,4b
80 kg N	6,1b	34,2	14,2a	10,5	7,7	21,9a	46,5a	40,5a	41,4 ^a	36,4a	91,2a	62,4a	68,5a	1517a	25,6 ^a
120 kg N	7,6a	36,4	14,2a	11,5	8,4	22,7a	49,9a	43,2a	43,7 ^a	38,4a	97,9a	65,9a	73,6a	1413a	26,8 ^a
CV(%)	19,00	24,30	15,56	17,85	11,35	10,28	12,12	12,30	11,99	11,79	14,94	9,44	9,44	11,6	10,56

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. ¹Trat=Tratamento; MSR=Massa seca de raiz; MFC=Massa fresca de colmo; MSC=Massa seca de colmo; MFF=Massa fresca de folhas; MSF=Massa seca de folhas; MSFC=Massa seca de folhas e colmo; MFG=Massa fresca de grãos; MSG=Massa seca de grãos; MFP=Massa fresca de panícula com grãos; MSP=Massa seca de panícula com grãos; MFPA=Massa fresca da parte aérea total; MSPA=Massa seca da parte aérea total; MSPI=Massa seca da planta inteira (raiz+parte aérea total); NG=Número de grãos por planta; MG=Massa seca por grão; *Inoc.=Inoculante comercial à base de *Azospirillum brasilense* AbV5 e AbV6.

As produções de MFC, MFG, MSG, MFP, MFPA e MSPI de plantas de sorgo foram influenciadas pela inoculação e adubação crescente de N no experimento conduzido em casa de vegetação em Colorado do Oeste-RO (Tabela 14).

Primeiramente, não houve interferência da inoculação e adubação na MSR, porém, a estirpe J39 proporcionou um incremento de 13,4% em relação à testemunha. Para a MFC, também não houve diferença, mas as bactérias J39 e Sp245 promoveram aumento de 13,8 e 11,4% respectivamente. O diazotrofo J39 incrementou significativamente a MSC em comparação aos outros tratamentos.

As MFF e MSF foram similares para todos os tratamentos, não havendo diferenças relevantes. A MSFC também não foi promovida com a inoculação de bactérias, tampouco com a adubação, apenas a estirpe J39 incrementou aproximadamente 12,0% relativo à testemunha.

As doses de 40, 80 e 120 kg de N ha⁻¹ proporcionaram maior acúmulo de MFG, similarmente às estirpes N5, N11, J36, JV49, JV50, L66, J9, 1A, inoculante e o tratamento sem adubação. Inesperadamente, o tratamento sem adubação apresentou alto acúmulo de MFG, provavelmente favorecido por uma maior absorção de água, em virtude, da maior emissão de raízes laterais para a tentativa de alcançar nutrientes minerais no solo. Entretanto, para o MSG, o tratamento foi inferior às três maiores doses de N e as estirpes N5, N11, J36, JV49, JV50, J9, 1A e o inoculante. Estas estirpes foram superiores à testemunha.

Para a produção de MFPA, não houve acréscimo pela inoculação e adubação nitrogenada. Apesar disso, o acúmulo para MSPA foi superior para as três maiores doses de N e para as estirpes bacterianas N5, N11, JV49, JV50, J9 e o inoculante. De modo semelhante, a MSPI foi maior para os tratamentos com adubação de 40, 80 e 120 kg de N ha⁻¹ e para os isolados N5, N11, J39, JV49, JV50, J9 e o inoculante. Os NG e PG não foram influenciados significativamente pelos tratamentos inoculados e pela adubação nitrogenada.

Tabela 14 – Massas dos componentes morfológicos da parte aérea, massa seca das raízes e número de grãos de sorgo granífero BRS 332 cultivado em casa de vegetação (ciclo reprodutivo) inoculado com estirpes bacterianas e com doses crescentes de nitrogênio em Colorado do Oeste – RO.

Estirpe/ Tratamento	MSR (g)	MFC (g)	MSC (g)	MFF (g)	MSF (g)	MSFC (g)	MFG (g)	MSG (g)	MFP (g)	MSP (g)	MFPA (g)	MSPA (g)	MSPI (g)	NG	MG (mg)
N5	10,6	39,6	22,8b	19,9	17,8	40,6	40,8a	37,9a	44,9 ^a	39,8a	104,5	80,5a	91,1a	1397	26,6
N11	11,4	43,2	24,4b	19,6	17,7	42,1	39,7a	35,3a	43,7 ^a	37,4a	106,5	79,5a	91,0a	1010	33,4
N17	10,3	46,8	24,6b	18,9	17,1	41,7	33,4b	27,7b	36,9b	29,7b	102,7	71,5b	81,8b	856	39,6
J36	10,9	45,9	22,7b	20,8	17,7	40,4	38,9a	34,0a	42,6 ^a	36,1a	109,3	76,5b	87,4b	1122	31,4
J39	12,7	51,5	29,7a	19,7	18,2	47,9	32,9b	25,5b	36,3b	27,7b	107,5	75,7b	88,4a	859	29,0
JV49	10,8	48,4	25,8b	20,5	18,4	44,2	40,6a	33,6a	44,2 ^a	35,6a	113,1	79,8a	90,7a	1191	31,4
JV50	10,6	44,1	23,2b	19,9	17,7	40,9	39,8a	34,8a	43,5 ^a	36,8a	107,6	77,8a	88,5a	1435	23,5
L60	10,4	47,3	23,3b	20,4	16,8	40,1	31,8b	27,5b	35,1b	29,5b	102,8	69,6b	80,0b	732	42,4
L66	9,7	48,4	24,4b	20,6	17,9	42,3	38,5a	31,6b	41,3 ^a	33,5b	110,3	75,8b	85,6b	908	38,2
L72	9,6	43,0	22,2b	20,1	17,3	39,5	32,7b	27,9b	36,4b	30,2b	99,5	69,7b	79,3b	1066	25,2
Aam82	9,9	47,0	24,4b	21,5	17,9	42,3	36,4b	31,2b	40,1b	33,4b	108,6	75,8b	85,7b	1213	23,7
J9	10,2	46,0	24,7b	19,8	17,8	42,6	41,8a	35,5a	44,8 ^a	37,4a	110,7	80,0a	90,2a	1256	32,9
1A	10,8	47,9	24,3b	20,2	17,9	42,2	37,6a	32,6a	41,1 ^a	34,6b	109,3	76,8b	87,6b	1042	31,5
Inoc.*	9,6	45,2	23,8b	20,5	17,9	41,7	40,8a	35,3a	44,3 ^a	37,1a	110,0	78,8a	88,4a	1038	33,8
Sp245	10,7	50,1	23,9b	22,1	17,7	41,6	36,1b	29,4b	38,7b	31,5b	110,9	73,2b	83,9b	976	35,9
ZAE94	10,7	47,8	25,4b	20,6	17,9	43,3	34,9b	30,4b	38,6b	32,7b	107,1	76,1b	86,7b	1024	31,4
0 kg N	10,9	43,1	23,7b	19,6	17,6	41,3	38,2a	31,7b	41,0a	33,2b	103,7	74,5b	85,5b	1069	39,3
20 kg N	11,0	44,4	24,6b	19,4	17,6	42,2	34,2b	30,6b	37,4b	32,3b	101,2	74,5b	85,6b	1283	22,4
40 kg N	11,2	44,6	24,8b	20,7	18,7	43,6	42,8a	37,3a	46,9 ^a	39,7a	112,3	83,3a	94,5a	1385	27,5
80 kg N	11,7	45,2	23,9b	21,9	18,8	43,0	38,8a	35,0a	44,0a	39,1a	111,1	82,1a	93,8a	1272	28,9
120 kg N	11,9	44,5	24,7b	21,1	19,0	43,5	40,2a	36,5a	46,5 ^a	41,3a	112,1	84,8a	96,7a	1278	29,5
CV(%)	11,32	15,09	9,70	9,04	5,17	6,97	14,84	16,42	13,53	15,35	8,01	7,98	7,13	23,69	39,56

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. MSR=Massa seca de raiz; MFC=Massa fresca de colmo; MSC=Massa seca de colmo; MFF=Massa fresca de folhas; MSF=Massa seca de folhas; MSFC=Massa seca de folhas e colmo; MFG=Massa fresca de grãos; MSG=Massa seca de grãos; MFP=Massa fresca de panícula com grãos; MSP=Massa seca de panícula com grãos; MFPA=Massa fresca da parte aérea total; MSPA=Massa seca da parte aérea total; MSPI=Massa seca da planta inteira (raiz+parte aérea); NG=Número de grãos por planta; MG=Massa seca por grão;

*Inoc.=Inoculante comercial à base de *Azospirillum brasilense* AbV5 e AbV6.

Analisando paralelamente as respostas das produções de massas dos tecidos vegetais e da planta total de sorgo granífero nos dois ensaios, constata-se que a estirpe bacteriana *B. safensis* N5 sobressaiu em relação às outras. Diante disso, pode-se deduzir que esta bactéria teve uma maior habilidade em sobreviver no solo e sucesso na colonização subsequente da rizosfera. Ainda, em segundo plano, as estirpes Sp245, J39, JV50 e Aam82 apresentaram resultados satisfatórios nos dois ambientes. Isoladamente, com efeitos relevantes na produção de massas de plantas de sorgo granífero em Seropédica - RJ, destaca-se a estirpe L72, enquanto, que para as condições edafoclimáticas de Colorado do Oeste – RO, os diazotrofos J9, N11, JV49 e o inoculante também apresentaram acúmulos significativos. Portanto, respostas variáveis podem ser em função do genótipo da planta (INIGUEZ et al., 2004), do teor de MO no solo (DOBBELAERE et al., 2002), e da comunidade nativa de microrganismos (BALDANI et al., 1986). Por isso, diversos autores elencam várias razões que podem influenciar no sucesso da inoculação. De acordo Cardoso e Nogueira (2007), os exsudatos radiculares influenciam o crescimento de bactérias e fungos que colonizam a rizosfera pela alteração do ambiente do solo circundante, servindo como substrato para crescimento seletivo de microrganismos do solo, capazes de utilizar eficientemente determinado substrato. Por esta razão, algumas bactérias podem ser mais eficientes em um ambiente do que em outro, e até mesmo nos dois como o ocorrido nesse estudo. As interações raiz-microrganismos podem ocorrer em níveis que variam desde associações puramente comensais, passando pelas associações protooperativas e amensais, até as simbioses, que podem ser mutualísticas ou parasíticas. Dessa forma, várias interações ecofisiológicas ocorrem no ambiente rizosférico, e o que se observa como crescimento e produção vegetal é resultado § dessas interações, favorecendo ou prejudicando a plena expressão do potencial genético da planta (CARDOSO e FREITAS, 1992).

Jadoski et al. (2016) avaliando *A. brasilense* em sorgo sacarino encontraram aumento na eficiência fotossintética das plantas, afirmando que estas bactérias podem reduzir os custos da cultura com a fertilização nitrogenada. Yonn et al. (2015) estudaram a colonização de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em genótipos de sorgo granífero e sacarino, encontrando estas bactérias endofíticas nas raízes, colmos e folhas, indicando potencial agrônomo para esta cultura. Santos et al. (2017), estudando bactérias diazotróficas dos gêneros *Burkholderia* e *Herbaspirillum* não efeitos positivos para o acúmulo de massa seca nas raízes e parte aérea de sorgo granífero em casa de vegetação. Diferentemente, no presente estudo foram reportados efeitos positivos sobre a produção de MSR e dos componentes da parte aérea.

As porcentagens e os teores de N dos componentes morfológicos das plantas de sorgo granífero BRS 332 cultivadas em Seropédica – RJ, encontram-se na Tabela 15. Não houve diferença para NR, NC, NP e NT entre os tratamentos. As doses de 80 e 120 kg de N ha⁻¹ proporcionaram maiores NF e NG. As estirpes não possibilitaram incrementos significativos para os percentuais de N nos componentes morfológicos das plantas em comparação à testemunha. O TNR foi superior para a adubação com 120 kg de N ha⁻¹, seguido pela dose de 80 kg de N ha⁻¹. A estirpe JV50 incrementou em 19,9% o TRN em relação à testemunha.

As adubações com 80 e 120 kg de N ha⁻¹ foram superiores para os TNC e TNF em relação aos demais tratamentos. Entretanto, nos TNP, TNG e TNPI a aplicação de 120 kg de N ha⁻¹ promoveu os maiores aumentos, seguida pela adubação com 80 kg de N ha⁻¹. A estirpe N5 proporcionou aumento no TNC de 11,3% em comparação à testemunha. Enquanto, os isolados JV50, Sp245, 1A e Aam82 incrementaram o TNF de 14,1 a 20,2% em referência à testemunha. As bactérias Aam82, JV50 e ZAE94, incrementaram de 14,7 a 20,2% o TNP.

Tabela 15 – Percentual e teores de nitrogênio em plantas de sorgo granífero BRS 332 sob o efeito de estirpes bacterianas e doses crescentes de nitrogênio, cultivadas em casa de vegetação em Seropédica-RJ.

Estirpe/ Tratamento	NR (%)	NC (%)	NF (%)	NP (%)	NG (%)	NT (%)	TNR (mg)	TNC (mg)	TNF (mg)	TNP (mg)	TNG (mg)	TNPI (mg)
N5	0,38	0,18	0,46b	0,47	0,74c	0,48c	16,1b	23,9b	36,5b	8,1c	126,6c	211,3c
N11	0,36	0,17	0,46b	0,42	0,77c	0,50c	15,4b	19,7b	35,1b	9,5c	141,7c	221,5c
N17	0,37	0,19	0,40b	0,39	0,75c	0,49c	16,3b	21,2b	31,8b	9,2c	135,7c	214,3c
J36	0,36	0,19	0,45b	0,42	0,75c	0,49c	13,1b	21,3b	33,9b	9,4c	125,0c	202,8c
J39	0,38	0,22	0,43b	0,40	0,76c	0,50c	15,5b	22,0b	30,9b	9,2c	126,5c	204,2c
JV49	0,35	0,17	0,45b	0,41	0,84c	0,51c	13,6b	21,7b	31,5b	9,7c	141,3c	217,8c
JV50	0,37	0,17	0,53b	0,47	0,79c	0,52c	19,9b	20,4b	42,0b	10,7c	135,8c	228,8c
L60	0,38	0,18	0,45b	0,40	0,72c	0,48c	15,9b	19,8b	36,1b	9,4c	125,3c	206,4c
L66	0,35	0,17	0,47b	0,45	0,72c	0,49c	16,0b	18,8b	34,6b	8,5c	134,3c	212,2c
L72	0,37	0,17	0,45b	0,45	0,78c	0,53c	14,4b	19,9b	35,7b	9,8c	158,7c	238,6c
Aam82	0,37	0,15	0,50b	0,46	0,76c	0,50c	13,8b	18,6b	37,4b	10,9c	138,9c	219,8c
J9	0,34	0,18	0,36b	0,36	0,84c	0,51c	12,6b	16,8b	27,4b	8,1c	124,5c	189,5c
1A	0,36	0,15	0,54b	0,38	0,77c	0,50c	17,1b	17,2b	39,0b	7,8c	126,8c	208,1c
Inoculante	0,39	0,18	0,50b	0,43	0,94c	0,55c	15,7b	19,6b	36,2b	7,8c	136,1c	215,5c
Sp245	0,37	0,18	0,52b	0,44	0,79c	0,53c	15,9b	20,5b	39,8b	9,7c	147,5c	233,5c
ZAE94	0,38	0,18	0,52b	0,41	0,78c	0,52c	14,7b	20,6b	38,3b	10,2c	133,2c	217,1c
0 kg N ha⁻¹	0,44	0,16	0,53b	0,44	0,92c	0,55c	14,6b	14,2b	33,7b	8,2c	94,8c	165,6c
20 kg N ha⁻¹	0,43	0,18	0,47b	0,43	0,83c	0,53c	16,0b	21,2b	33,5b	8,7c	133,1c	212,5c
40 kg N ha⁻¹	0,36	0,18	0,45b	0,45	0,96c	0,60c	15,7b	21,8b	34,5b	11,6c	201,2c	284,9c
80 kg N ha⁻¹	0,41	0,23	0,65a	0,55	1,48b	0,96b	24,5b	36,2a	53,5a	23,1b	542,5b	679,3b
120 kg N ha⁻¹	0,45	0,26	0,72a	0,55	1,79a	1,08a	39,4a	42,0a	61,6a	29,6a	656,9a	829,6a
CV(%)	13,14	17,57	16,27	15,38	12,38	8,81	21,85	23,38	15,99	31,34	19,98	14,19

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. NR=Percentual de nitrogênio nas raízes; NC=Percentual de nitrogênio no colmo; NF=Percentual de nitrogênio nas folhas; NP=Percentual de nitrogênio na panícula sem grãos; NG=Percentual de nitrogênio nos grãos; NT=Percentual de nitrogênio na planta inteira; TNR=Teor de nitrogênio na raiz; TNC=Teor de nitrogênio no colmo; TNF=Teor de nitrogênio nas folhas; TNP=Teor de nitrogênio na panícula sem grãos; TNG=Teor de nitrogênio nos grãos; TNPI=Teor de nitrogênio na planta inteira.

Nos grãos, as estirpes L72 e Sp245, propiciaram aumentos de 16,1 e 9,8% no TNG em comparação à testemunha, respectivamente. Enfim, os diazotrofos L72 e Sp245 aumentaram o TNPI em 10,9 e 9,0% em relação à testemunha, respectivamente.

Tabela 16 – Partição percentual dos teores de nitrogênio na raiz (PNR), colmo (PNC), folha (PNF), panícula (PNP) e grãos (PNG) em plantas de sorgo granífero BRS 332 cultivadas em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.

Estirpe/ Tratamento	PNR (%)	PNC (%)	PNF (%)	PNP (%)	PNG (%)
N5	7,75	11,35	17,06a	3,90	59,93c
N11	6,98	8,96	15,53a	4,29	64,23c
N17	7,75	9,90	14,65a	4,31	63,37c
J36	6,52	10,53	16,80a	4,63	61,52c
J39	7,59	10,76	15,18a	4,51	61,95c
JV49	6,22	9,98	14,45a	4,47	64,87c
JV50	8,72	8,95	18,22a	4,69	59,39c
L60	7,73	9,62	17,38a	4,53	60,72c
L66	7,54	8,63	16,16a	3,92	63,74c
L72	6,03	8,26	14,86a	4,11	66,72c
Aam82	6,30	8,46	16,93a	5,02	63,28c
J9	6,69	8,86	14,31a	4,25	65,88c
1A	8,21	8,29	18,64a	3,78	61,03c
Inoculante	7,27	9,13	16,74a	3,66	63,19c
Sp245	6,82	8,76	17,03a	4,18	63,21c
ZAE94	6,72	9,48	17,45a	4,75	61,58c
0 kg N ha ⁻¹	8,73	8,57	20,23a	5,01	57,45c
20 kg N ha ⁻¹	7,55	9,96	15,72a	4,11	62,63c
40 kg N ha ⁻¹	5,49	7,69	12,09b	4,11	70,61b
80 kg N ha ⁻¹	3,76	5,28	8,15c	3,60	79,20a
120 kg N ha ⁻¹	4,73	5,09	7,45c	3,55	79,17a
CV(%)	22,74	20,88	15,23	27,03	4,23

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Contudo, apesar dos valores baixos nos incrementos, observa-se que das 16 estirpes testadas, 10 apresentaram valores maiores para o TNG e 9 para o TNPI, mesmo não significativos. Ainda, não houve diferença significativa desses percentuais e teores de N entre as estirpes bacterianas e o tratamento adubado com 40 kg de N ha⁻¹. Ademais, em razão do incremento, descrito anteriormente, nas massas dos componentes morfológicos das plantas de sorgo, esperavam-se melhores efeitos para os percentuais e teores de N.

Analisando a partição percentual do N nas plantas, observou-se que não houve interferência para a PNR, PNC e PNP (Tabela 16). As duas maiores doses de N foram superiores para as PNF e PNG, seguidos da dose de 40 kg de N ha⁻¹. Diante destes resultados, verifica-se que grande porção do N absorvido é translocado para os grãos, e a outra porção, em menor quantidade, fica retida nas folhas, colmo e raiz. Portanto, com a colheita dos grãos do sorgo granífero grande parte do N é retirado do campo, no mínimo de 60%, devendo ser repostado novamente. Este fato é mais pronunciado ainda com o sorgo forrageiro, que o material colhido é constituído de toda a parte aérea da planta.

Os percentuais e teores de N de plantas de sorgo granífero inoculadas com estirpes bacterianas e adubadas com doses crescentes de N, estão descritos na Tabela 17. Não houve influência da inoculação e da adubação no NR e no TNR.

As estirpes bacterianas N5, N11, J39, Aam82, 1A e ZAE94 e as adubações com 80 e 120 kg de N ha⁻¹ proporcionaram incrementos de superiores no NR e TNR das plantas de sorgo granífero em comparação aos outros tratamentos. Os incrementos das bactérias para NR variaram de 26,1 a 45,2%, à medida que, para o TNR variaram de 21,9 a 43,1% em relação à testemunha.

A bactéria N5 e a dose de 120 kg de N ha⁻¹ foram superiores para o NF e o TNF. Na seqüência, obtiveram melhores resultados a dose de 80 kg de N ha⁻¹ e os diazotrofos N11 e JV49 para o NF, enquanto, que para o TNF, a mesma dose

de N mais as estirpes N11, JV49, Sp245 e ZAE94. Os incrementos para as estirpes supracitadas foram de 14,3 a 30% para o NF e de 15,1 a 32,2% para o TNF. Para a panícula sem grãos, o NP foi maior para a dose de 80 kg de N ha⁻¹ e as estirpes N5, N11, J36, J39 e JV49, ao passo que, para o TNP, os maiores efeitos foram reportados às duas maiores doses de N e a estirpe J39.

Analisando o efeito sobre os grãos, os maiores NG foram para a estirpe J39 e a maior adubação nitrogenada. Em seguida, o melhor incremento foi para a dose de 80 kg de N ha⁻¹. Já para o TNG, os maiores aumentos foram para as bactérias N5, N11, N17 e J39 e as duas maiores doses de N. Assim, estas bactérias possibilitaram acréscimos de 42,1 a 54,9% no NG e 34,5 a 47,7% para o TNG. Considerando, o NT, os diazotrófos J39, N11 e N5 e as duas maiores doses de N apresentaram resultados superiores aos demais tratamentos. Ainda, as doses de 80 e 120 kg de N ha⁻¹ similarmente com a estirpe J39 obtiveram os maiores TNPI.

As inoculações e as adubações nitrogenadas não influenciaram na partição percentual do N nos tecidos vegetais das plantas de sorgo granífero cultivadas em casa de vegetação no município de Colorado do Oeste – RO (Tabela 18).

Durante a fase de reprodutiva no estágio de enchimento de grãos, o N armazenado nas folhas e no colmo é direcionado para este tecido vegetal. Observa-se que mais de 50% do N total da planta foi translocado para esta região.

Os resultados para o ensaio realizado em Colorado do Oeste-RO foram mais significativos para a influência das bactérias diazotróficas nos percentuais e teores de N nas plantas de sorgo granífero. As estirpes bacterianas N5, N11 e J39 sobressaíram sobre as demais, promovendo aumento no percentual de N nas folhas e, principalmente, nos teores de N nos grãos das plantas de sorgo.

Tabela 17 – Percentual e teores de nitrogênio em plantas de sorgo granífero BRS 332 sob o efeito de estirpes bacterianas e doses crescentes de nitrogênio, cultivadas em casa de vegetação em Colorado do Oeste – RO.

Estirpe/ Tratamento	NR (%)	NC (%)	NF (%)	NP (%)	NG (%)	NT (%)	TNR (mg)	TNC (mg)	TNF (mg)	TNP (mg)	TNG (mg)	TNPI (mg)
N5	0,47	0,25a	0,60a	0,46a	1,61b	0,82a	53,5	56,5a	104,8a	8,9c	436,9a	660,7a
N11	0,42	0,26a	0,49b	0,51a	1,59b	0,74a	54,9	64,5a	86,2b	11,0c	397,6a	614,3a
N17	0,44	0,21b	0,38c	0,35b	1,29c	0,64b	48,8	50,9b	66,7c	6,9c	348,6a	522,0b
J36	0,38	0,18b	0,37c	0,43a	1,08c	0,55b	42,4	43,5b	67,0c	8,8c	279,8b	441,6b
J39	0,52	0,24a	0,42c	0,63a	2,04a	0,85a	67,8	65,5a	72,2c	14,0b	483,2a	702,8 ^a
JV49	0,38	0,19b	0,51b	0,51a	1,20c	0,60b	45,8	52,2b	94,1b	10,4c	310,4b	512,9b
JV50	0,41	0,16b	0,41c	0,35b	0,96c	0,52b	45,2	36,6b	72,5c	7,4c	257,3b	418,9b
L60	0,43	0,18b	0,40c	0,30b	1,25c	0,53b	47,9	40,6b	67,2c	6,1c	206,7b	368,5b
L66	0,44	0,18b	0,36c	0,32b	1,03c	0,50b	45,5	42,2b	63,6c	6,1c	220,9b	378,5b
L72	0,56	0,17b	0,36c	0,32b	0,95c	0,52b	51,3	37,3b	59,3c	7,1c	222,4b	377,4b
Aam82	0,48	0,25a	0,39c	0,30b	0,89c	0,51b	52,7	59,4a	69,8c	6,8c	220,1b	408,9b
J9	0,38	0,17b	0,33c	0,34b	0,98c	0,48b	40,8	42,7b	58,3c	6,6c	232,0b	380,5b
1A	0,46	0,23a	0,43c	0,35b	1,17c	0,60b	52,2	58,5a	77,5c	7,1c	292,2b	487,5b
Inoculante	0,45	0,22b	0,34c	0,29b	0,94c	0,50b	46,9	51,4b	60,3c	5,1c	228,0b	391,9b
Sp245	0,45	0,19b	0,46c	0,31b	1,03c	0,55b	52,6	47,9b	84,3b	6,4c	258,9b	450,1b
ZAE94	0,45	0,31a	0,47c	0,30b	1,24c	0,64b	48,5	77,5a	83,7b	6,8c	284,2b	500,8b
0 kg N ha⁻¹	0,47	0,18b	0,39c	0,35b	0,78c	0,45b	57,0	44,3b	70,0c	5,4c	174,1b	350,8b
20 kg N ha⁻¹	0,47	0,17b	0,42c	0,32b	0,92c	0,50b	54,6	44,1b	71,1c	5,5c	228,4b	403,8b
40 kg N ha⁻¹	0,40	0,16b	0,35c	0,32b	1,02c	0,52b	48,8	39,2b	65,9c	7,8c	286,8b	448,5b
80 kg N ha⁻¹	0,45	0,29a	0,52b	0,46a	1,49b	0,75a	57,1	68,9a	98,2b	18,8a	409,8a	652,7 ^a
120 kg N ha⁻¹	0,51	0,27a	0,65a	0,41b	1,78a	0,84a	64,9	67,5a	121,3a	19,8a	456,8a	730,5 ^a
CV(%)	19,09	27,79	16,86	26,00	18,26	14,88	22,22	27,08	17,60	25,40	23,12	16,97

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. NR=Percentual de nitrogênio nas raízes; NC=Percentual de nitrogênio no colmo; NF=Percentual de nitrogênio nas folhas; NP=Percentual de nitrogênio na panícula sem grãos; NG=Percentual de nitrogênio nos grãos; NT=Percentual de nitrogênio na planta inteira; TNR=Teor de nitrogênio na raiz; TNC=Teor de nitrogênio no colmo; TNF=Teor de nitrogênio nas folhas; TNP=Teor de nitrogênio na panícula sem grãos; TNG=Teor de nitrogênio nos grãos; TNPI=Teor de nitrogênio na planta inteira.

Tabela 18 – Partição percentual dos teores de nitrogênio na raiz (PNR), colmo (PNC), folha (PNF), panícula (PNP) e grãos (PNG) em plantas de sorgo granífero BRS 332 cultivadas em casa de vegetação no município de Colorado do Oeste – RO.

Estirpe/ Tratamento	PNR (%)	PNC (%)	PNF (%)	PNP (%)	PNG (%)
N5	8,19	8,36	15,70	1,32	66,42
N11	9,02	10,33	14,01	1,81	64,81
N17	9,90	10,05	13,00	1,37	65,66
J36	9,61	9,88	15,25	1,98	63,27
J39	9,61	9,26	10,35	2,02	68,75
JV49	9,02	10,27	19,09	1,93	59,67
JV50	10,95	8,90	17,64	1,81	60,69
L60	13,02	11,00	18,25	1,65	56,06
L66	12,04	11,16	16,87	1,62	58,31
L72	13,62	9,84	15,70	1,88	58,94
Aam82	12,87	14,45	17,06	1,67	53,93
J9	10,84	11,08	15,23	1,71	61,13
1^a	11,26	12,24	16,37	1,47	58,64
Inoculante	11,84	13,16	15,52	1,33	58,14
Sp245	11,63	10,84	18,81	1,42	57,28
ZAE94	9,92	15,69	16,72	1,36	56,29
0 kg N ha⁻¹	16,12	12,36	19,85	1,53	50,13
20 kg N ha⁻¹	13,29	10,86	17,56	1,37	56,91
40 kg N ha⁻¹	10,85	8,73	14,69	1,77	63,94
80 kg N ha⁻¹	9,39	10,95	15,60	2,90	61,09
120 kg N ha⁻¹	8,90	9,24	16,67	2,73	62,45
CV(%)	21,51	24,67	16,58	18,53	9,62

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Outras estirpes bacterianas que apresentaram respostas intermediárias, mas que incrementaram os percentuais e teores de N nas plantas de sorgo foram a JV49, Sp245, N17, 1A e ZAE94. Se considerarmos uma densidade populacional de 150000 plantas ha⁻¹ para o sorgo granífero e as bactérias que proporcionaram maiores respostas, teríamos um incremento de 12,6 a 44,9 kg de N. O custo da adubação nitrogenada é elevado e a maioria dos pequenos

produtores, geralmente, não aduba a cultura do sorgo, principalmente com N. Neste sentido, a introdução de bactérias via inoculantes é uma tecnologia de fácil acesso para estes produtores e de baixo custo, podendo reduzir a poluição ambiental causada pela lixiviação desses fertilizantes, bem como permitir um ganho maior na produtividade da cultura do sorgo.

As alturas e diâmetros dos tratamentos das plantas de sorgo cultivadas em Seropédica-RJ são apresentadas na Figura 8 e 9.

No estágio fenológico V4 as plantas com as três maiores doses de N e as estirpes L60, L72, J9 e ZAE94 apresentaram as menores alturas. Já no estágio V6 as bactérias que proporcionaram maiores alturas foram N11, N17, J39, JV49, JV50, L60, L66, L72, Aam82, 1A e o inoculante. Considerando o estágio V8, a grande maioria das estirpes promoveram maiores alturas, exceto para as bactérias do inoculante, Sp245 e ZAE94, bem como o tratamento não adubado, a testemunha e as doses de 80 e 120 kg de N ha⁻¹. As três maiores doses de N, o tratamento sem adubação e os diazotrofos L72, J9 e ZAE94 obtiveram no estágio V10 as menores alturas. Ainda, no último estágio vegetativo VT a dose de 80 kg de N ha⁻¹ proporcionou a maior altura. Na sequência, as doses de 40 e 120 kg de N ha⁻¹ similarmente as bactérias 1A, Aam82, L72 e JV50 tiveram as alturas superiores aos demais tratamentos.

Analisando o diâmetro das plantas de sorgo, não houve diferenças significativas para os estádios iniciais V4 e V6. Entretanto, para o estágio V10 houve influência principalmente pelas duas maiores doses de N. As estirpes N17 e J39 similarmente à dose de 40 kg de N ha⁻¹, apresentaram resultados intermediários.

De forma geral, as bactérias tendem a influenciar mais no crescimento inicial das plantas e a adubação nitrogenada apresenta um efeito mais retardado, sendo observado no final do ciclo vegetativo, bem como no diâmetro do colmo, onde se observa o espessamento mais rápido nos estádios vegetativos finais.

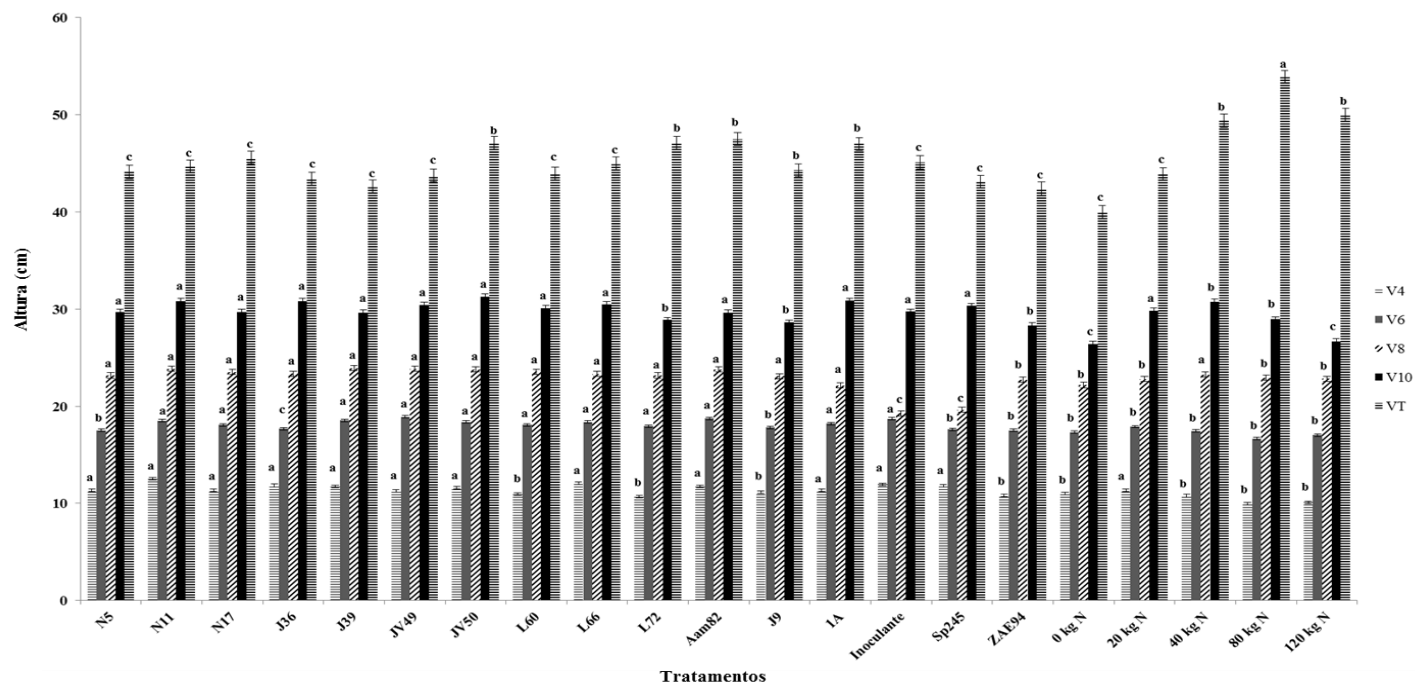


Figura 8 – Altura média de plantas de sorgo granífero BRS 332 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterianas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.

Letras minúsculas diferentes entre as colunas dentro do mesmo estágio fenológico, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. As barras acima das colunas representam o erro padrão. CV: V4=7,65%; V6=4,87%; V8=3,75%; V10=5,79%; VT=8,05%. V4=Planta com quatro folhas totalmente desenvolvidas; V6=Planta com seis folhas totalmente desenvolvidas; V8=Planta com oito folhas totalmente desenvolvidas; V10=Planta com dez folhas desenvolvidas; VT=Último estágio vegetativo com emissão da panícula.

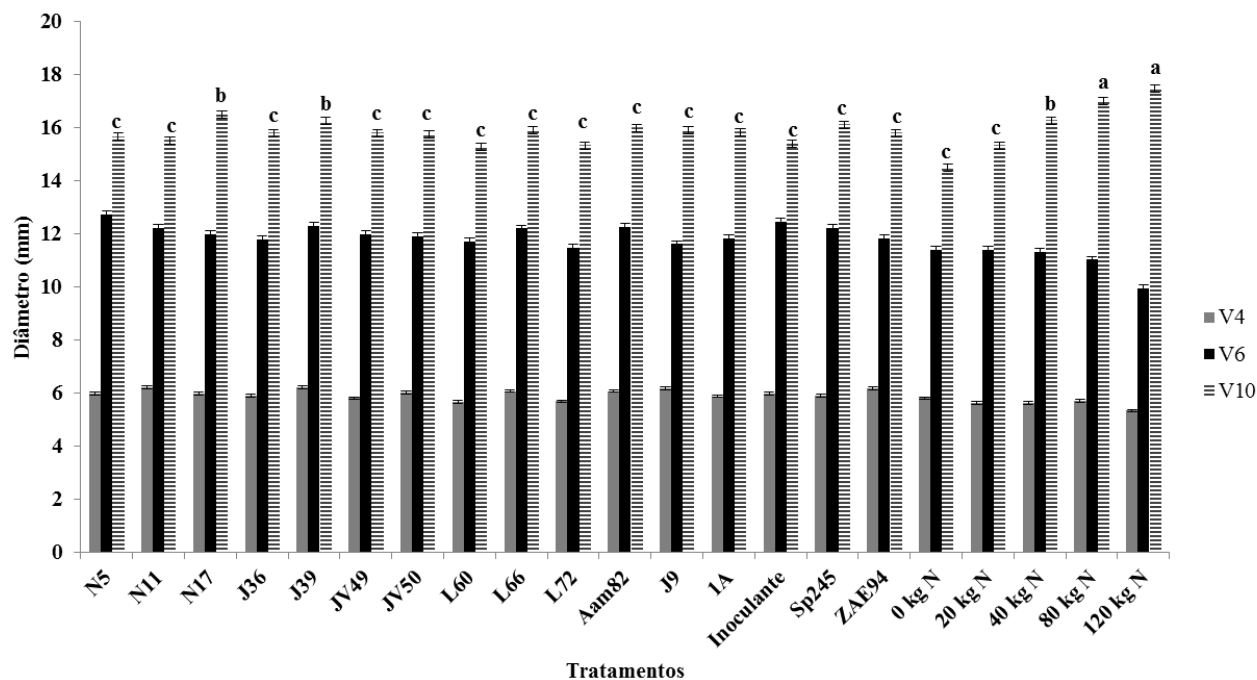


Figura 9 – Diâmetro médio de plantas de sorgo granífero BRS 332 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterinas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.

Letras minúsculas diferentes entre as colunas dentro do mesmo estágio fenológico, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. As barras acima das colunas representam o erro padrão. CV: V4=8,89%; V6=7,62%; V10=4,59%. V4=Planta com quatro folhas totalmente desenvolvidas; V6= Planta com seis folhas totalmente desenvolvidas; V10=Planta com dez folhas desenvolvidas.

As respostas das alturas e dos diâmetros de plantas de sorgo granífero cultivadas em casa de vegetação no município de Colorado do Oeste-RO, encontram-se nas Figuras 10 e 11.

As estirpes bacterianas N11, N17, JV49, L60, L66, L72, Aam82, J9, 1A, inoculante, Sp245 e ZAE 94 apresentaram as maiores alturas de plantas no estádio V2. Para o estádio V4, as bactérias N5, N11, N17, L60, L66, Aam82, J9, 1A, inoculante, Sp245 e ZAE94 obtiveram os maiores aumentos em alturas de plantas. Contudo, nos estádios vegetativos finais V6, V8 e V10 não houve diferença estatística.

Analisando o diâmetro de plantas, não houve influência da inoculação e da adubação no estádio V2 e V8. As estirpes bacterianas foram superiores para o diâmetro de colmo no estádio V4, exceto para o diazotrofos N11. Enfim, no estádio V6, as três maiores doses de N e a maioria das estirpes, exceto para a N5 e N11, foram superiores para diâmetro de colmo. Novamente, observa-se que as bactérias influenciam, principalmente, no crescimento inicial das plantas, em contrapartida, o efeito da adubação é mais lento, atingindo o ápice no crescimento com a aproximação do final do estádio vegetativo.

Nos genótipos de sorgo granífero devido ao porte mais baixo em comparação aos sorgos forrageiro, sacarino e biomassa, o mais relevante é o incremento em espessura do diâmetro do colmo em relação à altura de planta.

Os estudos de regressão avaliando as doses crescentes de N em função da MSR, MSC, MSF, MSG e MSPA de sorgos granífero cultivado em Seropédica-RJ e Colorado do Oeste-RO, estão apresentados na Figura 12. No cultivo em Seropédica-RJ, o efeito foi linear positivo com o aumento da dose de N para todas as massas secas. Em Colorado do Oeste-RO, as relações foram diferentes para as massas secas avaliadas. A MSR apresentou efeito linear positivo com o incremento de adubação nitrogenada, ao passo que, a MSC teve uma relação cúbica, em função das doses crescentes de adubação nitrogenada.

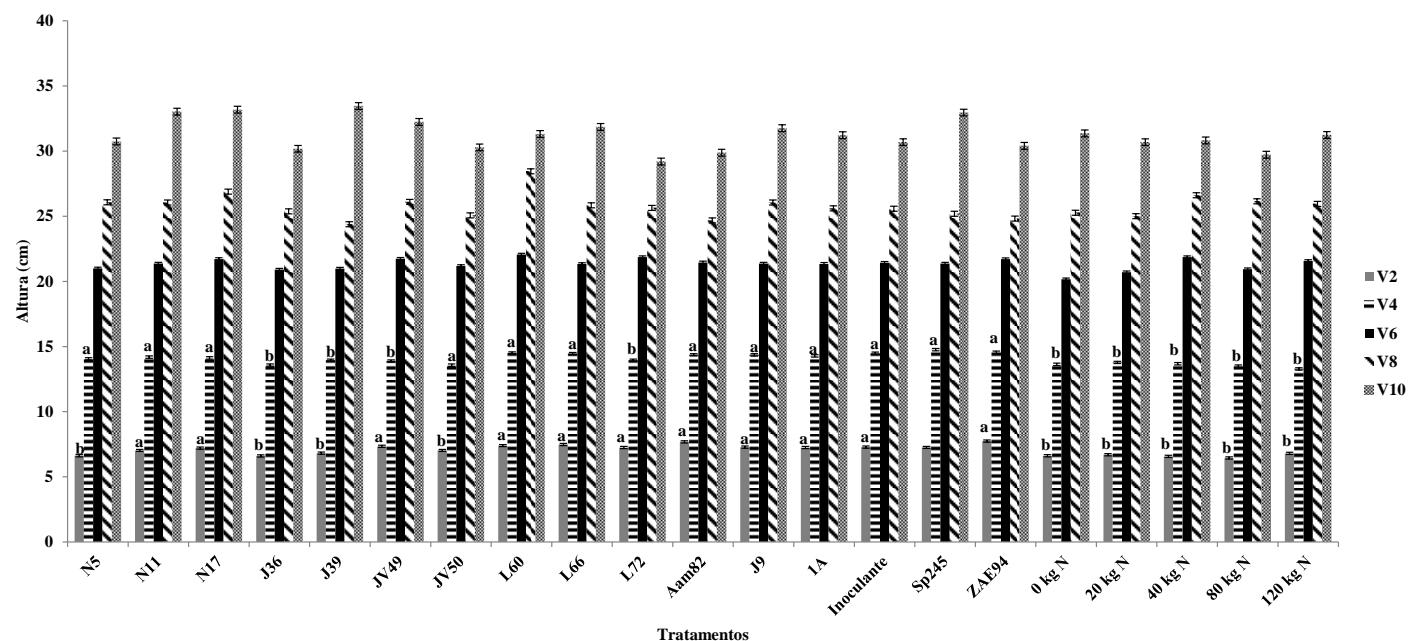


Figura 10 – Altura média de plantas de sorgo granífero BRS 332 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterianas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Colorado do Oeste – RO.

Letras minúsculas diferentes entre as colunas dentro do mesmo estágio fenológico, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. As barras acima das colunas representam o erro padrão. CV: V2=6,02%; V4=4,24%; V6=4,02 %; V8=6,53%; V10=7,06%. V2=Planta com duas folhas totalmente desenvolvidas; V4=Planta com quatro folhas totalmente desenvolvidas; V6=Planta com seis folhas totalmente desenvolvidas; V8=Planta com oito folhas totalmente desenvolvidas; V10=Planta com dez folhas desenvolvidas.

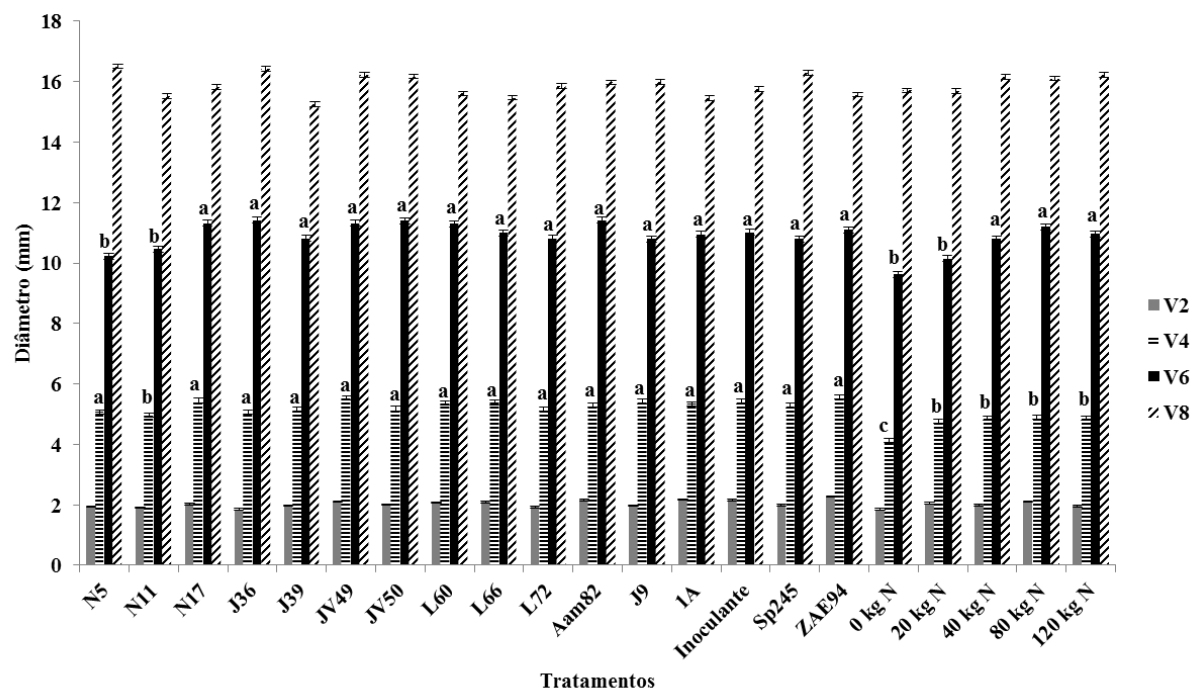


Figura 11 – Diâmetro médio de plantas de sorgo granífero BRS 332 em diferentes estádios fenológicos, inoculadas com estirpes bacterinas e adubadas com doses crescentes de nitrogênio em casa de vegetação no município de Colorado do Oeste – RO.

Letras minúsculas diferentes entre as colunas dentro do mesmo estágio fenológico, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. As barras acima das colunas representam o erro padrão. CV: V2=9,90%; V4=8,56%; V6=4,94%; V8=5,21%. V2=Planta com duas folhas totalmente desenvolvidas; V4=Planta com quatro folhas totalmente desenvolvidas; V6=Planta com seis folhas totalmente desenvolvidas; V8=Planta com oito folhas desenvolvidas.

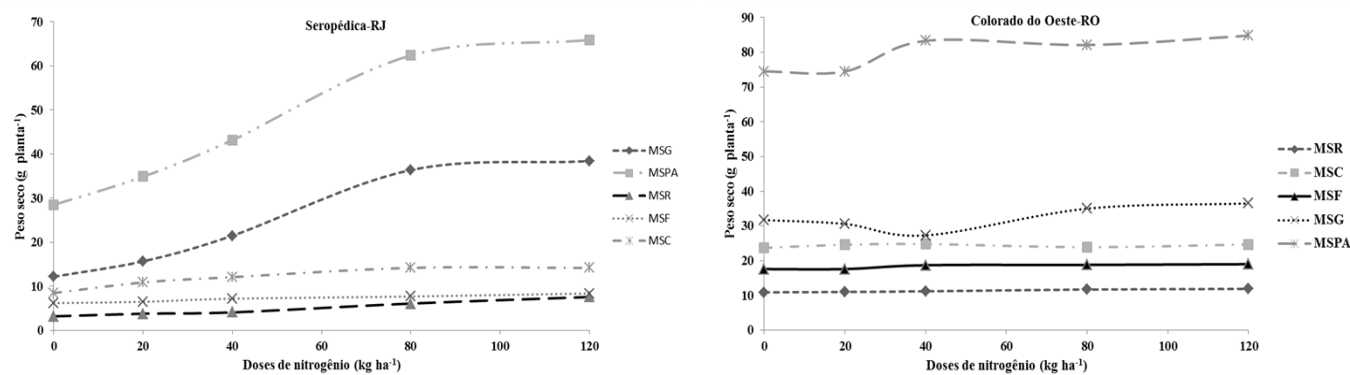


Figura 12 – Massas secas médias de raiz (MSR), colmo (MSC), folha (MSF), grãos (MSG) e parte aérea (MSPA) por planta de sorgo granífero BRS 332 cultivados em casa de vegetação sob o efeito de doses crescentes de nitrogênio nos municípios de Seropédica-RJ e Colorado do Oeste-RO.

Equações de regressão Seropédica-RJ: $\hat{y}=2,9973+0,38x$, $R^2=97,89\%$ (MSR); $\hat{y}=9,5783+0,0461x$, $R^2=85,99\%$ (MSC); $\hat{y}=6,2805+0,018359x$, $R^2=99,06\%$ (MSF); $\hat{y}=12,3413+0,2405x$, $R^2=94,07\%$ (MSG); $\hat{y}=29,5412+0,3352x$, $R^2=95,04\%$ (MSPA). Equações de regressão Colorado do Oeste-RO: $\hat{y}=10,9133+0,0085x$, $R^2=98,06\%$ (MSR); $\hat{y}=23,64+0,08x-0,0016x^2+0,000009x^3$, $R^2=99,70\%$ (MSC); $\hat{y}=17,40+0,0346x-0,00018x^2$, $R^2=85,18\%$ (MSF); $\hat{y}=31,1153+0,1075x-0,0005x^2$, $R^2=54,93\%$ (MSG); $\hat{y}=73,8952+0,1872-0,0008x^2$, $R^2=78,44\%$ (MSPA).

As MSF, MSG e MSPA apresentaram relação quadrática para o incremento de N.

No cultivo em Seropédica-RJ, observou-se claramente que há um incremento maior até a dose de 80 kg de N ha⁻¹, principalmente para a MSC, MSG e MSPA e que a adição de mais 40 kg de N ha⁻¹, totalizando 120 kg, há uma tendência de estabilizar as produções de massas para o colmo, grãos e parte aérea.

Os estudos de regressão, em Colorado do Oeste-RO, não há uma elucidação muito evidente. Entretanto, observou-se para MSF, um incremento até a dose de 80 kg de N há-1 e reduzindo para a dose de 120 kg. As produções de MSC, MSG e MSPA, foram incrementadas até a dose de 40 kg de N ha-1, em seguida, na dose de 80 kg as massas são reduzidas, e, na maior dose, retorna o incremento. Nesse sentido, constata-se algum tipo de reação do N no solo na dose de 80 kg, que interferiu na redução das MSC, MSG e MSPA, possivelmente, por uma maior lixiviação e até mesmo volatilização do fertilizante aplicado.

Os efeitos da inoculação sobre as plantas de sorgo granífero BRS 332 podem ser visualizados na Figura 13, sendo exemplificados pelas estirpes N5, N11, J39 e JV49.

As plantas encontravam-se no estado vegetativo próximo da emissão da folha bandeira para emissão da panícula (VT). Constata-se o maior crescimento vegetal, como as folhas mais desenvolvidas, porte maior e a coloração verde mais intensa, possivelmente, em função do teor de clorofila ser mais elevado, disponibilizado pela FBN e pela maior eficiência na absorção de N. Entretanto, este maior desenvolvimento vegetal visual pode não representar, na prática, em incremento na massa vegetal, em virtude das plantas apresentarem teor de umidade mais elevado, ou até mesmo, em diferença estatística.

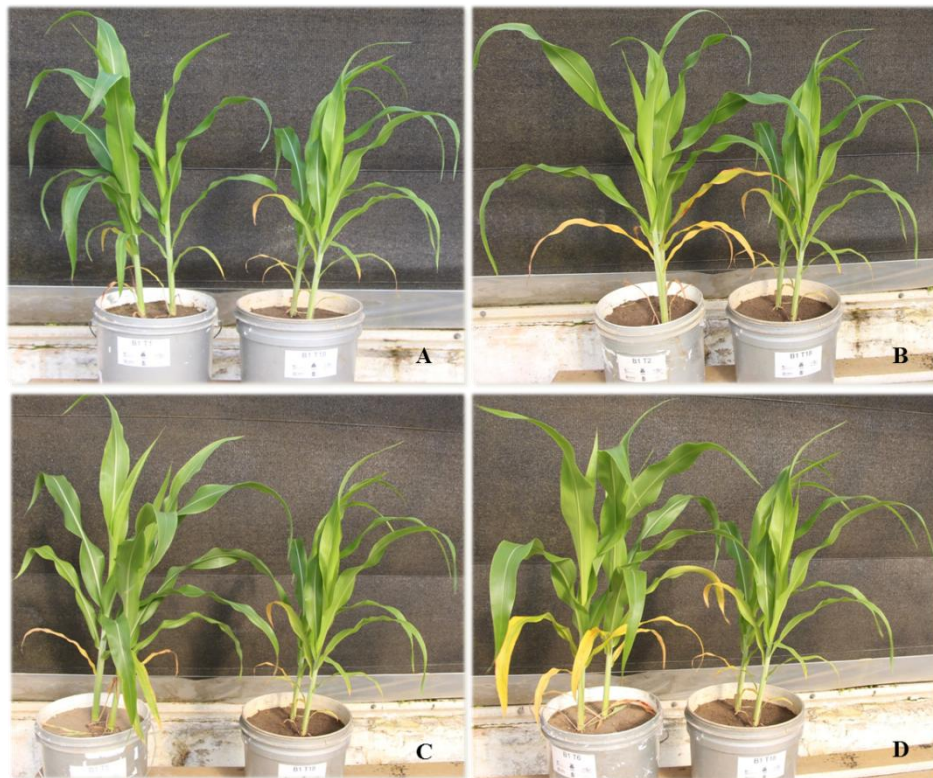


Figura 13 – Efeito da inoculação de sorgo granífero BRS 332 com as estirpes de *Bacillus safensis* N5 (A), *Azospirillum brasilense* N11 (B), *Azospirillum brasilense* J39 (C) e *Azospirillum melinis* JV49 (D) em relação à testemunha (plantas à direita) em casa de vegetação no município de Seropédica – RJ.

4 CONCLUSÕES

As estirpes bacterianas N5, N11, N17, J36, J39, JV49, JV50, L60, L66, L72, Aam82, J9 e 1A apresentaram as maiores massas radiculares e de crescimento radicular em plantas de sorgo forrageiro BRS 655, em condições gnotobióticas.

As bactérias diazotróficas J36, N11, L60, JV49 e Aam82 proporcionaram maior incremento de massas secas de parte aérea e raízes nas plantas de sorgo forrageiro BRS 655 em casa de vegetação.

No incremento de teores de nitrogênio nas plantas de sorgo forrageiro BRS 655, destacaram as estirpes bacterianas N5, J9 e L66.

No crescimento inicial do sorgo granífero BRS 332, as bactérias diazotróficas N11 e N17 promoveram maior acúmulo de massa na parte aérea das plantas.

A estirpe N5 apresentou as maiores produções de massas secas de raízes e parte aérea para o sorgo granífero BRS 332.

O diazotrofo L72 aumentou as massas secas de parte aérea e raízes no sorgo forrageiro BRS 655 cultivado nas condições edafoclimáticas de Seropédica-RJ.

As bactérias diazotróficas J9, N11 e JV49 promoveram incrementos nas massas de parte aérea e raízes de plantas de sorgo forrageiro cultivado em Colorado do Oeste-RO.

As estirpes bacterianas N5, N11 e J39 proporcionaram maiores incrementos nos teores de nitrogênio no sorgo granífero BRS 332.

5 CONCLUSÕES GERAIS

As plantas de sorgo forrageiro e sacarino associam com bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal, pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Stenotrophomonas* e *Bacillus*.

As avaliações genéticas de perfis de DNA pela análise de BOX-PCR permitem discriminar e agrupar com precisão estirpes bacterianas diazotróficas em nível de gênero e espécie, confirmada pela análise de sequências do gene 16S rRNA. Enquanto, o gene *housekeeping recA* pode ser utilizado como marcador molecular para diazotrofos isolados de plantas de sorgo.

Em relação à comunidade de diazotrofos, as maiores população e riqueza são encontradas em plantas de sorgo cultivadas em solo de bioma Mata Atlântica. Contudo, o solo de bioma Floresta Amazônica proporciona maior diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio.

Os 73 isolados bacterianos de plantas de sorgo forrageiro e sacarino sintetizaram *in vitro* composto indólicos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os cultivos agrícolas atualmente se baseiam, principalmente, no uso de insumos como fertilizantes químicos e agrotóxicos, elevando o custo de produção e tornando, cada vez mais, essa atividade insustentável ambientalmente. Dentro das premissas agronômicas, a produção agrícola deve almejar técnicas e manejo que visem à sustentabilidade dos agroecossistemas.

A biotecnologia por meio do uso de biofertilizantes como inoculantes contendo bactérias diazotróficas, em alguns casos tem permitido aos agricultores a substituição total de fertilizantes nitrogenados como no caso da cultura da soja, possibilitando melhorar as condições ambientais dos solos agrícolas e reduzir os impactos ambientais negativos do uso desses insumos.

Estudos com bactérias diazotróficas promotoras do crescimento vegetal em gramíneas estão sendo conduzidos tanto para substituir parcialmente o uso de fertilizantes químicos, principalmente os nitrogenados, quanto incrementar a produtividade, tendo como consequência direta a diminuição do custo de produção e indiretamente a abertura de novas áreas.

Os resultados encontrados neste trabalho demonstra a associação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Stenotrophomonas* e *Bacillus* com plantas de sorgo sacarino e forrageiro em solos de diferentes biomas brasileiros, que promoveram incrementos nos teores de nitrogênio e nas massas radiculares e parte aérea das plantas.

Considerando os resultados descritos nesta tese, podemos sugerir que os estudos devam continuar para confirmar a promoção de crescimento vegetal e o suprimento de nitrogênio por essas bactérias em plantas de sorgo, para futuramente possibilitar o uso dessa tecnologia comercialmente.

7 REFERÊNCIAS

ADRIANO-ANAYA, M.L.; SALVADOR-FIGUEROA, M.; Ocampo, J.A. et al. Hydrolytic enzyme activities in maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) roots inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Glomus intraradices*. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, n.2, p.879-886, 2006.

ALBINO, U.; SARIDAKIS, D.P.; FERREIRA, M.C.; HUNGRIA, M.; VINUESA, P.; ANDRADE, G. High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. **Plant and Soil**, v.287, n.2, p.199-207, 2006.

ALEXANDER, D.B.; ZUBERER, D.A. Impact of soil environmental factors on rates of N₂-fixation associated with roots of intact maize and sorghum plants. **Plant and Soil**, v.110, n.2, p.303-315, 1988.

ALMEIDA FILHO, J.E.; TARDIN, F.D.; SOUZA, S.A. et al. Desempenho agrônomico e estabilidade fenotípica de híbridos de sorgo granífero. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.9, n.1, p.51-64, 2010.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A. et al. BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

ANDRADE NETO, R.C.; MIRANDA, N.O; DUDA, G.P. et al. Crescimento e produtividade do sorgo forrageiro BRS 610 sob adubação verde. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.2, p.124-130, 2010.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; CHABOT, R. et al. Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, v.204, n.1, p.57-67, 1998.

ARAÚJO, A.E.S.; ROSSETTO, C.A.V; BALDANI, V.L.D. et al. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.4, p.932-939, 2010.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology**: Fundamentals and applications. 4. ed. Menlo Park, Benjamin/Cummings, 1998. 694p.

BALDANI, J.I. **Ocorrência e Caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz**. 1984. 110 f. Mestrado em Agronomia (Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1984.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. **sp. nov.** a root- associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.36, n.1, p.86-93, 1986.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, n.3, p.549-579, 2005.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Genus III. *Herbaspirillum*. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. (Eds.). GARRITY, G.M. (Ed. Chief). **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**: The Proteobacteria, 2nd ed., v.2. p.629-636, 2005.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D. et al. Recent advances in NFb with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.1-2, p.911-922, 1997.

BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; VIDEIRA, S.S.; BODDEY, H.L.; BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants

using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v.384, n.1, p.413-431, 2014.

BALDANI, J.I.; ROUWS, L.; CRUZ, L.M. et al. The Family Oxalobacteraceae. In: ROSENBERG, E. (Ed. Chief), DeLONG, E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria**, 4nd ed., p.919-974, 2014.

BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I et al. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and ins roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v.90, n.1, p.35-46, 1986.

BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 433–439, 1980.

BALDANI, V.L.D. **Efeito da Inoculação de Herbaspirillum spp., no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 1996. 238 f. Tese Doutorado em Agronomia (Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, 1996.

BARKA, E.A.; BELARBI, A.; HACHET, C. et al. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultures with plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.186, p.91-95, 2000.

BARTCHECHEN, A.; FIORI, C.C.L.; WATANABE, S.H. et al. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L.). **Campo Digit@l**, v.5, n.1, p.56-59, 2010.

BASHAN, Y. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton and wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, n.2, p.168-174, 1998.

BASHAN, Y.; de-BASHAN, L.E. How the plant growth-promoting bacterium azospirillum promotes plant growth—A critical assessment. **Advances in Agronomy**, v.108, p.77-136, 2010.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L.E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of Azospirillum inoculation technology: Azospirillum as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, n.9, p.591-605, 1990.

BATISTA, K.D. **Características morfoanatômicas de raízes de milho e de sorgo cultivados sob diferentes concentrações de fósforo**. 2012. 87 f. Tese de Doutorado em Ciência do Solo (Área de Concentração: Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras – MG, 2012.

BERGAMASCHI, C.; ROESCH, L.F.W.; QUADROS, P.D. et al. Ocorrência de bactérias diazotróficas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.727-733, 2007.

BRACCINI, A.L.; DAN, L.G.M.; PICCINI, G.G. et al. SEED INOCULATION WITH *Azospirillum brasilense*, ASSOCIATED WITH THE USE OF BIOREGULATORS IN MAIZE. **Revista Caatinga**, v.25, n.2, p.58-64, 2012.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2180-2187, 1992.

CANTARELLA, H.; RAIJ, B. van; CAMARGO, C.E.O. Cereais. In: RAIJ, B. van et al. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2 ed. Campinas. IAC, 1996. p.43-71. (IAC, Boletim Técnico, 100).

CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, S.S. A Rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.). **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.41-58.

CARDOSO, E.J.B.N.; NOGUEIRA, M.A. A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. (Eds.). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas – SP: Instituto Agrônômico, 2007. p.79-96.

CARVALHO, T.L.G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R.M. et al. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v.65, n.19, p.5631-5642, 2014.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (pgpr) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.33, n.2, p.440-459, 2014.

CHANWAY, C.P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J. et al. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v.133, p.81-88, 2000.

CHAVES, V.A.; SANTOS, S.G.; SCHULTZ, N. et al. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, n.6, p.1595-1602, 2015.

COELHO, M.R.R.; CARNEIRO, N.P.; MARRIEL, I.E. et al. Molecular detection of *nifH* gene-containing *Paenibacillus* in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown in Cerrado soil. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, n.5, p.611-617, 2009.

COELHO, M.R.R.; VOS, M.; CARNEIRO, N.P. Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. **FEMS Microbiology Letters**, v.279, n.1, p.15-22, 2008.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, nono levantamento**. Brasília, 2013. 30p.

CORRÊA, J.C.; COSTA, A.M.; CRUSCIOL, C.A. et al. Doses de boro e crescimento radicular e da parte aérea de cultivares de arroz de terras altas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, n.6, p.1077-1082, 2006.

COSTA, F.E.C.; MELO, I.S. Isolamento de bactérias associadas à palma e prospecção dopotencial de solubilizar fosfato e fixar nitrogênio. **Agrotrópica**, v.17, p.23-26, 2005.

CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G. et al. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONER, R. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, p.850-929, 2000.

DAFFONCHIO, D.; BORIN, S.; FROVA, G. PCR fingerprinting of whole genomes: the spacers between the 16s and 23s rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveal a different intraspecific genomic variability of

Bacillus cereus and *Bacillus licheniformis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.48, n.1, p.107-116, 1998.

DAVIES, K.G.; WHITBREAD, R.A. A comparison of methods for measuring the colonization of a root system by fluorescent pseudomonads?. **Plant and Soil**, v.116, n.2, p.239-246, 1989.

DESLIPPE, J.; EGGER, K. Molecular diversity of *nifH* genes from bacteria associated with high arctic dwarf shrubs. **Microbial Ecology**, v.51, n.4, p. 516–525, 2006.

DING, Y.; WANG, J.; LIU, Y. et al. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, n.5, p.1271-1281, 2005.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, n.4, p.284-297, 2002.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.107-149, 2003.

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

DÖBEREINER J.; DAY J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. **Proceedings of the First international Symposium on Nitrogen Fixation** (W. E. Newton and C. J. Nyman, Eds), p. 518-538, 1976. Washington State University Press.

DURÃES, F.O.M. Sorgo sacarino: desenvolvimento de tecnologia agrônômica. **Agroenergia em Revista**, ano II, n.3, p.7, 2011.

EISSENSTAT, D.M. Costs and benefits of constructing roots of small diameter. **Journal of Plant Nutrition**, v.15, n.6-7, p.763-782, 1992.

FAN, M.; RICHARDS, C.; BROWN, M. et al. Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots. **Functional Plant Biology**, v.30, n.5, p.493-506, 2003.

FERNANDES, F.E.P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V. et al. Ensilagem de sorgo forrageiro com adição de uréia em dois períodos de armazenamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.11, p.2111-2115, 2009.

FERREIRA, D.F. SISVAR: A Computer Statistical Analysis System. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M. et al. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant and Soil**, v.356, n.1, p.83-99, 2012.

FRANCO, A.A.N. **Marcha de absorção e acúmulo de nutrientes na cultura do sorgo**. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semi-Árido) – Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Campus Janaúba, 2011.

FREITAS, S.S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. (Eds.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**, Instituto Agrônômico, Campinas – SP, 2007, p. 1-20.

FURUSHITA, M.; SHIBA, T.; MAEDA, T. Similarity of tetracycline resistance genes applied isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5336-5342, 2003.

GOBETTI, S.T.C. **Produção de Sorgo Forrageiros sob Corte e Pastejo**. 2010. 47f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade do Centro-Oeste, Guarapava, Paraná, 2010.

GONTIJO, M.H.R.; BORGES, A.L.C.; GONÇALVES, L.C. et al. Potencial forrageiro de seis híbridos de sorgo com capim Sudão. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.7, n.1, p.33-43, 2008.

GOMES, M.L. **Bactérias diazotróficas endofíticas em cultivares de milho em áreas de Cerrado e Mata no estado de Roraima**. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Produção Vegetal), Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.

GU, Y.H.; MAZZOLA, M. Impact of carbon starvation on stress resistance, survival in soil habitats and biocontrol ability of *Pseudomonas putida* strain 2CB. **Soil Biology e Biochemistry**, v.33, p. 1155-1162, 2001.

GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Agronomia**, v.37, n.2, p.25-30, 2003.

HAMELIN, J.; FROMIM, N.; TARNAWSKI, S. et al. *nifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligonitrophilic perennial grass. **Environmental Microbiololy**, v.4, n.8, p. 477-481, 2002.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v.4, n.1, art.4, 9p., 2001.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. **Circular 347**. California Agricultural Experiment Station: Berkeley-CA, 1950. 32p.

HODGE, A. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. **New Phytologist**, v.162, n.1, p.9-24, 2004.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: EMBRAPA Soja, 2011. 36p. (Documentos 325).

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M.O.; MENNA, P. et al. Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR. **Comunicado Técnico 79**. EMBRAPA Soja: Londrina - PR, 2008. 12p.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen Fixation in Wheat Provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, n.10, p.1078-1085, 2004.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**: culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro, v.38, p. 1-97, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Pecuária Municipal**: culturas temporárias e permanentes 2015, v.42, p.1-57, 2016.

JACCARD, P. The distribution of flora in the alpine zone. **New Phytologist**, v.11, p.37–50, 1912.

JADOSKI, C.J.; RODRIGUES, J.D.; GUILHERME, D.O. et al. Physiological Assessments of Sweet Sorghum Inoculated with *Azospirillum brasilense* according to Nitrogen Fertilization and Plant Growth Regulators. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, v.2, n.6, p.45-54, 2016.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v.65, p.197-209, 2000.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. et al. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L Moench. **Journal of Experimental Botany**, v.48, n.308, p.785-797, 1997.

JJEMBA, P.K.; ALEXANDER, M. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, n.4, p.623-632, 1999.

KAPULNIK, J.; KIGEL, Y.; OKON, Y. et al. Effect of *Azospirillum* inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. **Plant and Soil**, v.61, n.1-2, p.65-70, 1981.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S. et al. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.32, p.210-220, 2006.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v.5, p.408-418, 1995.

KUMAR, A.A.; REDDY, V.S.; SHARMA, H.C. et al. Recent Advances in Sorghum Genetic Enhancement Research at ICRISAT. **American Journal of Plant Sciences**, v.2, n.4, p.589-600, 2011.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, n.7, p.1870-1874, 2016.

KUMARI, M.L.; KAVIMANDAN, S.K.; RAO, N.S.S. Occurrence of nitrogen fixing *Spirillum* in roots of rice, sorghum, maize & other plants. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.14, n.5, p.638-639, 1976.

LIMA, A.C.; SANTOS, D.T.; GARCIA, J.C. Viabilidade econômica e arranjos produtivos. **Agroenergia em Revista**, ano II, n.3, p.43-45, 2011.

LIMA, J.A. Princípios básicos para produção de silagem de sorgo. **PUBVET**, v.2, n.36, 2008.

LIN, S.-Y.; SHEN, F.-T.; YOUNG, L.-S. et al. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, n.5, p.1185-1190, 2012.

LIN, S.-Y.; HAMEED, A.; SHEN, F.T. et al. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.105, n.6, p.1149-1162, 2014.

LIN, W.; OKON, Y.; HARDY, R.W.F. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v.45, n.6, p.1775-1779, 1983.

LLORET, P.D.; PULGARÍN, A. Effect of naphthaleneacetic acid on the formation of lateral roots in the adventitious root of *Allium cepa*: number and arrangement of laterals along the parent root. **Canadian Journal of Botany**, v.70, n.9, p.1891-1896, 1992.

LUNA, M.F.; GALAR, M.L.; APREA, M.L. et al. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Biotechnology Letters**, v.32, n.8, p.1071-1076, 2010.

MACHADO, F.S.; RODRÍGUEZ, J.A.S.; RIBAS, M.N. et al. Qualidade da silagem de híbridos de sorgo em diferentes estádios de maturação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.3, p.711-720, 2012.

MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M. et al. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.55, p.417-430, 1983.

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M. **Ecofisiologia da produção de sorgo**. EMBRAPA – CNPMS, 2004. 4p. (Comunicado Técnico 87).

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; RODRIGUES, J.A.S. **Fisiologia da planta de sorgo**. EMBRAPA – CNPMS, 2003. 4p. (Comunicado Técnico 86).

MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal Soil Biology**, v. 45, n.1, p.73–80, 2009.

MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.394, p.27-34, 2004.

MAREQUE, C.; TAULÉ, C.; BERACOCHEA, M. et al. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial

endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Annals of Microbiology**, v.65, n.2, p.1057-1067, 2014.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P. et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v.1, p.89-111, 2004.

MARSCHNER, P.; YANG, C.-H.; LIEBEREI, R. et al. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, n.11, p.1437-1445, 2001.

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA M. et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.3479–3483, 1992.

MARTIN, P.; GLATZE, A.; KOLB, W. et al. N,-fixing bacteria in the rhizosphere: Quantification and hormonal effects on root development. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.152, n.2, p.237-245, 1989.

MARUSINA, A.I.; BOULYGINA, E.S.; KUZNETOU, B.B. et al. A System of oligonucleotide primers for the amplification of *nifH* genes of different taxonomic groups of Prokaryotes. **Microbiology**, v.70, n.1, p.73-78, 2001.

MAY, A.; CAMPANHA, M.M.; SILVA, A.F. et al. Variedades de sorgo sacarino em diferentes espaçamentos e população de plantas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.11, n.3, p.278-290, 2012.

MEENAKSHISUNDARAM, M. e SANTHAGURU, M. Studies on Association of Arbuscular Mycorrhizal Fungi with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Its Effect on Improvement of *Sorghum bicolor* (L.). **Asian Journal of Experimental Biological Science**, v.1, n.4, p.855-863, 2010.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, n.12, p.2805-2809, 2007.

MENDES, M.C.; ROSÁRIO, J.G.; FARIA, M.V. et al. Avaliação da eficiência agronômica de *Azospirillum brasilense* na cultura do trigo e os efeitos na qualidade de farinha. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v.4, n.3, p.95-110, 2011.

MENNA, P.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, n.12, p.2934-2950, 2009.

MEYER, S.E.; CNOCKAERT, M.; ARDLEY, J.K. et al. *Burkholderia dilworthii* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.1090-1095, 2014.

MOREIRA, F.M.S. Parte III. Diazotróficos Associativos: Métodos de isolamento e identificação de microrganismos associativos fixadores de N₂. In: Hungria, M.; Araujo, R.S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola**, EMBRAPA, p.337-353, 1994.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

NEUMANN, M.; RESTLE, J.; ALVES FILHO, D.C. et al. Avaliação de diferentes híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor*, L. Moench) quanto aos componentes da planta e silagens produzidas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.302-312, 2002.

PACOVSKY, R.S. Diazotroph establishment and maintenance in the *Sorghum-Glomus-Azospirillum* association. **Canadian Journal Microbiology**, v.35, p.977-981, 1989.

PACOVSKY, R.S. Influence of inoculation with *Azospirillum brasiliense* and *Glomus fasciculatum* on sorghum nutrition. **Plant and Soil**, v.110, n.2, p.283-287, 1988.

PAL, U.R.; MALIK, H.S. Contribution of *Azospirillum brasilense* to the nitrogen needs of grain *Sorghum* (*Sorghum bicolor* (L) Moench) in humid subtropics. **Plant and Soil**, v.63, n.3, p.501-504, 1981.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.8, p.3795-3801, 2002.

PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, v.11, n.2, p.111-115, 1991.

PEDERSEN, W.L.; CHAKRABARTY, K.; KLUCAS, R.V. et al. Nitrogen Fixation (Acetylene Reduction) Associated with Roots of Winter Wheat and Sorghum in Nebraska. **Applied and Environmental Microbiology**, v.35, n.1, p.129-135, 1978.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G. et al. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, n.6, p.1263-1271, 2006.

PEREIRA, J.A.R.; CAVALCANTE, V.A.; BALDANI, J.I. et al. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 110, n.2, p.269-274, 1988.

PEREIRA, W.; LEITE, J.M.; HIPÓLITO, G.S. et al. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, n.2, p.363-370, 2013.

PERSSON, H. The importance of fine roots in boreal forests. In: BÖHN, W.; KUTCHERA, L.; LINCHTENEGGER, E. (Eds.). **Root ecology and its practical application**, Gumpenstein: IS, 1982, p.595-608.

PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M. et al. Dinitrogen fixation and infection of grasses leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v.137, n.1, p.61-65, 1991.

POLY, F.; MONROZIER, L.J. BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, v.152, p.95-103, 2001.

PONTES, D.S.; LIMA-BITTENCOURT, C.I.; CHARTONE-SOUZA, E. et al. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. **Journal of Industrial Microbiology & Biochemistry**, v.34, n.7, p.463-473, 2007.

RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, v.32, n.1, p.39-54, 2002.

RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.10, p.987-994, 2010.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J.L.; STAPLES, C.R. et al. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, n.3, p.541-554, 2004.

REIS JUNIOR, SILVA, L.G.; REIS, V.M. et al. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.5, p.985-994, 2000.

REED, R.C.; BRADY, S.; MUDAY, G.K. Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.118, n.4, p.1369-1378, 1998.

RENGEL, Z.; ROSS, G.; HIRSCH, P. Plant genotype and micronutrient status influence colonization of wheat roots by soil bacteria. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, n.1, p.99-113, 1998.

REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Isolation, identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp. and other nitrogen-fixing bacteria. In: CÁSSAN, F.D.; OKON, C.; CREUS, C.M. (Eds.). **Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols**, p.3-26, 2015.

RIBEIRO, R.A.; BARCELLOS, F.G.; THOMPSON, F.L. et al. Multilocus sequence analysis of Brazilian Rhizobium microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v.160, n.4, p.297-306, 2009.

RICHARDSON, A.E.; SIMPSON, R. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. **Plant Physiology**®, v.156, n.3, p.989-996, 2011.

RIVAS, R.; MARTENS, M.; LAJUDIE, P. et al. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.32, n.2, p.101-110, 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.

ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.O.; SELBACH, P.A. et al. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, v.35, n.5, p.1201-1204, 2005.

RUDNICK, P.; MELETZUL, D.; GREEN, A. et al. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of Proteobacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.5-6, p.831-847, 1997.

RUPAEDAH, B.; ANAS, I.; SANTOSA, D.A. Screening and characterization of Rhizobacteria for enhancing and chlorophyll content of sweet sorghum (*Shorghum bicolor* L. Moench). **J. ISSAAS**, v.20, n.2, p.86-97, 2014.

SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, J.G. et al. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.6, p.833-842, 2007.

SALA, V.M.R.; SILVEIRA, A.P.D.; CARDOSO, E.J.B.N. Bactéria Diazotróficas Associadas a Plantas Não-leguminosas. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. (Eds.). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. cap.6, p.97-115.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P. et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.345-352, 2005.

SANTOS, C.L.R. **Efeitos da Inoculação com Bactérias Diazotróficas em Sorgo Granífero, Forrageiro e Sacarino**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SANTOS, F.C.; COELHO, A.M.; RESENDE, A.V. et al. Correção do solo e adubação na cultura do sorgo. In: **Informe Agropecuário**, v.35, n.278, p.76-88, 2014.

SANTOS, H.G.; JACOMINE, P.K.T.; ANJOS, L.H.C. et al. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 3 ed. rev. ampl. Brasília, DF: EMBRAPA, 2013. 353p.

SANTOS, C.L.R. **Efeitos da Inoculação com Bactérias Diazotróficas em Sorgo Granífero, Forrageiro e Sacarino**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SANTOS, C.L.R.; ALVES, G.C.; MACEDO, A.V.M. et al. Contribution of a mixed inoculant containing strains of *Burkholderia* spp. and *Herbaspirillum* spp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels. **Applied Soil Ecology**, v.113, n.1, p.96-106, 2017.

SANTOS, J.S.; VIANA, T.O.; JESUS, C.M. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, n.1, p.78-85, 2015.

SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.172, p.261-269, 1995.

SAUBIDET, M.I.; FATTA, N.; BARNEIX, A.J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v.245, p.215-222, 2002.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R.F.; SILVA, J.A. et al. Avaliação agrônômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.2, p.261-268, 2012.

SILVA, A.G.; ROCHA, V.S.; CECON, P.R. et al. Avaliação dos caracteres agronômicos de cultivares de sorgo forrageiro sob diferentes condições termofotoperiódicas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.4, n.1, p.28-44, 2005.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Editora UFV: Viçosa, MG. 2004. 235p.

SILVA, M.C.P.; FIGUEIREDO, A.F.; ANDREOTE, F.D. et al. Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, n.1, p.163-171, 2013.

SMITH, R.L.; SCHANK, S.C.; MILAM, J.R. et al. Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the N₂-Fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, n.6, p.1331-1336, 1984.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman & Co, 1973. 573 p.

SOARES, E.R.; COUTINHO, E.L.M.; RAMOS, S.B. et al. Acúmulo de matéria seca e macronutrientes por cultivares de sorgo sacarino. **Semina**, v.35, n.6, p.3015-3030, 2014.

SOLANO, B.R., BARRIUSO, J. GUTIÉRREZ-MAÑERO, F.J. Physiological and molecular mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. **Plant-Bacteria Interactions: Strategies and techniques to promote plant growth**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., p.41-54, 2008.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, n.4, p.425-448, 2007.

STADEN, R.; JUDGE, D.P.; BONFIELD, J.K. Analysing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. **Introduction to Bioinformatics: A Theoretical and Practical Approach**. Eds. KRAWETZ, S.A.; WOMBLE, D.D. Womble. Human Press Inc., Totawa, p. 393-410, 2003.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, n.4, p.487-506, 2000.

STEIN, T.; HAYEN-SCHNEG, N.; FENDRIK, I. Contribution of BNF by *Azoarcus* sp. BH72 in *Sorghum vulgare*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.5-6, p.969-971, 1997.

SUBUDHI, P.K.; ROSENOW, D.T.; NGUYEN, H.T. Quantitative trait loci for the stay green trait in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench): consistency across genetic backgrounds and environments. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, n.5-5, p.733-741, 2000.

SUMAN, A.; SHRIVASTAVA, A.K.; SINGH, P. et al. Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. **Plant Growth Regulation**, v.54, p.1-11, 2008.

TAN, Z.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in root of rice. **Environmental Microbiology**, v.5, n.10, p.1009-1015, 2003.

TAN, Z.; PENG, G.; XU, P. Diversity and high nitrogenase activity of endophytic diazotrophs isolated from *Oryza rufipogon* Griff., **Chinese Science Bulletin**, v.54, n.16, p.2839-2848, 2009.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov.

and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, n.8, p.967-980, 1978.

TEALE, W.D.; PAPONOV, I.A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.7, n.11, p.847-859, 2006.

TENNANT, D. A test of a modified line intersect method of estimating root length. **Journal of Ecology**, v.63, n.3, p.995-1001, 1975.

TERRA, T.G.R.; LEAL, T.C.A.B.; SIEBENEICHLER, S.C. et al. Desenvolvimento e produtividade de sorgo em função de diferentes densidades de plantas. **Bioscience Journal**, v.26, n.2, p.208-215, 2010.

TORRES, A.R.; ARAÚJO, W.L.; CURSINO, L.; HUNGRIA, M.; PLOTTEGHER, F.; MOSTASSO, F.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. **The Journal of Microbiology**, v.46, n.4, p.373-379, 2008.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N. et al. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.5, p. 1414-1417, 1995.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F.J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-base polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v.5, p.25-40. 1994.

VIANA, T.O. Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oriza sativa* L.) em Vitória da Conquista. 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em

Agronomia, Fitotecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Vitória da Conquista, 2012.

VINUESA, P.; SILVA, C.; WERNER, D. et al. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.34, p.29-54, 2005.

WANG, R.F.; CAO, W.W.; CERNIGLIA, C.E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rDNA gene sequence and PCR confirmation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.341-343, 1996.

WANG, R.F.; CHANG, Y.L.; ZHENG, W.T. et al. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. **Systematic and Applied Microbiology**, v.36, n.2, p.101-105, 2013.

WILCOX, C.S.; FERGUSON, J.W.; FERNANDEZ, G.C.J. et al. Fine root growth dynamics of four Mojave Desert shrubs as related to soil moisture and microsite. **Journal of Arid Environments**, v.56, n.1, p.129-148, 2004.

WONG, P.P.; STENBERG, N. Characterization of *Azospirillum* isolated from nitrogen-fixing roots of harvested sorghum plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.38, n.6, p.1189-1191, 1979.

WONG-VILLAREAL, A.; VELAZQUEZ-MÉNDEZ, A.M.; ROSADO-ZARRABAL, T.L. Low diversity diazotrophic of culturable *Burkholderia* species associated with sorghum. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, n.12, p.3058-3064, 2012.

YAMADA, E.A.; ALVIM, I.D.; SANTUCCI, M.C.C. et al. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, v.16, p.423-432, 2003.

YANO, D.M.Y.; FARRIS, M.G.; UMINO, C.Y.; COUTINHO, H.L.C.; CANHOS, V.P. **Técnicas para cultivo, identificação e preservação de**

bactérias. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1993. 64p.

YOON, V.; TIAN, G.; VESSEY, K. et al. Colonization efficiency of different sorghum genotypes by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant and Soil**, v.398, n.1, p.243-256, 2015.

YOUNG, J.P. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVENS, H.J. (Eds.). **Biological Nitrogen Fixation**, p. 43–87, 1992.

ZEHR, J.P.; MELLON, M.T.; ZANI, S. New nitrogen fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.9, p.3444–3450, 1998.

ZEHR, J.P.; JENKINS, B.D.; SHORT, S.M. et al.. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v.5, n.7, p 539–554, 2003.

APÊNDICE A
(Capítulo I)

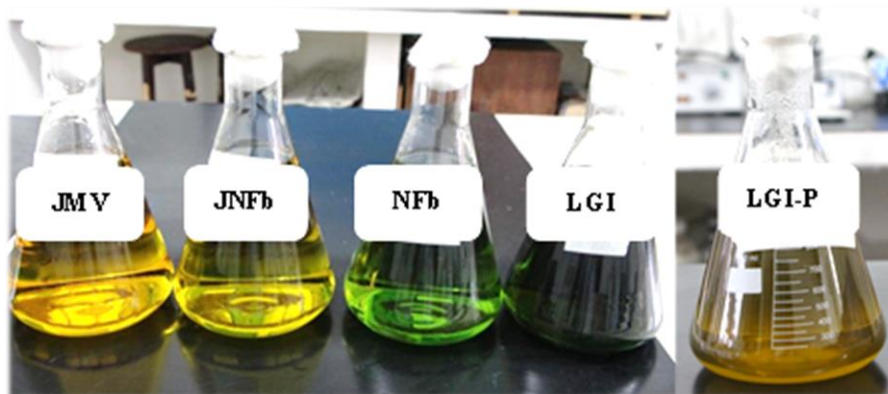


Figura 1A – Meios semissólidos JMV, JNFb, NFb, LGI e LGI-P utilizados para o isolamento de bactérias diazotróficas.

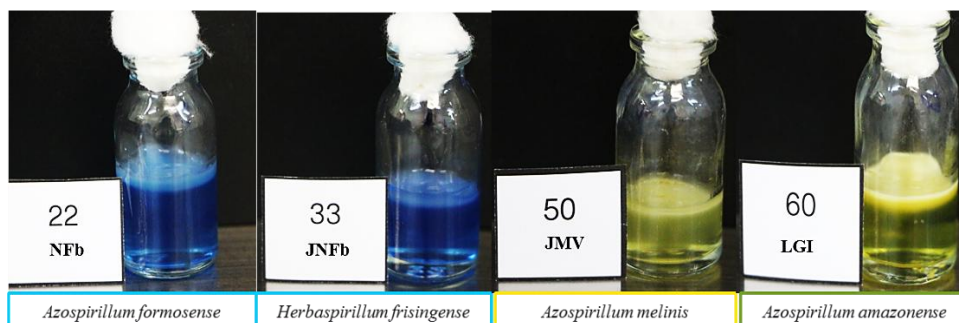


Figura 2A – Películas aerotáxicas características de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de sorgo nos meios NFb, JNFb, JMV e LGI.

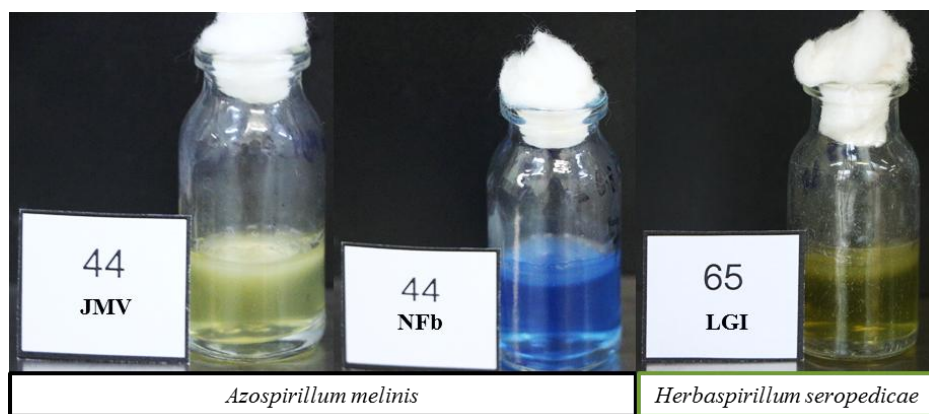


Figura 3A – Estirpe bacteriana JV44 identificada como *Azospirillum melinis* isolada no meio JMV e transferida para o meio NFb, para confirmação da espécie. Estirpe bacteriana L65 isolada no meio LGI e caracterizada molecularmente como *Herbaspirillum seropedicae*.



Figura 4A – Placas com colônias puras de isolados bacterianos de sorgo em meio Batata.

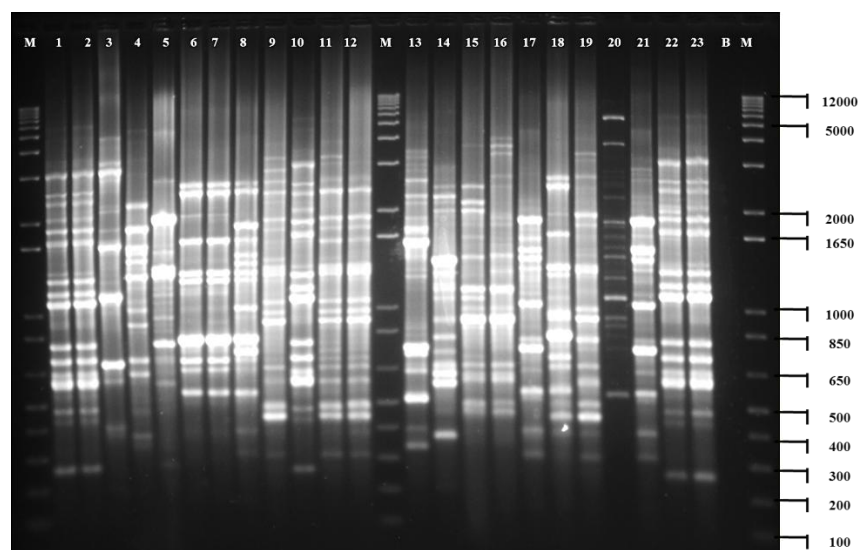


Figura 5A – Perfil eletroforético de análise BOX-PCR para agrupamento dos perfis de DNA das estirpes bacterianas isoladas em meio NFb. O marcador (M) utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder e o penúltimo poço é o branco (B).

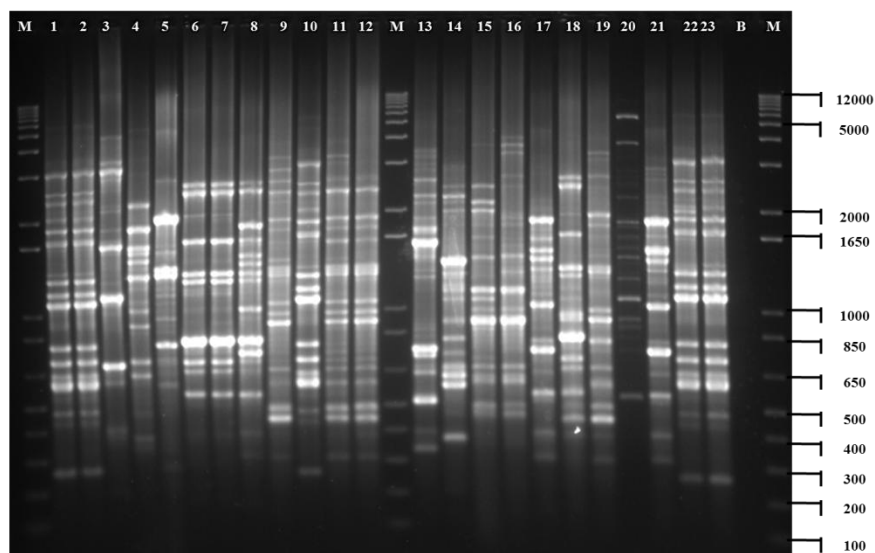


Figura 6A – Perfil eletroforético de análise BOX-PCR para agrupamento dos perfis de DNA das estirpes bacterianas isoladas em meio JNFb. O marcador (M) utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder e o penúltimo poço é o branco.

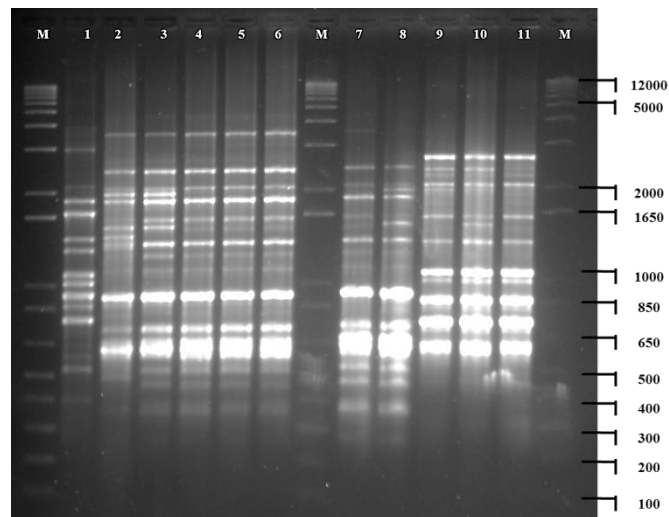


Figura 7A – Perfil eletroforético de análise BOX-PCR para agrupamento dos perfis de DNA das estirpes bacterianas isoladas em meio JMV. O marcador (M) utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder.

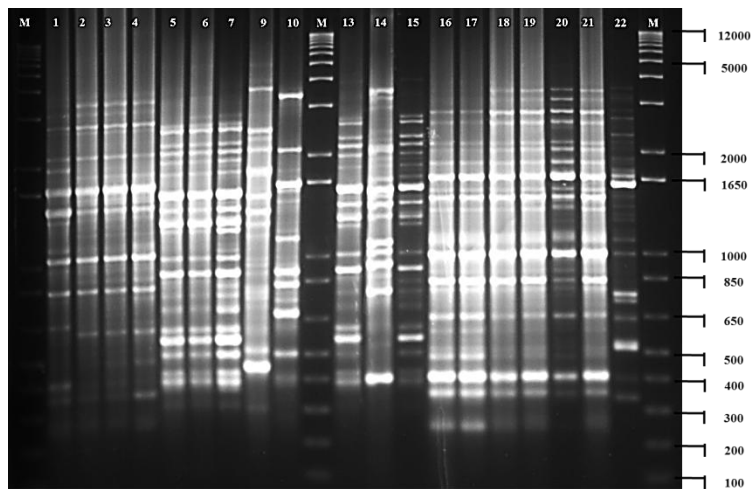


Figura 8A – Perfil eletroforético de análise BOX-PCR para agrupamento dos perfis de DNA das estirpes bacterianas isoladas em meio LGI. O marcador (M) utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder.

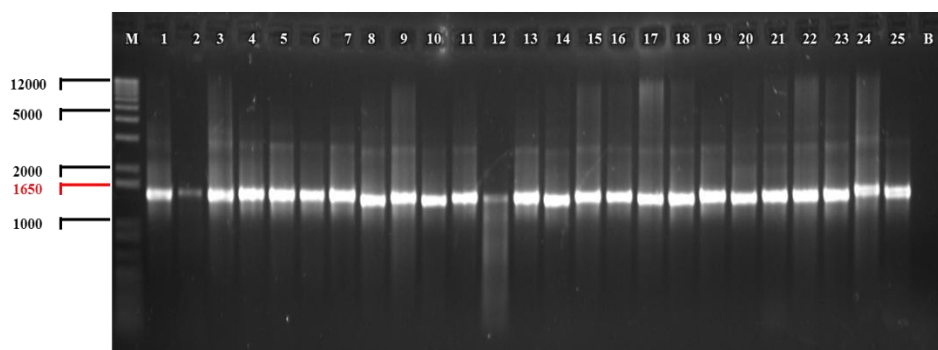


Figura 9A- Perfil eletroforético da amplificação do gene 16S rRNA de estirpes bacterianas isoladas da cultura do sorgo. O marcador (M) utilizado foi 1 Kb Plus DNA Ladder e o último poço é representado pelo branco (B).

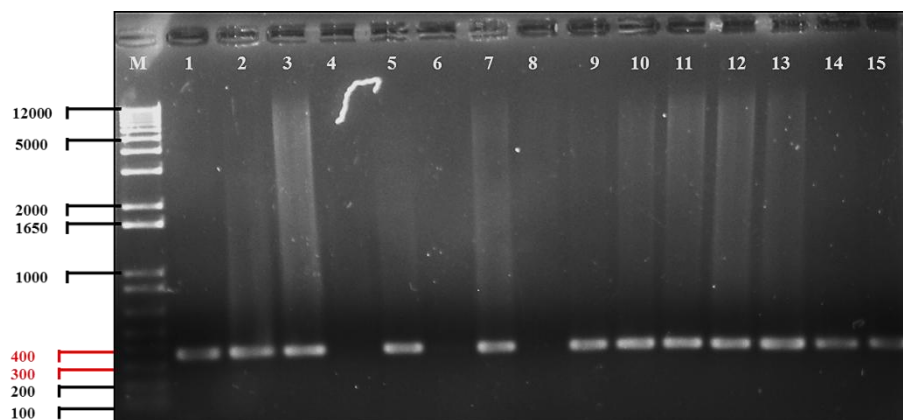


Figura 10A- Perfil eletroforético de amplificação do gene *nifH* de estirpes bacterianas isoladas da cultura do sorgo. O marcador (M) utilizado foi 1 Kb Plus DNA Ladder. Nos poços 4, 6 e 8 não houve amplificação do gene *nifH*.

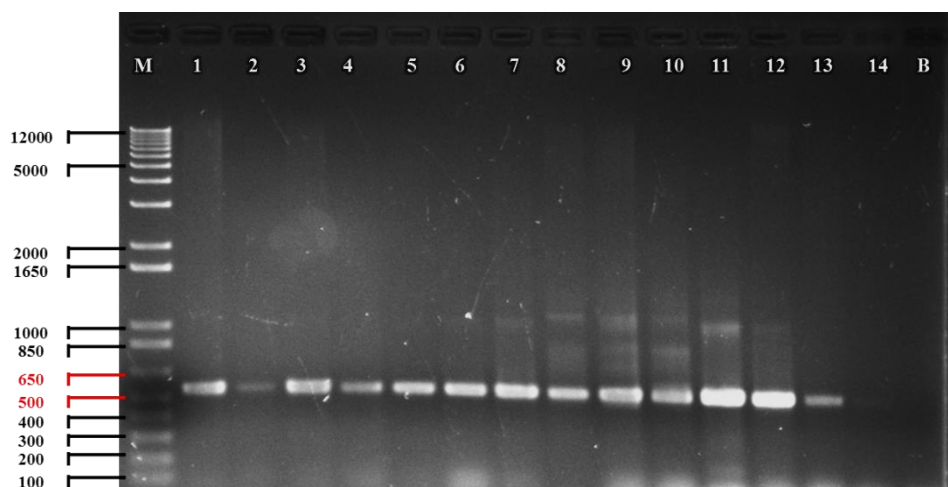


Figura 11A- Perfil eletroforético de amplificação do gene *housekeeping recA* de estirpes bacterianas isoladas da cultura do sorgo. O marcador (M) utilizado foi 1 Kb Plus DNA Ladder. No poço 14 não houve amplificação do gene *recA*. O último poço é o branco (B).

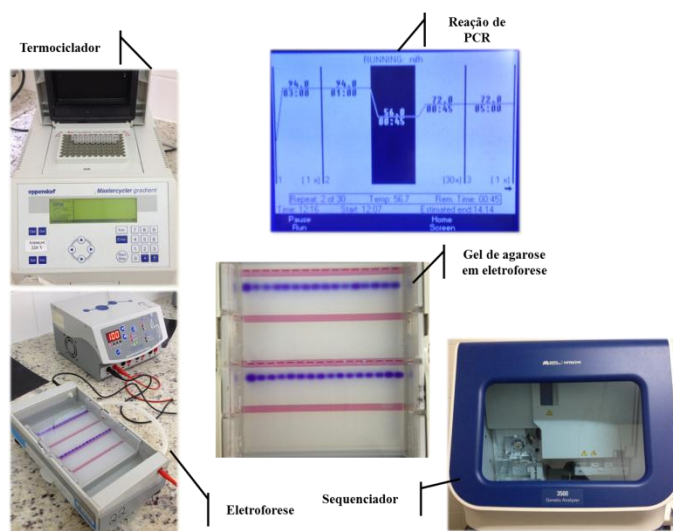
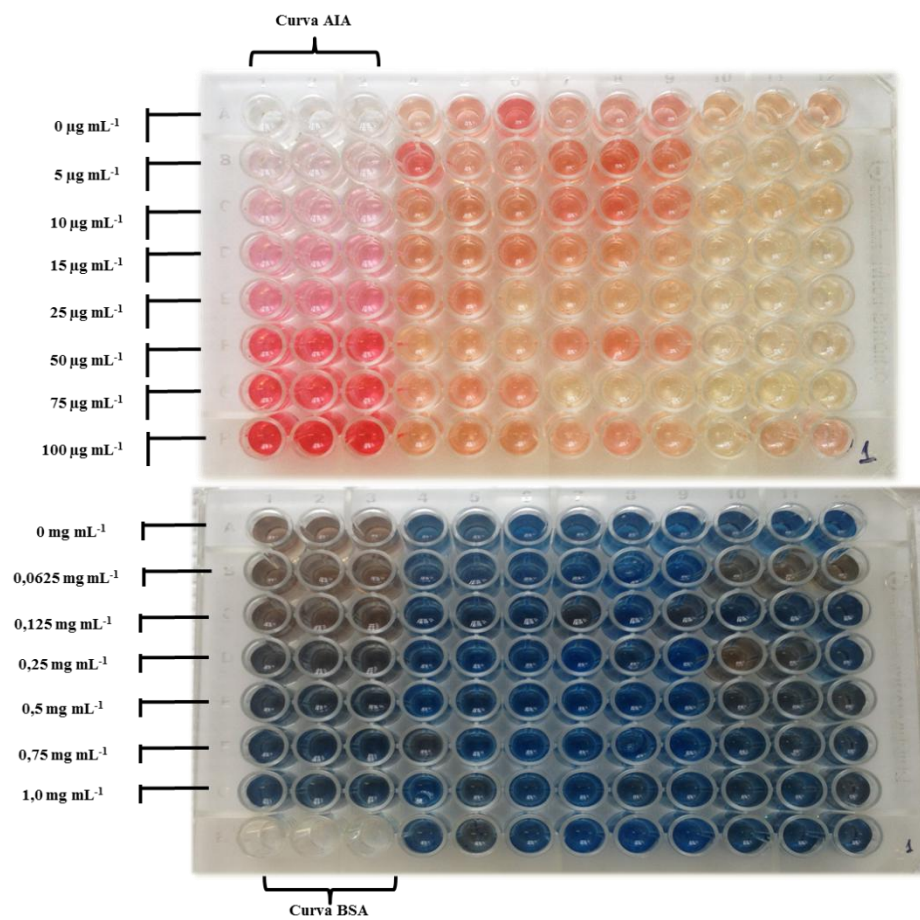


Figura 12A- Fluxograma de amplificação e sequenciamento de genes para caracterização molecular das bactérias diazotróficas na cultura do sorgo.



13A – Microplacas contendo as curvas padrão de AIA e BSA, e as concentrações produzidas de AIA e proteínas pelas estirpes bacterianas isoladas do sorgo para determinação da síntese de compostos indólicos ($\mu\text{g mL}^{-1}$ PTN⁻¹).

ANEXO A
(Capítulo I)

1 Soluções e meios utilizados para o isolamento e crescimento de bactérias diazotróficas do sorgo.

Solução salina para diluição seriada

K ₂ HPO ₄	sol. 10%	1,0 mL
MgSO ₄	sol. 10%	0,5 mL
NaCl	sol. 10%	0,2 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol. 10%	0,5 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	1,0 mL
Solução de micronutrientes	0,5 mL	

Ajustar o pH para 6,5 com solução de H₂SO₄ a 5%.
Completar com água destilada para 1000 mL.

Solução de micronutrientes para meio de cultura

Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,200 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,235 g
H ₃ BO ₃	0,280 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,008 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,024 g

Completar o volume para 200 mL com água destilada.

Solução de vitaminas

Biotina	10 mg
Piridoxol – HCl	20 mg

Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100 mL com água destilada.
Manter a solução em geladeira.

Meio NFb (BALDANI e DÖBEREINER, 1980) – *Azospirillum* spp.

Ácido málico		5 g
K ₂ HPO ₄	sol.10%	5 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol.10%	2 mL
NaCl	sol.10%	1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol.1%	2 mL
Azul de bromotimol	sol.0,5% em 0,2 N de KOH	2 mL
FeEDTA	sol.1,64%	4 mL
Solução de micronutrientes		2 mL
Solução de vitaminas		1 mL
KOH		4,5 g
Extrato de levedura (somente para meio sólido)		50 mg

Ajustar o pH para 6,5 com solução de KOH a 1%.

Adicionar 1,3 g L⁻¹ de ágar para semi-sólido e 15 g L⁻¹ para meio sólido.

No meio semi-sólido dissolver o ágar antes de completar o volume para 1000 mL.

Completar o volume para 1000 mL para água destilada.

Meio JNFb (DÖBEREINER et al., 1995) – *Herbaspirillum* spp.

Ácido málico		5 g
K ₂ HPO ₄	sol.10%	6 mL
KH ₂ PO ₄	sol.10%	18 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol.10%	2 mL
NaCl	sol.10%	1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol.1%	2 mL
Azul de bromotimol	sol.0,5% em 0,2 N de KOH	2 mL
FeEDTA	sol.1,64%	4 mL
Solução de micronutrientes		2 mL
Solução de vitaminas		1 mL
KOH		4,5 g
Extrato de levedura (somente para meio sólido)		20 mg

Ajustar o pH para 5,8 com solução de KOH a 1%.

Adicionar 1,7 g L⁻¹ de ágar para semi-sólido e 17 g L⁻¹ para meio sólido.

No meio semi-sólido dissolver o ágar antes de completar o volume para 1000 mL.

Completar o volume para 1000 mL para água destilada.

Meio JMV (BALDANI, V.L.D., 1996) – *Burkholderia* spp.

Manitol		5 g
K ₂ HPO ₄	sol.10%	6 mL
KH ₂ PO ₄	sol.10%	18 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol.10%	2 mL
NaCl	sol.10%	1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol.1%	2 mL
Azul de bromotimol	sol.0,5% em 0,2 N de KOH	2 mL
FeEDTA	sol.1,64%	4 mL
Solução de micronutrientes		2 mL
Solução de vitaminas		1 mL
KOH		4,5 g

Extrato de levedura (**somente para meio sólido**) 100 mg
Utilizar as placas somente 24 h após o preparo

Ajustar o pH para 5,0 a 5,4 com solução de KOH a 1%.

Adicionar 1,6 g L⁻¹ de ágar para semi-sólido e 25 g L⁻¹ para meio sólido.

No meio semi-sólido dissolver o ágar antes de completar o volume para 1000 mL.

Completar o volume para 1000 mL para água destilada.

Para meio líquido adicionar 10 mM de glutamato de sódio – 1,87 g L⁻¹ (indicador opcional)

Meio LGI (MAGALHÃES et al., 1983) – *Azospirillum amazonense*.

Açúcar cristal (sacarose)		5 g
K ₂ HPO ₄	sol.10%	2 mL
KH ₂ PO ₄	sol.10%	6 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol.10%	2 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol.1%	2 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	sol.0,1%	2 mL
FeCl ₃ .6H ₂ O	sol.1%	1 mL
Azul de bromotimol	sol.0,5% em 0,2 N de KOH	5 mL
FeEDTA	sol.1,64%	4 mL
Solução de vitaminas		1 mL

Extrato de levedura (**somente para meio sólido**) 20 mg

Ajustar o pH para 6,0 a 6,2 com solução de H₂SO₄ a 5%.

Adicionar 1,4 g L⁻¹ de ágar para semi-sólido e 15 g L⁻¹ para meio sólido.

No meio semi-sólido dissolver o ágar antes de completar o volume para 1000 mL.

Completar o volume para 1000 mL para água destilada.

Meio LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995) – *Gluconacetobacter* spp.

Açúcar cristal (sacarose)		100 g
K ₂ HPO ₄	sol.10%	2 mL
KH ₂ PO ₄	sol.10%	6 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol.10%	2 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol.1%	2 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	sol.0,1%	2 mL
FeCl ₃ .6H ₂ O	sol.1%	1 mL
Azul de bromotimol	sol.0,5% em 0,2 N de KOH	5 mL
Solução de vitaminas		1 mL
Extrato de levedura (somente para meio sólido)		50 mg

Ajustar o pH para 5,5 com solução de ácido acético a 1%.

Adicionar 1,3 g L⁻¹ de ágar para semi-sólido e 25 g L⁻¹ para meio sólido.

No meio semi-sólido dissolver o ágar antes de completar o volume para 1000 mL.

Completar o volume para 1000 mL para água destilada.

Meio Batata (BALDANI e DÖBEREINER, 1980)

Batata cozida	200 g
Ácido málico	2,5 g
Açúcar cristal	2,5 g
Solução de micronutrientes	2 mL
Solução de vitaminas	1 mL

Pesar os 200 g de batata descascada e cozinhar em água destiladas durante 30 minutos. Paralelamente, adicionar o ácido málico em 50 mL de água destilada com 2 gotas de azul de bromotimol (sol.0,5% em 0,2 N de KOH). Adicionar o açúcar cristal, as soluções de micronutrientes e vitaminas e ajustar o pH com KOH a 1% até atingir o pH 6,8-7,0.

Filtrar a batata em algodão e juntar a solução preparada anteriormente ao filtrado. Completar o volume para 1000 mL.

Adicionar 1,84 g L⁻¹ de ágar para semi-sólido e 15 g L⁻¹ de ágar para meio sólido.

Meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986)

Glicose	2 g
Ácido málico	2 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
Ácido glutâmico	1,5 g

Ajustar o pH com solução de KOH a 10%.

pH 6,8 para *Azospirillum*.

pH 6,0 para *Herbaspirillum*.

pH 6,0 para *Gluconacetobacter* (menos ácido málico)

Completar para 1000 mL com água destilada.

Adicionar 15 g L⁻¹ de ágar para meio sólido.

2 Similaridade filogenética de espécies de *Azospirillum* spp.

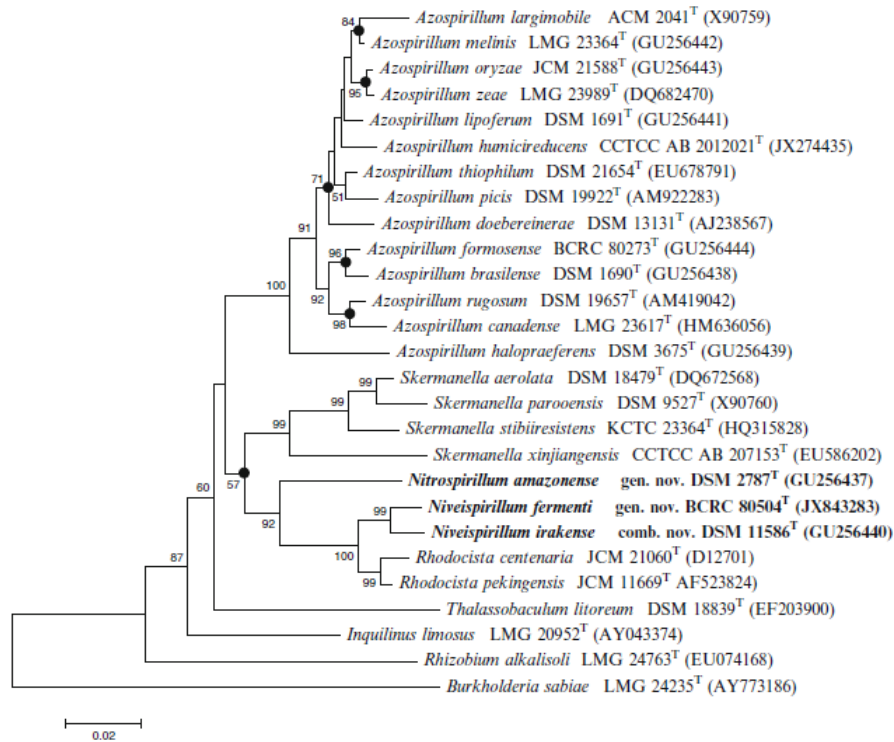


Figura 14A – Análise filogenética de *Azospirillum* spp. e outros representantes da família *Rhodospirillaceae* baseado em sequências do gene 16S rRNA (LIN et al., 2014).