

THIAGO DE ALMEIDA PAULA

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL
ASSOCIADAS AO SORGO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P324b
2018 Paula, Thiago de Almeida, 1991-
Bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas ao
sorgo / Thiago de Almeida Paula. – Viçosa, MG, 2018.
v, 44 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Leonardo Duarte Pimentel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: r. 34-44.

1. *Sorghum bicolor* - Crescimento. 2. Crescimento
(Plantas). 3. Sorgo - Biotecnologia. 4. Plantas - Reguladores.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia.
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. II. Título.


CDD 22. ed. 633.174899

THIAGO DE ALMEIDA PAULA


**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS
AO SORGO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2018



Maria Catarina Megumi Kasuya
(Coorientadora)



Marliane de Cássia Soares da Silva
(Coorientadora)



Leonardus Vergütz



Leonardo Duarte Pimentel
(Orientador)

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Sorgo e sistemas de produção	3
2.2 Mecanismo de promoção de Crescimento Vegetal	4
2.2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	4
2.2.2 Solubilização de Fosfato Inorgânico	6
2.2.3 Produção de Ácido Indol-acético.....	7
2.3 Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV) associada a gramíneas.....	8
2.4 Bacterias promotoras do crescimento vegetal associadas ao sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L. Moench)	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Local e Amostragem	13
3.2 Isolamento	14
3.3 Identificação.....	14
3.3.1 Purificação de bactérias.....	14
3.3.2 Extração de DNA	15
3.3.3 Amplificação do gene 16S rDNA e sequenciamento	15
3.4 Caracterização Fisiológica	16
3.4.1 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	15
3.4.2 Solubilização de Fosfato Inorgânico	16
3.4.3 Produção de Ácido indol-acético (AIA)	16
3.5 Seleção (<i>in vitro</i>).....	17
3.6 Análise Estatística.....	17

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Isolamento e identificação	18
4.2 Fixação biológica de nitrogênio.....	21
4.3 Solubilização de Fosfato inorgânico.....	23
4.4 Produção de ácido indol-acético (AIA).....	26
4.5 Solubilização de Fosfato Inorgânico, Produção de Ácido Indol-Acético, Fixação Biológica de Nitrogênio e Seleção (<i>in vitro</i>).....	29
5 CONCLUSÃO	33
6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	34

RESUMO

PAULA, Thiago de Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas ao sorgo**
Orientador: Leonardo Duarte Pimentel. Coorientadores: Marliane de Cássia Soares da Silva e Maria Catarina Megumi Kasuya.

O Brasil é o terceiro maior produtor agrícola mundial, porém depende da importação de 80% dos fertilizantes para manutenção das atividades agrícolas. Uma estratégia promissora para mitigar esse problema seria incorporar microorganismos benéficos aos sistemas de produção que promovam o crescimento vegetal por meio da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), Solubilização de Fosfatos Inorgânicos (SFI) e produção de Ácido Indol-Acético (AIA). O objetivo desse trabalho foi isolar e selecionar bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) associadas às raízes de sorgo que possuam potencial biotecnológico. Para isso, foram utilizadas raízes de plantas de sorgo, dos grupos biomassa e forrageiro, colhido aos trinta dias após o plantio para o isolamento das bactérias. Para a detecção de FBN os isolados foram inoculados em meio semissólido, NFb, sem nitrogênio. O teste de SFI foi realizado pela inoculação dos isolados em meio de fosfato insolúvel na forma de $\text{Ca}_3(\text{HPO}_4)_2$ e para o teste de produção de AIA, as bactérias foram cultivadas em meio TSA 10% contendo L-triptofano. Foram obtidos 24 isolados associados às raízes de plantas de sorgo, sendo 17 provenientes do sorgo biomassa e 7 do sorgo forrageiro. Desses, 4 foram positivos para FBN, SFI e produção de AIA (SB1, SB5, SF1, SF4) e 1 foi positivo para FBN e produção de AIA (SF6). Sendo que os isolados SB1 e SF1 se destacam dos demais por possuírem elevado Índice de solubilização, enquanto os isolados SF4 e SF6 possuem uma maior produção de AIA. Conclui-se que plantas de sorgo possuem bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas às suas raízes capazes de realizar SFI, FBN e produzir AIA, indicando o potencial de uso biotecnológico desses isolado.

ABSTRACT

PAULA, Thiago de Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Sorghum-associated plant growth-promoting bacteria**. Adviser: Leonardo Duarte Pimentel. Co-advisers: Marliane de Cássia Soares da Silva and Maria Catarina Megumi Kasuya.

Brazil is the third largest agricultural producer in the world, but depends on the importation of 80 % of the fertilizers to maintain its agricultural activity. A promising strategy to mitigate this problem would be to incorporate beneficial microorganisms into the production systems that promote plant growth through Biological Nitrogen Fixation (BNF), Inorganic Phosphate Solubilization (ISF) and Indol-Acetic Acid (IAA) production. The objective of this work was to isolate and select plant growth promoting bacteria (PGPB) associated with the roots of sorghum that have biotechnological potential. For this, roots of sorghum plants, of the biomass and forage groups, were collected 30 days after planting, for isolation bacteria. For the detection of BNF the isolates were inoculated in semisolid medium, NFB, without nitrogen. The ISF test was performed by inoculating the isolates in insoluble phosphate medium as $\text{Ca}_3(\text{HPO}_4)_2$. and for IAA test, the bacteria were cultured in 10% TSA containing L-tryptophan. Twenty - four isolates associated with the root of sorghum plants were obtained, 17 being from biomass and 7 from forage. Of these, four were positive for NBF, ISF and production of IAA (SB1, SB5, SF1, and SF4) and one was positive for NBF and production of IAA (SF6). Since the isolates SB1 and SF1 stand out from the others because they have high IS, whereas the isolates SF4 and SF6 have a higher production of IAA. It is concluded that sorghum plants have plant growth promoting bacteria associated with their roots capable of performing NBF, ISF and produce IAA, indicating the potential of biotechnological use of these isolates.

1 INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2016), até 2050 a população mundial deverá chegar a 9 bilhões, o que acarretará em uma maior demanda por alimentos e, conseqüentemente, o desafio de aumentar a produção agrícola de forma sustentável.

No Brasil um importante fator de aumento da produtividade é o uso de fertilizantes químicos, porém a capacidade interna de produção é insuficiente para suprir sua necessidade, fazendo com que o país seja o quarto maior importador do insumo. Em 2015 a demanda total de fertilizantes químicos do Brasil foi de 30 milhões de toneladas, dos quais 14 milhões eram de macronutrientes primários (CRUZ et al., 2017). Para os próximos anos é esperado incremento no uso de fertilizantes para atender a intensificação da agricultura, o que resultará em um aumento dos custos de produção.

Para suprir essa demanda o país importa 73% do seu fertilizante nitrogenado, 34% do fosfatado e 92% do potássico (DEPEC – Bradesco, 2017). Essa dependência pelo mercado externo tem sido motivo de preocupação já que possui efeito direto sobre o custo de produção da lavoura e, tanto o uso indiscriminado quanto o método de produção desses fertilizantes ocasionam sérios problemas de ordem ambiental, tais como a produção de chuva ácida, contaminação de lençol freático e eutrofização de cursos d'água (MARTINELLI, 2007; ROSOLEM et al., 2003). Neste contexto, é importante o desenvolvimento de novas tecnologias sustentáveis que proporcionem a diminuição do uso de fertilizantes químicos aplicados no cultivo de culturas agrícolas, havendo assim diminuição no custo de implementação da lavoura sem afetar a produção final.

Uma alternativa é o uso de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV), que atuam por meio de diversos mecanismos, tais como a capacidade de realizar a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN); solubilização de fosfato inorgânico (SFI) e a produção de ácido indol-acético (AIA) (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; PEDRINHO et al., 2010; VERMA ET al., 2001), esse grupo de micro-organismos pode colonizar a rizosfera, a superfície das raízes (rizoplano) ou o interior dos tecidos vegetais onde exerce um efeito benéfico no desenvolvimento e sanidade das plantas (HUNGRIA et al., 2010). As BPCV são

encontradas em associação com espécies de gramíneas de importância comercial, como trigo (KENNEDY et al., 1997), arroz (KUSS et al., 2007), milho (ALVES et al., 2014), cana-de-açúcar (WEI et al., 2014) e braquiária (BRASIL et al., 2005). Para algumas gramíneas como cana de açúcar e milho, já existem estudos sobre o uso desses micro-organismos que mostram redução no uso de fertilizantes nitrogenados durante o cultivo dessas culturas, além de outros benefícios acarretados pela adoção dessa tecnologia como a maior sustentabilidade do sistema (ALVES et al., 2014; BODDEY et al., 1991; HUNGRIA et al., 2010; WEI et al., 2014).

Assim como outras gramíneas o sorgo possui potencial para realizar associações com BPCV (COELHO et al., 2009). Com a evolução dos estudos espera-se identificar micro-organismos com maior eficiência em promover o crescimento vegetal em associações com a cultura, bem como determinar as condições ótimas para a interação entre o sorgo e as bactérias de modo a maximizar o rendimento em termos de produtividade agrícola através da promoção do crescimento vegetal. Dessa forma, há possibilidade de se reduzir o uso de fertilizantes durante o seu cultivo, o que pode resultar em benefícios tanto econômicos, quanto ambientais e sociais. Busca-se também diminuir os riscos e o investimento inicial atrelado ao plantio do sorgo na safrinha, encorajando sua produção e impulsionando o setor agropecuário e bioenergético. Entretanto, apesar de algumas pesquisas demonstrarem a presença dessas bactérias vivendo tanto na rizosfera quanto de forma endofítica associadas com plantas de sorgo, os resultados ainda são escassos. Assim, há necessidade de maiores estudos que abordem essa associação.

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho isolar, identificar e caracterizar bactérias fixadoras de nitrogênio, com potencial de uso biotecnológico, associadas às raízes de plantas de sorgo. Além dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal relacionados à solubilização de fosfato inorgânico e produção de ácido indol-acético presentes nessas bactérias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sorgo e sistemas de produção

Uma das culturas que tem chamado atenção e está ganhando espaço no mercado agrícola devido ao seu uso diversificado é o sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). O sorgo é originário do continente Africano, onde foi domesticado e, a partir de então, teve sua dispersão para outras partes do mundo (DE WET, 1978; Harlan, 1971). A cultura possui um grande potencial econômico e sua utilização destina-se para os mais variados fins, podendo o grão ser utilizado como alimento humano, como fonte energética em ração animal (DICKO et al., 2006) e na produção de forragem para ruminantes (SANTOS et al., 2013). Além disto, sua panícula pode ser utilizada na fabricação de vassouras (BERENJI; DAHLBERG, 2004), e seu cultivo, nos últimos anos, tem sido considerado uma promissora fonte para a produção de biocombustíveis (ANTONOPOULOU et al., 2008). Atualmente é o quinto cereal mais produzido no mundo perdendo somente para trigo, arroz, milho e cevada. Assim, espera-se que ocorra um aumento substancial na área cultivada no país, principalmente devido ao interesse que tem despertado para o setor bioenergético, o que acarretará em aumento no uso de fertilizantes.

Devido a características que lhe confere grande capacidade de suportar estresses ambientais, como altas temperaturas e déficit hídrico, seu cultivo é de grande importância em regiões áridas, semiáridas ou que apresentam tais problemas durante o ano. Assim, a cultura tem sido amplamente cultivada na segunda safra, isto é, em sucessão a culturas de verão (COELHO et al., 2002), seu cultivo predomina de fevereiro a abril em sucessão a cultura da soja precoce. Com esse sistema de produção é possível o plantio em áreas marginais onde o milho não se adapta bem (RODRIGUES, 2009).

Porém, o cultivo de segunda safra corresponde ao período que as condições climáticas são mais desfavoráveis, assim há menor investimento por parte dos produtores, principalmente em fertilizantes, visto o elevado preço do insumo e o maior risco. Devido ao menor investimento, o desempenho da cultura fica aquém do que se é esperado. Em relação à nutrição mineral, existe forte tendência e necessidade de otimizar a adubação na época da segunda safra, o que constitui um fator limitante à atividade agrícola (SCIVITTARO et al., 2005).

Ou seja, no caso do sorgo, que é cultivado em ambientes e épocas limitantes, novas tecnologias que diminuam a dependência por fertilizantes químicos tornam-se mais importante para reduzir os riscos do investimento.

2.2 Mecanismo de promoção de Crescimento Vegetal

O Brasil é atualmente o terceiro maior exportador agrícola, entretanto também é o quarto maior importador de fertilizantes químicos. Essa dependência pelo mercado externo gera certa preocupação devido ao efeito direto sobre o custo de produção da lavoura, além da preocupação com o uso indiscriminado desses fertilizantes que pode trazer riscos ambientais, tais como a eutrofização do lençol freático e emissão de gases.

Dessa forma, o desenvolvimento de novas tecnologias para o setor é importante para a diminuição da dependência pelo uso desses fertilizante e maior sustentabilidade do sistema de produção agrícola. Uma das alternativas que pode sanar esse gargalo é o uso de inoculantes à base de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV), esse grupo de micro-organismos pode colonizar a rizosfera, a superfície das raízes (rizoplane) ou o interior dos tecidos vegetais onde exercem um efeito benéfico no desenvolvimento e sanidade das plantas (MARIANO et al., 2004). Essas bactérias podem atuar tanto de forma direta, suprimindo a necessidade das plantas por água e nutrientes, pelos de mecanismos como a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) e Solubilização de Fosfato Inorgânico (SFI) entre outros (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; VERMA et al., 2001). Ou de forma indireta, como indução de resistência sistêmica e agentes de biocontrole (MARIANO et al., 2004).

2.2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio é um macro nutriente essencial a todas as formas de vida e o quarto elemento mais demandado pelos vegetais, possuindo papel fundamental em diversos processos fisiológicos, tais como, fotossíntese, respiração, crescimento e diferenciação celular (FAGUNDES et al., 2007; NUNES et al., 1993; LOBO et al., 1988). Além disto, este é constituinte de macromoléculas essenciais como enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, proteínas de armazenamento e paredes celulares (HARPER, 1994). Na atmosfera terrestre o N_2 é altamente abundante, correspondendo a

aproximadamente 80% do total na forma de gás dinitrogênio (N_2). No entanto, esta forma é inerte, o que se deve a características intrínsecas da molécula, tais como à sua ordem de ligação, não-polaridade da molécula, alta energia de ionização e presença de triplas ligações (SPRENT; SPRENT, 1990). Devido a essa inatividade, a maioria dos organismos não possui a capacidade de utilizar o N_2 para suprir suas necessidades nutricionais. Assim, as plantas obtêm nitrogênio na forma de nitrato ou amônio por meio da atividade das raízes (SANTI et al., 2013). Atualmente a maneira mais utilizada para fornecer nitrogênio na forma assimilável às plantas é através da adubação com fertilizantes sintéticos. Porém, estes são fabricados pelo método Harber-Bosch, que ocorre sob alta temperatura (aproximadamente 500 °C) e pressão (200-600 atm) e requer a queima de uma grande quantidade de combustíveis fósseis, tornando o processo oneroso e contribuindo direta e indiretamente para a poluição ambiental (LEIGH, 1998; LUTZENBERGER, 2001).

De acordo com Gruber et al. (2008), um importante processo de ocorrência natural que suporta o desenvolvimento da vida sem a introdução de fertilizantes nitrogenados consiste na conversão de N_2 a NH_3 , conhecido como fixação de nitrogênio, que pode ocorrer naturalmente por meio da atividade biológica de micro-organismos presentes tanto no solo quanto no tecido vegetal (também chamado de fixação biológica de nitrogênio). A fixação do N_2 é um processo de grande importância para a agricultura, dado que este nutriente é frequentemente o principal limitante da produção agrícola no mundo (SMIL et al., 2004).

Segundo Franche et al. (2009), a FBN é realizada exclusivamente por micro-organismos pertencentes ao grupo dos procariotos, podendo estes serem de vida livre ou simbióticos. Os micro-organismos que possuem a capacidade de realizar a FBN são chamados de diazotróficos e utilizam-se da atividade de um grande complexo enzimático, chamado Complexo da Nitrogenase, para catalisar a conversão de dinitrogênio à amônia, que pode ser então utilizada pelas plantas em seu metabolismo.

As bactérias diazotróficas podem ser separadas em três grupos: diazotróficos de vida livre; diazotróficos associativos e os diazotróficos simbióticos. Os diazotróficos de vida livre e os associativos são frequentemente

encontrados em associações não simbióticas com monocotiledôneas (EVANS; BURRIS 1992). Apesar dos micro-organismos de vida livre, que possuem de maneira geral uma baixa eficiência no processo de FBN, os micro-organismos que se associam a plantas leguminosas e não-leguminosas formando nódulos são os mais eficientes e também específicos. Dentre os micro-organismos diazotróficos podem ser citados: rizóbios (bactérias Gram-negativas membros do filo Proteobacteria), os quais se associam com plantas leguminosas, formando nódulos; *Frankia* sp. e cianobactérias como *Nostoc* sp. Além disto, alguns outros micro-organismos por sua vez formam simbioses associativas com plantas, ou são endofíticos, fixando nitrogênio, como *Azospirillum* spp., *Azoarcus* spp. e *Herbaspirillum* (SANTI, 2013).

2.2.2 Solubilização de Fosfato Inorgânico

O fósforo (P) é um macronutriente essencial às plantas, possuindo papel fundamental em diversos processos fisiológicos tais como armazenador de energia; atividade das enzimas relacionadas à respiração e influência no processo de fotossíntese.

Embora o P esteja presente no solo, a maior parte desse nutriente encontra-se em formas não disponíveis para as culturas. Isso ocorre devido à interação com o cálcio, alumínio e ferro. Dessa forma acontece a retenção do P adicionado ao solo em formas lábeis ou não, seja através da precipitação deste em solução com formas iônicas de cálcio, ferro e alumínio, ou sua adsorção à superfície de óxidos, hidróxidos e oxi-hidróxidos de ferro e alumínio, dando origem aos fosfatos inorgânicos insolúveis (ALEXANDER, 1961; NOVAIS; SMITH, 1999). Devido a essas características, atualmente o P é fornecido para as plantas através de fertilizantes químicos fosfatados solúveis, entretanto devido à sua dinâmica no solo, a dose recomendada é geralmente superior à necessária para as culturas.

Dessa forma, micro-organismos solubilizadores de fosfatos são de grande importância na disponibilização dessas formas inorgânicas de P e, assim, no aumento do teor desse elemento na solução do solo em formas disponíveis para a absorção pelas raízes das plantas. A atividade bioquímica das BPCV pode aumentar sensivelmente a absorção do P pelas plantas, tornando-as uma

das principais alternativas sustentáveis para aumentar a disponibilidade deste nutriente (ALEXANDER, 1961).

Esses micro-organismos atuam por meio de diferentes mecanismos como extrusão de prótons H⁺; produção de exopolissacarídeos; produção de sideróforos e quelação (BOMFETI et al., 2011; GYANESHWAR et al., 2002; HAMDALI et al., 2008; ILLMER; SHINNER, 1992; YU et al., 2011). Porém o principal contribuinte para a solubilização de fosfato é a produção de ácidos orgânicos (SOUCHIE et al., 2005; BARROSO; NAHAS, 2008). Nos últimos anos vários micro-organismos solubilizadores de fosfatos têm sido descritos na literatura com capacidade de solubilizar diferentes complexos de P *in vitro*, sendo que esta solubilização está relacionada na maioria das vezes com a diminuição do pH do meio.

2.2.3 Produção de Ácido Indol-acético

O fitohormônio ácido indol-acético (AIA), da classe das auxinas, que atua no crescimento e desenvolvimento dos vegetais (LOPER; SCHROTH, 1986) é sintetizado no meristema apical das plantas, mas também existem micro-organismos capazes de sintetizá-lo em associação com vegetais.

Alguns estudos demonstram a capacidade *in vitro* de BPCV em sintetizar reguladores de crescimento vegetal (ARSHAD; FRANKENBERGER, 1998). Um desses é o fitohormônio AIA. O AIA pode ser sintetizado por diferentes vias metabólicas, porém, a principal é a que utiliza o aminoácido L-triptofano como precursor fisiológico na biossíntese de auxinas (KHALID et al., 2004). Estudos demonstram a ocorrência de duas vias biosintéticas de AIA dependentes de triptofano, via do ácido índole-3-acetamida (IAM) e via do ácido índole-3-piruvato (IpyA) (PRISEN et al., 1993).

A inoculação com essas bactérias aumenta a superfície de absorção das raízes, o que resulta em maior volume de substrato do solo explorado devido a modificação da morfologia do sistema radicular e aumento do número de radículas (OKON; VANDERLEYDEN, 1997). Também pode ter efeito benéfico na germinação das sementes (SCHINDWEN et al., 2008). Entretanto elevadas concentrações de AIA podem levar a problemas de toxidez e inibição do

desenvolvimento e crescimento vegetal (FETT NETO et al., 1992; GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998; SALISBURY; ROOS 1991).

2.3 Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV) associada a gramíneas

As BPCV formam associação com diferentes espécies de gramíneas com importância comercial, tais como trigo, arroz, milho, braquiária e sorgo, os gêneros descritos mais conhecidos em associação com essas gramíneas são *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Azospirillum* (HUNGRIA et al. 2010). Um dos gêneros mais conhecidos e estudados em associação com gramíneas é o *Azospirillum*, esse grupo de micro-organismos coloniza tanto o interior quanto a superfície das raízes (BALDANI et al., 1986; MICHIELS et al., 1989). Estudos envolvendo diferentes espécies de plantas têm demonstrado que pode ocorrer um ganho de produção de 5 a 30% devido à inoculação com *Azospirillum* (OKON; LANBADERA-GONZALES, 1994). Essas características como alta capacidade de realizar o processo de FBN, possuir efeitos benéficos quando inoculados em plantas bem documentados e sua fácil identificação, o gênero *Azospirillum* é considerado um organismo modelo para o estudo de associações entre planta e micro-organismo (MICHIELS et al., 1989). Também podemos citar como exemplos de micro-organismos que possuem sucesso na promoção do crescimento vegetal bactérias do gênero *Beijerinckia* em cana de açúcar e *Azotobacter* em grama batatais (VINHAL-FREITAS; RODRIGUES, 2010).

Entre as gramíneas, as culturas que têm sido melhor estudadas e demonstram relativo sucesso na capacidade de realizar associações eficientes com BPCV estão a cana-de-açúcar (BODDEY et al., 1991, 1995; TAULÉ et al., 2012; WEI et al., 2014) e o milho (ALVES et al., 2014; DE SALAMONE et al., 1996; MONTAÑEZ et al., 2009;). Outras culturas como o sorgo (COELHO et al., 2009), trigo (KENNEDY et al., 1997), arroz (BODDEY et al., 1995; KUSS et al., 2007) e braquiária (BRASIL et al., 2005) também demonstram um grande potencial para o estabelecimento desse tipo de associação.

Um importante mecanismo de promoção de crescimento é a Fixação Biológica de Nitrogênio. Plantas pertencentes à família *Poaceae* não formam associações simbióticas para a fixação de nitrogênio, sendo menos eficientes no processo que as plantas leguminosas que interagem com rizóbios, por exemplo,

a soja (SPRENT; SPRENT, 1990). Apesar disto, atualmente tem se dado grande importância para a FBN em gramíneas, visando diminuir os gastos com adubos nitrogenados, principalmente para culturas que possuem grande valor econômico como a cana-de-açúcar, milho, braquiária e sorgo (DOBEREINER, 1992). Este interesse se deve em parte ao fato destas possuírem um maior aproveitamento de água, devido a sua maior eficiência fotossintética e também, devido à sua maior eficiência no uso do nitrogênio. Dessa forma, mesmo que apenas parte do N seja fornecido através da associação com micro-organismos diazotróficos, a economia seria similar àquela verificada em leguminosas (DOBEREINER, 1992).

Algumas variedades de cana-de-açúcar podem obter uma grande contribuição de N através da FBN, chegando em 60 a 80% do N total da planta (BODDEY et al., 1991). Hungria e colaboradores (2010), ao avaliarem a eficiência agrônômica da inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho, observaram que algumas estirpes proporcionaram incrementos de 662 a 823 kg ha⁻¹ na produtividade de grãos, equivalentes à 24 a 30% em relação ao tratamento controle que não foi inoculado.

A atividade bioquímica das BPCV também pode aumentar sensivelmente a absorção de fósforo (P) pelas plantas, o que as tornam uma das principais alternativas sustentáveis para aumentar a disponibilidade deste nutriente que é um dos mais limitantes para o crescimento e desenvolvimento vegetal. A dinâmica do P em solos é complexa por causa do fenômeno de fixação que ocorre devido à afinidade que o P possui em formar complexos com o Cálcio (Ca), Ferro (Fe) e Alumínio (Al) (RAIJ, 2004), o qual fica retido nas partículas de solo em formas estáveis de fosfato inorgânico e aqueles formados pela aplicação de fontes solúveis (ALEXANDER, 1961). O uso dessas bactérias pode diminuir a aplicação de fertilizantes fosfatados, uma vez que ocorre o melhor aproveitamento dos fosfatos inorgânicos insolúveis. Esse é o caso de isolados de rizóbio, por exemplo, que além de fixar o nitrogênio atmosférico, também possuem a capacidade de solubilizar fosfatos, o que faz com que seja uma alternativa de uso em espécies de Gramíneas (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

Os mecanismos de liberação de nutrientes pelas BPCV para as plantas somam-se à capacidade de produção de hormônios como o ácido indol-acético

(AIA) do grupo das auxinas, que exerce efeito sobre crescimento e desenvolvimento das plantas. A inoculação com essas bactérias aumenta a superfície de absorção das raízes, o que resulta em maior volume de substrato do solo explorado. Isso ocorre pois o AIA microbiano pode atuar modificando a morfologia do sistema radicular e aumentando o número de radículas (OKON; VANDERLEYDEN, 1997).

Entretanto, o uso dessa tecnologia ainda encontra alguns obstáculos que impedem sua maior adoção por parte dos agricultores. Apesar de se apresentar como promissora, existe certa inconsistência das respostas à inoculação, que normalmente está relacionada às interações com a biota do solo que é complexa e à qualidade dos inoculantes à base de BPCV encontrados no mercado. O que torna importante maiores estudos que visem conhecer melhor a interação entre gramíneas e esses micro-organismos e, assim, selecionar àquelas espécies realmente eficazes para um futuro uso biotecnológico.

2.4 Bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas ao sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench)

No Brasil o sorgo tem sido amplamente cultivado na segunda safra, isto é, em sucessão a culturas de verão (COELHO et al., 2002). Nesse sistema de cultivo, como as condições climáticas são adversas, há menor investimento devido ao maior risco. Isso faz com que a presença de BPCV que atuam por meio de diversos mecanismos, tais como Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), capacidade de Solubilizar Fosfato inorgânico (SFI) e a produção de Ácido-Indol-Acético (AIA) possa ser alternativa sustentável para redução de custos sem afetar a produção final.

Para a cultura do sorgo os estudos envolvendo BPCV ainda são escassos. Entretanto, algumas pesquisas têm demonstrado a presença dessas bactérias vivendo tanto na rizosfera quanto de forma endofítica associadas com as plantas, podemos citar: *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Burkholderia* (COELHO et al., 2008, 2009; JAMES et al., 1997; MAREQUE et al., 2015; MOREIRA et al., 2013; ZINNIEL et al., 2002).

Dentre as BPCV descritas na literatura em associação com plantas de sorgo, algumas apresentam resultados promissores quanto a contribuição de

nitrogênio para as plantas via FBN. *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum* e *Azotobacter* sp. são alguns exemplos de bactérias promotoras de crescimento encontradas em associação com plantas de sorgo que podem aumentar a produtividade das plantas através da fixação de N₂ e produção de fitohormônios (BASAGLIA et al., 2003; KENNEDY et al., 1997; MAREQUE et al., 2015).

Stein e colaboradores (1997) ao realizarem a técnica de diluição isotópica com ¹⁵N para avaliar a contribuição da FBN em plantas de sorgo inoculadas com *Azoarcus* sp. observaram que 10,7% do N no caule e 2% do N na raiz eram derivados da fixação de N₂ atmosférico, demonstrando assim, que tais bactérias podem ser eficientes na realização do processo de FBN quando em associação com o sorgo.

Zinniel e colaboradores (2002) demonstraram que *Gluconacetobacter diazotrophicus* podem contribuir com a FBN na cultura. Através da diluição isotópica com ¹⁵N foi observado que plantas inoculadas obtiveram de 5 a 45% do nitrogênio através da FBN. Também foi observado que a contribuição através da inoculação foi maior aos 30 dias após a inoculação. Essa bactéria está presente na planta de forma endofítica em raízes, colmo e folhas, o que indica o potencial para uso agrônômico para o sorgo, sendo que existe uma correlação positiva entre o teor de sacarose de diferentes genótipos e a proporção de plantas colonizadas, sugerindo assim que trabalhos futuros devem ser realizados com foco em genótipos de sorgo com maiores concentrações de açúcares (YOON et al., 2016).

Dentre as bactérias fixadoras de N em associação com o sorgo, as pertencentes ao gênero *Azospirillum* são as que apresentam maiores relatos e estudos na literatura. Patil (2014) durante a realização de um estudo de campo, em que se avaliou a utilização de *Azospirillum* com material orgânico e ureia na produtividade de sorgo de inverno durante três anos, a fim de alcançar os melhores resultados com a utilização mínima de N, observou que ao aplicar 50% da dose recomendada através de uréia e 50% através de materiais orgânicos e de tratamento de sementes com *Azospirillum* produziu-se um rendimento de grãos cerca de de 32 a 66%. Enquanto isso, o aumento no rendimento de grãos quando foi aplicada 100% da dose recomendada na forma de ureia foi de 37 a 67% em comparação com a dose de 0 kg de nitrogênio por ha⁻¹. Os autores

observaram então que a inoculação de sementes com *Azospirillum* é capaz de fixar cerca de 10 a 25 kg N ha⁻¹. Kushwaha e colaboradores (2014) descrevem que 25% da fertilização nitrogenada para o sorgo pode ser reduzida através da inoculação com *Azospirillum*.

Em relação à solubilização de fosfato inorgânico alguns gêneros dessas bactérias como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Micrococcus* tem sido relatado em associação com plantas de sorgo (CHANDRASEKERAN; MAHALINGAM, 2014). A Inoculação com essas bactérias tem demonstrado um aumento na material seca de caule e raiz (SRINIVASAN et al., 2011). De acordo com Alagawadi e Gaur (1992) a inoculação de plantas de sorgo com bacterias solubilizadoras de fosfato levam a um incremento na produção final.

Outra característica importante dessas bactérias encontradas em associação com o sorgo e outras gramíneas é a produção de diversas substâncias que são responsáveis pela promoção do crescimento vegetal, principalmente fitohormônios tais como auxinas, giberelinas e citocininas (RUPAEDAH et al., 2014; SRINIVASAN et al., 2011). Plantas de sorgo em condições de estresse hídrico possuem um melhor desenvolvimento quando inoculadas com BPCV em relação àquelas não inoculadas (SARIG et al., 1988). A inoculação tem um efeito na massa do colmo (60%), acúmulo de biomassa (17 – 24%) e número de grãos por panícula (17 – 24%), sendo que o número de grãos por panícula é considerado o fator mais afetado pelo estresse hídrico. O teor de N também foi maior em plantas inoculadas. As plantas inoculadas tiveram uma maior área foliar, assim, cresceram melhor mantendo constante sua evapotranspiração e atividade estomática, enquanto que em plantas não inoculadas ambos foram reduzidos. Esses resultados podem ser devidos ao fato de que além, dessas bactérias promoverem ganhos através da FBN, também promovem aumento da superfície de absorção das raízes, o que resulta em maior volume de substrato do solo explorado devido a modificação da morfologia do sistema radicular e aumento do número de radículas, o que estaria relacionado com a produção por esses micro-organismos de fitohormônios tais como o ácido-indol-acético (AIA) (OKON; VANDERLEYDEN, 1997).

Esses resultados demonstram a capacidade de BPCV atuarem como promotores do crescimento vegetal em plantas de sorgo por meio de diferentes

mecanismos, e não somente da FBN. Entretanto, apesar de algumas bactérias se mostrarem promissoras, esse tipo de associação é complexa e, assim, algumas características devem ser levadas em consideração para que estudos futuros possam ser aprofundados. No caso do sorgo, que é cultivado em ambientes e épocas limitantes, a promoção do crescimento vegetal através de micro-organismos torna-se ainda mais importante para reduzir os riscos do investimento. Porém, apesar de ser bem documentada em associações com outras gramíneas, são poucos os relatos na literatura da associação entre BPCV e plantas de sorgo, assim, há necessidade de maiores estudos que abordem essa associação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Departamentos de Fitotecnia e de Microbiologia Agrícola, laboratórios de sorgo, associações micorrízicas e genética de micro-organismos, pertencentes à Universidade Federal de Viçosa (UFV).

A seguir é apresentado o fluxograma com as etapas de execução da pesquisa (Figura 1).

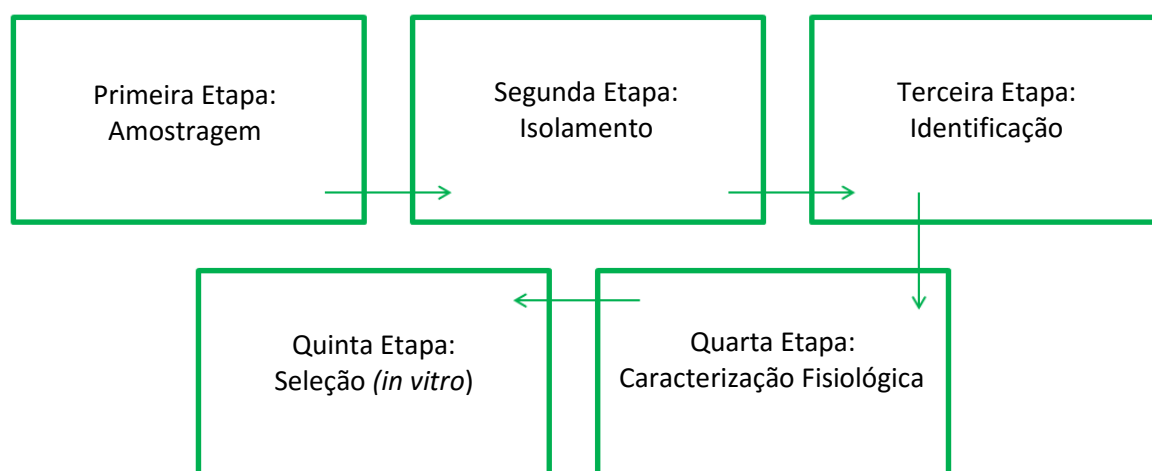


Figura 1 – Fluxograma com as etapas de execução da pesquisa desde a amostragem de plantas de sorgo pertencentes aos grupos biomassa e forrageiro, até a seleção dos isolados *in vitro* considerados promissores.

3.1 Local e Amostragem

Foram coletadas raízes de seis plantas de sorgo pertencentes a cada um dos grupos biomassa e forrageiro, cultivadas no Campo Experimental “Diogo

Alves de Mello" (lat 20° 45' 14" S, long 42° 52' 55" O e alt 648 m), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil.

O solo do local é classificado, conforme Embrapa (2011), como Argissolo Vermelho Amarelo distrófico, de textura argilosa. Os resultados da análise química do solo referentes à camada de 0 a 20 cm de profundidade apresentaram as seguintes características: pH (H₂O) = 5,87; P = 14,7 mg dm⁻³; K = 45 mg dm⁻³; Ca²⁺ = 3,44 cmol_c dm⁻³; Mg²⁺ = 1,25 mg dm⁻³; Al³⁺ = 0,0 cmol_c dm⁻³; H + Al = 3,6 cmol_c dm⁻³; SB = 4,81 cmol_c dm⁻³; CTC(t) = 4,81 cmol_c dm⁻³; CTC (T) = 8,41 cmol_c dm⁻³, V = 57,2% e MO = 2,79 dag kg⁻¹.

A coleta foi realizada em pontos aleatórios aos 30 dias após o plantio, antes de ser realizada a adubação de cobertura, e as raízes coletadas foram armazenadas em gelo durante o transporte, em seguida colocadas em geladeira por 48 horas e utilizadas para o isolamento de bactérias endofíticas promotoras de crescimento vegetal.

3.2 Isolamento

Para a desinfestação das raízes, foi utilizado o método com hipoclorito de sódio (ARAÚJO et al., 2001; PEREIRA et al., 1993), que consiste em lavar as raízes em água corrente, retirar 1 g, retirar o excesso de água e desinfestar superficialmente, com as seguintes etapas: imersão das raízes por 1:30 min. em álcool 70%, 4 min. em hipoclorito de sódio 2,5%, 30 seg. em álcool 70% e lavar duas vezes em água destilada esterilizada por 2 min. Após essa etapa as raízes desinfestadas foram trituradas em 9 mL de solução salina (8,5 g L⁻¹ de NaCl), sendo essa a diluição 10⁻¹, e mantidas em repouso por 1 h, então, foram realizadas as diluições 10⁻² e 10⁻³. De cada uma das diluições, alíquotas de 100 µL foram inoculadas em triplicata, em placas de Petri contendo 20 mL dos meios sólidos JNFb e NFb (DÖBEREINER et al., 1992). As placas inoculadas foram incubadas a 28 °C até o aparecimento de crescimento microbiano.

3.3 Identificação

3.3.1 Purificação de bactérias

Para a obtenção de cultura pura, foi realizada a transferência das culturas para os meios sólidos, JNFb e NFb (DÖBEREINER et al., 1992), mantendo-se o

sistema a 28 °C por 5 dias para a visualização das colônias. As diferentes colônias obtidas foram riscadas em placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Após a obtenção das culturas puras, as bactérias foram transferidas para o meio líquido NBY com glicerol e armazenadas a -80 °C para preservação.

3.3.2 Extração de DNA

O protocolo de extração térmica foi adaptado de ROWLANDS et al. (2006). Cada colônia foi transferida para um micro tubo com 1 mL de água ultrapura (Milli-Q) e levada ao banho fervente por 5 min e em seguida ao banho de gelo por mais 5 min. Depois centrifugado à 10.000 rpm por 5 min. Ao final deste processo foram retirados 600 µL do sobrenadante e descartado o precipitado.

3.3.3 Amplificação do gene 16S rDNA e sequenciamento

Após a extração do DNA de cada isolado o sequenciamento foi realizado a partir da amplificação do gene 16S rDNA bacteriano. Para a amplificação do gene os iniciadores utilizados foram o 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT) (LANE,1991). A reação de PCR consistiu em 20 ng de DNA total, 0,2 µM de cada iniciador, 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,5 mg mL⁻¹ de BSA e 1,25 U de GO Taq DNA polimerase em um volume final de 50 µL. Na reação com os iniciadores 27F/1492R foram usadas as seguintes condições de tempo e temperatura: 1 ciclo 95 °C por 5 mins; 40 ciclos de 95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min e 72 °C por 2 min; e, finalmente, 1 ciclo de 72 °C por 7 min. A quantificação e visualização do produto de PCR 16S rDNA foi realizada em gel de agarose a 1,5 % juntamente com um marcador de 1500 pb.

O sequenciamento das amostras amplificadas foi realizado utilizando-se o método de Sanger. As sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com sequências depositadas no banco de dados GenBank acessado pelo site do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3.4 Caracterização Fisiológica

3.4.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

Para a detecção da fixação biológica de nitrogênio foram utilizados tubos de cultura contendo 10 mL do meio NFb semissólido, sem nitrogênio. As bactérias inoculadas foram incubadas a 28 °C por 72 horas. Após este período foi observado a formação de película de crescimento que indica a capacidade de fixar nitrogênio (BODDEY et al., 1995). O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições por tratamento.

3.4.2 Solubilização de Fosfato Inorgânico

Os isolados foram inoculados em meio de fosfato insolúvel na forma de $\text{Ca}_3(\text{HPO}_4)_2$ e avaliados por um período de 15 dias. O índice de solubilização (IS) foi calculado seguindo a metodologia proposta por Berraquero et al. (1976), por meio da *fórmula*: $\text{IS} = \text{diâmetro halo (mm)} / \text{diâmetro da colônia (mm)}$. Os isolados foram classificados como precoces, cujo início da solubilização se dá até o terceiro dia e, tardios, com início da solubilização após o terceiro dia (HARA; OLIVEIRA, 2005). O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições por tratamento em esquema fatorial 24x2, sendo: 24 isolados e 2 épocas de avaliação.

3.4.3 Produção de Ácido indol-acético (AIA)

Para a quantificação de AIA, as bactérias foram cultivadas em meio líquido TSA 10 % contendo L-triptofano (5 mM), e incubadas no escuro a 28 °C por 24 h. sob agitação constante de 120 rpm. Após este período de incubação, realizou-se centrifugação por 6 min a 10.000 rpm e 900 µL do sobrenadante foram coletados e colocados em cubetas adicionando-se 400 µL do Reagente de Salkowski (BRIC et al., 1991), as amostras ficaram incubadas por 30 min em temperatura ambiente. Após este período foram realizadas leituras no espectrofotômetro com comprimento de onda de 520 nm. As leituras foram normalizadas através da curva padrão obtidas por meio de diferentes concentrações de AIA comercial (Figura 2). O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições por tratamento.

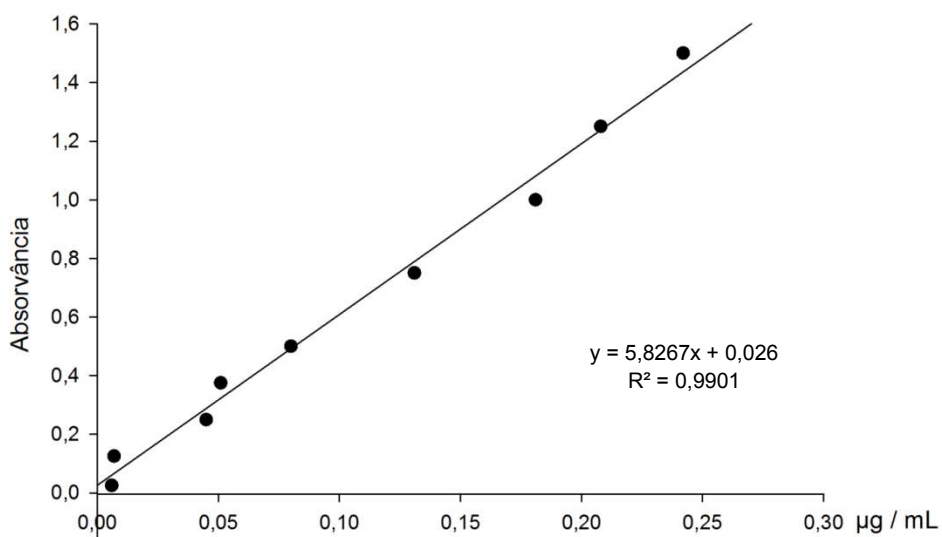


Figura 2 – Curva padrão utilizada para determinação da concentração de AIA (μ / mL).

3.5 Seleção (*in vitro*)

A seleção dos isolados considerados promissores foi realizada de acordo com os resultados obtidos nos testes de caracterização fisiológica *in vitro* (SFI, AIA e FBN). Sendo que foram selecionados para posterior inoculação em plantas de sorgo aqueles isolados positivos para FBN e os que apresentaram os melhores resultados para os testes de SFI e produção de AIA.

3.6 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à ANOVA seguido de teste de Tukey para comparação de médias ($p < 0,01$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação

Foram obtidos 24 isolados associados às raízes de plantas de sorgo, sendo 17 provenientes do sorgo biomassa (SB) e 7 do sorgo forrageiro (SF) (Tabela 1).

Tabela 1 – Isolados de bactérias obtidos das raízes de plantas dos grupos de sorgo biomassa e forrageiro.

Grupo	Identificação
Sorgo Biomassa	SB1, SB2, SB3, SB4, SB5, SB6, SB7, SB8, SB9, SB12, SB13, SB14, SB16, SB17, SB18, SB19, SB20
Sorgo Forrageiro	SF1, SF2, SF4, SF6, SF8, SF10, SF11

Após a amplificação e o sequenciamento do gene 16S foram identificados através do BLAST, com base no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), doze gêneros associados às raízes de plantas de sorgo biomassa e forrageiro (Tabela 2). Todos os isolados são pertencentes ao domínio bactérias, sendo o gênero *Streptomyces* pertencente ao filo actinobacteria.

Foram observadas diferenças na quantidade e entre os micro-organismos cultiváveis que colonizam as raízes dos grupos biomassa e forrageiro. No grupo biomassa foram encontradas bactérias pertencentes aos gêneros *Burkholderia*; *Rhizobium*; *Paenibacillus*; *Streptomyces*; *Virgibacillus* e *Microbacterium*; enquanto que para o grupo forrageiro foi encontrado os gêneros *Burkholderia*; *Curtobacterium*; *Sphingomonas*; *Mesorhizobium* e *Terriglobus*. Essa variação também é observada no isolamento de bactérias endofíticas de diferentes cultivares de arroz (KNAUTH et al., 2005; KUSS et al., 2007).

Tabela 2 – Identificação, dos isolados de bactérias, com base na amplificação do gene 16S rDNA dos isolados bacterianos obtidos das raízes de plantas dos grupos de sorgo biomassa e forrageiro.

Isolado	Identificação	*e-value	Similaridade (%)
SB1	<i>Burkholderia</i> sp.	0,0	99,90
SB2	<i>Streptomyces</i> sp.	0,0	99,40
SB3	<i>Burkholderia</i> sp.	0,0	99,90
SB4	<i>Rhizobium</i> sp.	0,0	99,70
SB5	<i>Rhizobium</i> sp.	0,0	99,80
SB6	<i>Paenibacillus</i> sp.	0,0	99,80
SB7	<i>Streptomyces</i> sp.	0,0	99,90
SB8	<i>Streptomyces</i> sp.	0,0	99,70
SB9	<i>Streptomyces</i> sp.	0,0	99,00
SB12	<i>Streptomyces</i> sp.	0,0	81,30
SB13	<i>Virgibacillus</i> sp.	0,0	99,90
SB14	<i>Microbacterium</i> sp.	0,0	96,20
SB16	<i>Microbacterium</i> sp.	0,0	99,60
SB17	<i>Microbacterium</i> sp.	0,0	99,90
SB18	<i>Rhizobium</i> sp.	0,0	100,00
SB19	<i>Microbacterium</i> sp.	0,0	99,80
SB20	<i>Roseomonas</i> sp.	0,0	100,00
SF1	<i>Burkholderia</i> sp.	0,0	99,60
SF2	<i>Curtobacterium</i> sp.	0,0	100,00
SF4	<i>Sphingomonas</i> sp.	0,0	99,70
SF6	<i>Rhizobium</i> sp.	0,0	99,90
SF8	<i>Mesorhizobium</i> sp.	0,0	99,90
SF10	<i>Rhizobium</i> sp.	0,0	99,70
SF11	<i>Terriglobus</i> sp.	0,0	99,70

* e-value - medida que considera a probabilidade de o alinhamento ter ocorrido por acaso.

Para plantas de sorgo a cultivar pode influenciar a densidade e diversidade da população microbiana associada (COELHO et al., 2009). Yoon e colaboradores (2016) demonstraram que há estreita relação entre planta e bactéria, sendo que ocorrem diferenças na densidade da população a depender do genótipo do sorgo. No caso da fixação biológica de nitrogênio, por exemplo, também pode haver diferentes graus de atividade da enzima nitrogenase de uma bactéria quando essa é inoculada em diferentes genótipos de sorgo (BODDEY et al., 1991). Essa relação entre planta e bactéria que pode acarretar diferentes respostas a depender do genótipo da planta foi igualmente observado em diferentes genótipos de trigo com *Azospirillum* (MILLET et al., 1984). O que pode estar relacionado aos diferentes compostos que são produzidos pelas plantas e

excretados pelas raízes, que influencia no ambiente da rizosfera (área do solo que sofre influência das raízes), e recrutamento de diferentes espécies microbianas (KOWALCHUK et al., 2002; WIELAND et al., 2001). Devido a essa diferença de compostos que são excretados pelas plantas existe então uma diferença na densidade e diversidade da microbiota da rizosfera que é refletida no ambiente do interior do tecido das raízes colonizado por micro-organismos endofíticos (BENIZRI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; VALÉ et al., 2005).

Esses gêneros têm sido relatados em associação com plantas de sorgo e outras gramíneas, tais como milho e cana-de-açúcar, tanto na rizosfera quanto de forma endofítica (COELHO et al., 2008, 2009). Sendo que os gêneros *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Streptomyces* são relatados como promissores promotores de crescimento vegetal quando em associações com gramíneas (GOPALASKRISHNAN et al., 2013; LUVIZOTTO et al., 2010).

O gênero *Burkholderia* tem sido relatado em associação com uma vasta gama de espécies vegetais, incluindo as gramíneas (PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2013; SANTI et al., 2013). Devido a sua versatilidade genética e fisiológica apresenta elevado potencial para a promoção do crescimento vegetal (LUVIZOTTO et al., 2010; PERIN et al., 2006). Luvizotto e colaboradores (2010) demonstraram que cepas de *Burkholderia* spp. isoladas da rizosfera de cana-de-açúcar possuem eficientes mecanismos de promoção de crescimento vegetal tais como a solubilização de fosfatos, produção de ácido indol-acético (AIA) e inibição de agentes patogênicos. O gênero também é considerado um eficiente fixador de nitrogênio quando em associação com gramíneas (ELLIOTT et al., 2006; SANTI et al., 2013), o que demonstra potencial para futuro uso biotecnológico.

Bem documentado em plantas leguminosas, por serem excelentes fixadores de nitrogênio, o gênero *Rhizobium* também está presente em associações com gramíneas (COELHO et al., 2008, 2009). Acredita-se que em plantas não leguminosas a principal contribuição de bactérias pertencentes a esses gêneros para a promoção do crescimento vegetal é através da produção de fitohormônios, principalmente auxinas, como o ácido indol-acético (AIA). A síntese de AIA promove o crescimento das raízes e a proliferação de pêlos radiculares que aumentam o volume de solo explorado e, conseqüentemente, a

absorção de água e nutrientes, favorecendo o desenvolvimento da planta (OKON; VANDERLEYDEN, 1997). Esses micro-organismos também são considerados eficientes solubilizadores de fosfato inorgânico já que são capazes de liberar diversos ácidos orgânicos que diminuem o pH da rizosfera e dissociam formas de fosfato como P-Ca (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

O gênero *Streptomyces* pertencente às actinobacterias tem sido relacionado ao controle de doenças de plantas relacionadas a diversos patógenos oriundos do solo, atuando por diferentes mecanismos como a promoção de crescimento, competição, antibiose e produção de sideróforos e enzimas extracelulares (JOG et al., 2014; RAMAMOORTHY et al., 2001). Gopalaskrishnan e colaboradores (2013) ao inocular 5 estirpes de *Streptomyces* em plantas de sorgo sob condições de casa de vegetação observaram um efeito positivo no crescimento e desenvolvimento das plantas o que atribuiu à produção de AIA e sideróforos por essas estirpes.

Os demais gêneros também têm sido isolados e descritos como promotores de crescimento em plantas gramíneas, porém com menos frequência.

4.2 Fixação biológica de nitrogênio

Dos 24 isolados obtidos 6 foram positivos para o teste de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (Tabela 5) representado pela formação de película de crescimento que indica a capacidade de fixar nitrogênio e alteração do pH do meio (cor azul). (Figura 6).

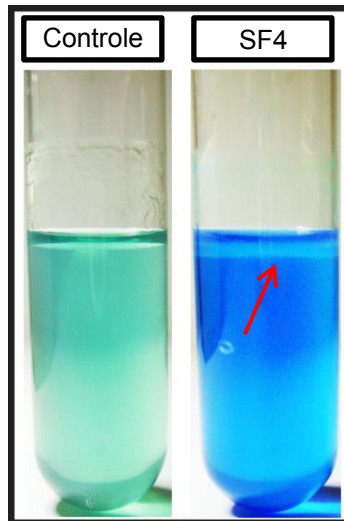


Figura 3- Isolado SF4 inoculado em meio NFb semissólido, sem nitrogênio e . As incubada a 28 °C por 72 horas. Película de crescimento indica capacidade de fixar nitrogênio.

Tabela 3 – Isolados de bactérias dos grupos de sorgo biomassa e forrageiro classificados em positivos (+) ou negativos (-) para o teste de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).

Isolado	Identificação	FBN
SB1	<i>Burkholderia</i> sp.	+
SB2	<i>Streptomyces</i> sp.	-
SB3	<i>Burkholderia</i> sp.	-
SB4	<i>Rhizobium</i> sp.	-
SB5	<i>Rhizobium</i> sp.	+
SB6	<i>Paenibacillus</i> sp.	-
SB7	<i>Streptomyces</i> sp.	-
SB8	<i>Streptomyces</i> sp.	-
SB9	<i>Streptomyces</i> sp.	-
SB12	<i>Streptomyces</i> sp.	-
SB13	<i>Virgibacillus</i> sp.	-
SB14	<i>Microbacterium</i> sp.	-
SB16	<i>Microbacterium</i> sp.	-
SB17	<i>Microbacterium</i> sp.	-
SB18	<i>Rhizobium</i> sp.	-
SB19	<i>Microbacterium</i> sp.	-
SB20	<i>Roseomonas</i> sp.	-
SF1	<i>Burkholderia</i> sp.	+
SF2	<i>Curtobacterium</i> sp.	-
SF4	<i>Sphingomonas</i> sp.	+
SF6	<i>Agrobacterium</i> sp.	+
SF8	<i>Mesorhizobium</i> sp.	-
SF10	<i>Rhizobium</i> sp.	-
SF11	<i>Terriglobus</i> sp.	+

Os 6 isolados (SB1, SB5, SF1, SF4, SF6 e SF10) positivos para o teste de FBN são pertencentes aos gêneros: *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Sphingomonas*. Esses gêneros têm sido relatados na literatura como fixadores de nitrogênio quando em associação com plantas não leguminosas (SANTI et al., 2013; COCKING, 2003; RODRIGUES et al., 2006, VIDEIRA et al., 2009). Também há relatos da presença desses-microrganismos em associação com plantas de sorgo, colonizando tanto a rizosfera como o interior dos tecidos vegetais (COELHO et al., 2008, 2009; JAMES et al., 1997; MAREQUE et al., 2015; MOREIRA et al., 2013; ZINNIEL et al., 2002).

Estudos tem demonstrado a contribuição dessas bactérias para a obtenção de nitrogênio via a fixação biológica (TALUÉ et al., 2012). Apesar de bactérias endofíticas contribuírem de forma mais efetiva para a FBN, uma vez que a troca de nutrientes ocorre de forma direta e existe menor competição por fontes de carbono, a eficiência do processo em associação com gramíneas é menor (BALDANI et al., 1997).

Para gramíneas o gênero melhor estudado e que possui maior contribuição para fixação biológica de nitrogênio é o *Azospirillum*, sua presença também já foi documentada em plantas de sorgo, porém no presente trabalho bactérias pertencentes ao gênero não foram isoladas. O que pode ser explicado pela estreita relação entre planta e bactéria que possui influencia na diversidade da população a depender do genótipo do sorgo (COELHO et al., 2009).

4.3 Solubilização de Fosfato inorgânico

As BPCV desempenham importante papel na disponibilização de formas inorgânicas de fosfatos, que leva ao aumento do teor P na solução do solo e, assim, a maior aproveitamento do nutriente e rendimento das culturas.

Dos 24 isolados obtidos 16 foram positivos para o teste de solubilização de fosfato inorgânico representado pela formação do halo (área translúcida) de solubilização ao redor das colônias (Figura 3), sendo que 10 foram classificados como precoce e 6 tardios em relação ao tempo de aparição do halo de solubilização (Tabela 3).

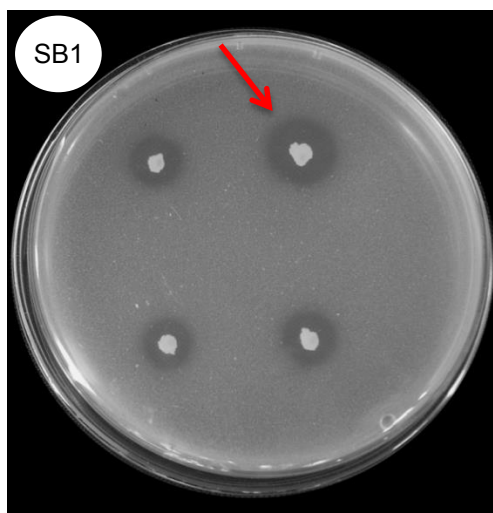


Figura 4 – Halo (área translúcida) de solubilização ao redor das colônias.

Tabela 4 – Classificação dos isolados em precoce ou tardio de acordo com o tempo de aparecimento do halo de solubilização.

Isolado	Início da Solubilização (dias)	Classificação
SB1	2	Precoce
SB2	2	Precoce
SB4	2	Precoce
SB5	2	Precoce
SB7	2	Precoce
SB8	2	Precoce
SB12	3	Precoce
SF1	1	Precoce
SF8	2	Precoce
SF10	3	Precoce
SB13	5	Tardio
SB14	5	Tardio
SB16	5	Tardio
SB19	5	Tardio
SF2	5	Tardio
SF4	5	Tardio

Os isolados de bactérias foram classificados como precoces, cujo início da solubilização se dá até o terceiro dia e, tardios, com início da solubilização após o terceiro dia de inoculação.

O tempo de aparição de halo de solubilização variou entre 1 e 5 dias após a inoculação dos isolados em meio contendo CaHPO_4 . Chandrasekeran e Mahalingam (2014) encontraram resultados semelhantes que variam entre 24 e 48 h para o aparecimento do halo de solubilização de isolados provenientes de plantas de sorgo.

Os IS variaram entre os diferentes micro-organismos, dos quais os isolados SB1 e SF1 (*Burkholderia*) se destacaram dos demais por apresentarem elevado IS tanto inicial quanto final (Tabela 4). Sendo que o tempo de incubação tem influência sobre a solubilização, assim, os isolados SB1 e SF1 além de serem considerados precoces mantiveram o elevado índice de solubilização até o décimo quinto dia de avaliação, o que pode ser importante para que o fosforo solubilizado esteja disponível após o esgotamento da reserva da semente.

Também foi observado que alguns isolados possuem o IS inicial maior que o final, o que pode ser devido ao fato desses micro-organismos solubilizarem apenas o necessário para suprir a demanda de seu metabolismo e cessar então a solubilização do fosfato visando diminuir o gasto energético.

Tabela 5 – Índice de solubilização (IS) inicial e final dos isolados obtidos das raízes de sorgo pertencentes aos grupos biomassa (SB) e forrageiro (SF).

Isolado	IS (Inicial)	IS (Final)
SB1	2,20 (± 0,36) abcB	6,10 (± 0,86) aA
SB2	1,45 (± 0,10) cB	3,04 (± 0,38) bA
SB4	1,55 (± 0,08) bcA	2,07 (± 0,11) cA
SB5	1,58 (± 0,09) bcA	2,10 (± 0,06) cA
SB7	1,40 (± 0,10) cB	3,12 (± 0,21) bA
SB8	1,49 (± 0,05) bcB	2,04 (± 0,21) cA
SB12	1,44 (± 0,09) cA	1,63 (± 0,04) cA
SB13	2,31 (± 0,94) abA	1,92 (± 0,64) cB
SB14	2,33 (± 0,21) abA	1,97 (± 0,04) cA
SB16	1,52 (± 0,26) bcA	1,95 (± 0,24) cA
SB19	2,03 (± 0,11) abcA	1,81 (± 0,12) cA
SF1	2,53 (± 0,23) aA	5,30 (± 0,42) aA
SF2	1,42 (± 0,11) cA	1,66 (± 0,22) cA
SF4	1,73 (± 0,11) abcA	1,52 (± 0,08) cA
SF8	1,81 (± 0,27) abcA	1,81 (± 0,11) cA
SF10	1,63 (± 0,05) bcA	1,53 (± 0,08) cA

IS = diâmetro halo (mm) / diâmetro da colônia (mm). Médias seguidas de mesma letra (minúsculas para coluna e maiúsculas para linha) não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

O resultado obtido nesse trabalho corrobora com os resultados de Gomes *et al.* (2014) que, ao testarem 18 isolados entre fungos e bactérias quanto à solubilização de fosfato, observaram maiores taxas de solubilização para os isolados CMSB58, CMSB48 e CMSB82, também pertencentes ao gênero *Burkholderia*. Diversos autores relatam que bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* são eficientes promotora de crescimento atuando na solubilização

de diversas fontes de fosfato, sendo que o principal mecanismo de solubilização de fosfato observado *in vitro* é através da diminuição do pH do meio devido a liberação de ácidos orgânicos, principalmente o ácido glucônico (SONG et al., 2008). De acordo com CHUANG et al. (2007) o ácido glucônico é um dos principais ácidos orgânicos envolvidos na solubilização de fosfato de cálcio.

Os isolados SB2 e SB7 (*Streptomyces*), IS 3,04 e 3,12 respectivamente, apesar de serem inferiores aos Isolados SB1 e SF1 apresentaram um IS superior aos demais. Alguns trabalhos na literatura mostram que o gênero *Streptomyces* é considerado um bom solubilizador de fosfato (JOG et al., 2014; MOLLA et al., 1984). Sousa et al. (2009) ao inocular e incubar substrato orgânico com isolados de *Streptomyces* observaram que esses promovem maior crescimento de mudas de tomateiro, o crescimento das mudas pode estar associado à produção de substâncias reguladoras de crescimento e aos processos de mineralização e solubilização de nutrientes, uma vez que também foi observado pelos autores a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato. Assim como para *Burkholdria* a solubilização de fosfato por *Streptomyces* também é caracterizada pela liberação de ácidos orgânicos e diminuição do pH do meio, sendo o ácido gluconico um dos principais responsáveis pela solubilização de diversas fontes de fosfato (FARTHAT et al., 2015).

Chandrasekeran e Mahalingam (2014) relatam que isolados solubilizadores de fosfato provenientes da rizosfera de plantas de sorgo possuem valores de IS parecidos com os encontrados no presente trabalho, variando entre 1,23 e 1,75. Em bactérias isoladas de cana-de-açúcar o IS varia entre 1,21 a 3,48 (SANTOS et al., 2012). Já para bactérias isoladas de plantas de milho variaram entre 4,48 e 4,88 (PANDE et al., 2017). Islam et al. (2007) ao testar 17 isolados da rizosfera de arroz obtiveram resultados ente 1,2 e 6,7. Os isolados SB1 e SF1, cujo IS foi de 6,19 e 5,30, foram superiores à maioria dos isolados obtido pelos autores supracitados, o que demonstra potencial para a promoção de crescimento de plantas.

4.4 Produção de ácido indol-acético (AIA)

O ácido indol acético (AIA) é um fitohormônio da classe das auxinas que promove o alongamento celular diferencial e funciona como regulador de

crescimento. Essa auxina é sintetizada no meristema apical das plantas, podendo também ser produzida por bactérias em associação com vegetais e sua principal via de produção é através do aminoácido triptofano (PRISEN et al., 1993).

Dos 24 isolados testados 14 apresentaram a capacidade de produzir Ácido Indol-acético *in vitro* após 24 horas de incubação, sendo identificadas por meio de reação colorimétrica com o reagente de Salkowski, que promoveu o aparecimento de cor vermelha variando de intensidade de acordo com as concentrações de AIA presentes no meio (figura 4).



Figura 5 – Reação colorimétrica com o reagente de Salkowski, que promove o aparecimento de cor vermelha na presença de Ácido indol-acético (AIA).

A concentração de AIA variou entre 0,19 (SB14) e 5,20 (SF4) gmL^{-1} (Figura 5).

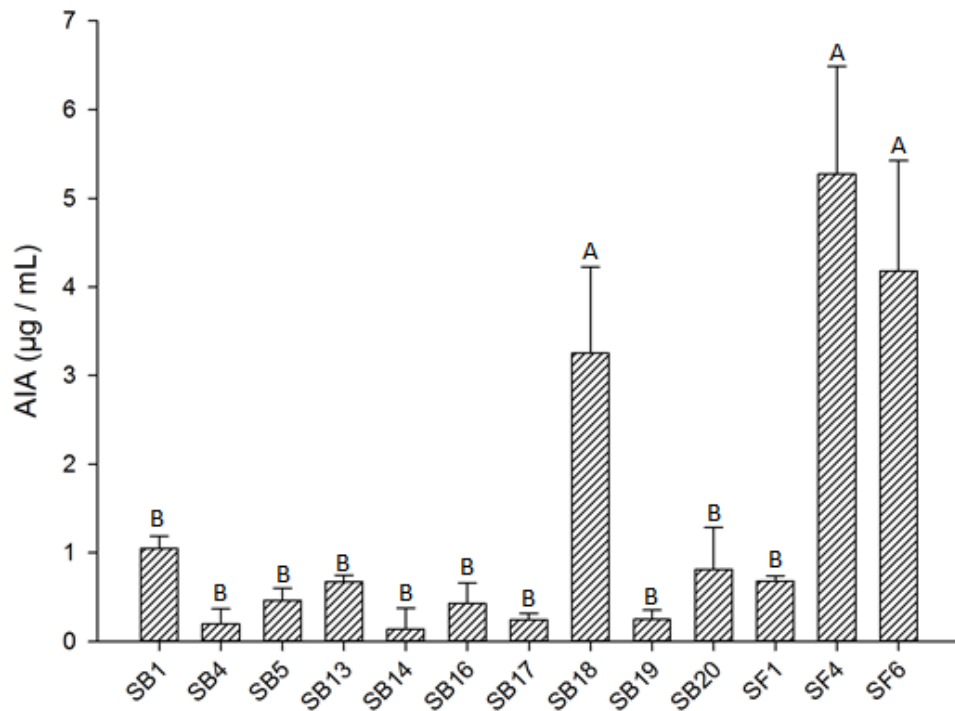


Figura 6 – Concentração de AIA em $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos isolados SB1, SB4, SB5, SB13, SB14, SB16, SB17, SB18, SB19, SB20, SF1, SF4 e SF6. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Os isolados SF4 (*Sphingomonas*), SF6 (*Rhizobium*) e SB18 (*Rhizobium*) destacaram-se por apresentarem uma maior produção de AIA em comparação com os demais isolados. Pedrinho *et al.* (2010) relatam valores parecidos para produção de AIA na presença de triptofano por rizobactérias isoladas de plantas de milho, os valores para os 27 isolados testados variaram entre 1,23 e 14,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nas primeiras 24 horas da avaliação, sendo que o isolado R4.1 pertencente ao gênero *Sphingomonas* apresentou uma produção de 7,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$, esse valor é próximo ao encontrado no presente trabalho, 5,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o isolado SF4 também pertencente a este gênero. Isolados provenientes de raízes de plantas de arroz irrigado também apresentaram resultados semelhantes, entre 2,49 a 13,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ após 72 horas de crescimento (KUSS *et al.*, 2007). Bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* também são consideradas boas produtoras de AIA (Schindwen *et al.*, 2008).

Os valores obtidos no presente trabalho estão abaixo do relatado por outros autores, o que pode ter ocorrido devido ao tempo de avaliação do experimento de 24 h. Porém a aparente baixa produção de AIA *in vitro* por microorganismos pode ser algo benéfico para a planta, uma vez que elevadas concentrações do fitohormônio pode ter efeito contrário ao esperado e ocasionar

toxidez, que em alguns casos pode chegar à inibição completa do crescimento das raízes (FETT NETO et al., 1992; GRATTAPAGLIA; SALISBURY; ROOS 1991). Essa toxicidade pode ser explicada pelo efeito que as auxinas possuem no estímulo à produção de etileno, o principal hormônio inibidor do crescimento das raízes (BERTELL; ELIASSON, 1992; CARY et al., 1995; STENLID, 1982). Schindwen e colaboradores (2008) observaram que os isolados TV-13 (*Rhizobium*) possuíam uma produção de 171,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, sendo essa concentração prejudicial para plântulas de alface. Os mesmos autores também observaram que isolados de *Bradyrhizobium* sp. que possuem uma produção menor, entre 1,2 e 3,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valores parecidos com os encontrados no presente trabalho, aumentaram o vigor das plântulas em comparação com o tratamento sem inoculação.

4.5 Solubilização de Fosfato Inorgânico, Produção de Ácido Indol-Acético, Fixação Biológica de Nitrogênio e Seleção (*in vitro*)

No presente trabalho dos 24 isolados 4 apresentaram os 3 mecanismos de promoção de crescimento testados *in vitro*, 6 apresentaram 2 mecanismos, 10 apresentaram pelo menos 1 mecanismo e 4 não apresentaram nas condições testadas neste trabalho, *in vitro*, os mecanismos de promoção de crescimento estudados (Tabela 6 e Figura 7).

Bactérias promotoras de crescimento vegetal podem apresentar diferentes mecanismos de atuação (LODEWYCKX et al., 2002; STURZ et al., 2010). Há relatos na literatura de bactérias que podem ter um ou mais mecanismos de promoção de crescimento (CHAUHAN et al., 2017). Kuss e colaboradores (2007) observaram que bactérias isoladas de plantas de arroz possuem os mecanismos de promoção de crescimento associados à fixação biológica de nitrogênio e produção de Ácido indol-acético.

Tabela 6 - Isolados de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) associadas às raízes de plantas de sorgo biomassa (SB) e sorgo forrageiro (SF), quanto a capacidade de realizar, solubilização de fosfato (SFI), produção de ácido-indol-acético (AIA) e fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Isolado	Identificação	SFI	AIA	FBN
SB1	<i>Burkholderia</i> sp.	+	+	+
SB2	<i>Streptomyces</i> sp.	+	-	-
SB3	<i>Burkholderia</i> sp.	-	-	-
SB4	<i>Rhizobium</i> sp.	+	+	-
SB5	<i>Rhizobium</i> sp.	+	+	+
SB6	<i>Paenibacillus</i> sp.	-	-	-
SB7	<i>Streptomyces</i> sp.	+	-	-
SB8	<i>Streptomyces</i> sp.	+	-	-
SB9	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	-
SB12	<i>Streptomyces</i> sp.	+	-	-
SB13	<i>Virgibacillus</i> sp.	+	+	-
SB14	<i>Microbacterium</i> sp.	+	+	-
SB16	<i>Microbacterium</i> sp.	+	+	-
SB17	<i>Microbacterium</i> sp.	-	+	-
SB18	<i>Rhizobium</i> sp.	-	+	-
SB19	<i>Microbacterium</i> sp.	-	+	-
SB20	<i>Roseomonas</i> sp.	-	+	-
SF1	<i>Burkholderia</i> sp.	+	+	+
SF2	<i>Curtobacterium</i> sp.	+	-	-
SF4	<i>Sphingomonas</i> sp.	+	+	+
SF6	<i>Agrobacterium</i> sp.	-	+	+
SF8	<i>Mesorhizobium</i> sp.	+	-	-
SF10	<i>Rhizobium</i> sp.	+	-	+
SF11	<i>Terriglobus</i> sp.	-	-	-

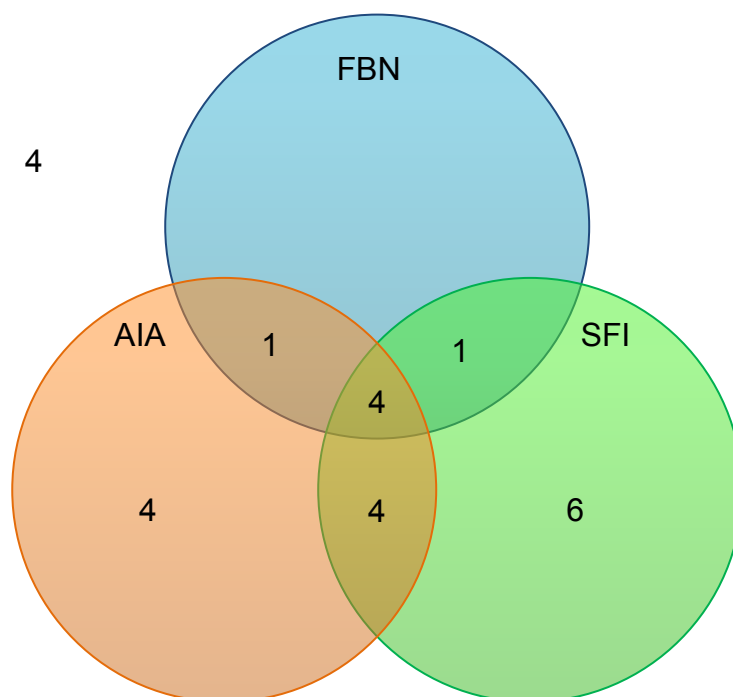


Figura 7 - Isolados de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) associadas às raízes de plantas de sorgo biomassa forrageiro quanto a capacidade de realizar Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), Solubilização de Fosfato (SFI) e Produção de Ácido-Indol-Acético (AIA).

Os resultados obtidos para os três testes mostram que as bactérias associadas às raízes de plantas de sorgo pertencentes aos grupos biomassa e forrageiro podem contribuir para a promoção de crescimento vegetal através de diferentes mecanismos, sendo que algumas bactérias possuem os três mecanismos testados, o que mostra um provável potencial para uso biotecnológico que vise a diminuição dos custos de implementação da cultura.

Ao total, foram selecionados 7 isolados, pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Sphingomonas*, considerados promissores para posterior inoculação em plantas de sorgo (Tabela 7).

Tabela 7 – Isolados de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) associadas às raízes de plantas de sorgo biomassa (SB) e sorgo forrageiro (SF), selecionados com base nos resultados obtidos nos testes de caracterização fisiológica *in vitro*.

Isolado	Identificação	Mecanismo de Promoção de Crescimento
SB1	<i>Burkholderia</i> sp.	FBN, SFI, AIA
SB5	<i>Rhizobium</i> sp	FBN, SFI, AIA
SB18	<i>Rhizobium</i> sp	AIA
SF1	<i>Burkholderia</i> sp	FBN, SFI, AIA
SF4	<i>Sphingomonas</i> sp.	FBN, SFI, AIA
SF6	<i>Rhizobium</i> sp	FBN, SFI, AIA

Esses Isolados serão utilizados para testes de inoculação em plantas de sorgo nas condições de casa de vegetação e campo.

5 CONCLUSÃO

Raízes de plantas de sorgo, dos grupos biomassa e forrageiro, se associam com bactérias endofíticas, promotoras de crescimento vegetal, capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato Inorgânico e produzir ácido indol-acético *in vitro*. Porém, são necessários estudos do efeito da inoculação dos isolados em condições de campo para comprovar a eficácia e o potencial de uso biotecnológico dessas bactérias.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALAGAWADI, A.R.; GAUR, A.C. Interaction Between *Azospirillum hirsutum* and 'Phosphate Solubilizing Bacteria' and their Influence on Yield and Nutrient Uptake of Sorghum (*Sorghum bicolor* L.). **Zentralbl. Mikrobiol**, vol. 143, p. 637-643, 1988.
- ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. New York: John Wiley & Sons, 1961, 472 p.
- ALVES, G. C.; VIDEIRA, S. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, v. 387, p.307–321, 2014.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interaction between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 229-236, 2001.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, v.62, p.45-151, 1998.
- ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H.N.; SKIADAS, I.V., ANGELOPOULOS, K.; LYBERATOS, G. Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. **Bioresource Technology**, v. 99, p.110–119. 2008
- BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v.6, p.35–46, 1986.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.911-922, 1997.
- BRASIL, M.S.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.179–190, 2005.
- BASAGLIA, M.; CASELLA, S.; PERUCH, U.; POGGIOLINI, S.; VAMERALI, T.; MOSCA, G.; VANDERLEYDEN, J.; DE TROCH, P.; NUTI, M.P.; Field release of genetically marked *Azospirillum brasilense* in association with *Sorghum bicolor* L. **Plant and Soil**, v.256 p.281–290, 2003.
- BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, p.557- 574, 2001.
- BERENJI, J.; DAHLBERG, J. Perspectives of Sorghum in Europe. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.338, p.332–338, 2004.

- BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v.17, p.399-406, 1976.
- BERTTEL, G.; ELIASSON, L. Cytokinin effects on root growth and possible interactions with ethylene and indol-3-acetic acid. **Physiologia Plantarum**, v.84 p. 225-261, 1992.
- BODDEY, R.M.; DE OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, VM.; DE OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant Soil**, v.174, p.195-209, 1995.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, v.137, p.111-117, 1991.
- BOMFETI, CA; FLORENTINO, L.A; GUIMARÃES, A.P; CARDOSO, P.C; GUERREIRO, M.C; MOREIRA, F.M.S. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.657-671, 2011.
- BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p 535-538, 1991.
- CARRY, AJ; L.I.U.E; HOWELL, S.H. Cytokinin action is coupled to ethylene in this effects on the inhibition of root and hypocotyls elongation in Arabidopsis thaliana seedlings. **Plant Physiology**, v.107, p.1075-1082, 1995.
- CHANDRASEKERAN, A.; MAHALINGAM, P.U. Isolation of Phosphate solubilizing bacteria from Sorghum bicolor rhizosphere soil inoculated with arbuscular mycorrhizae fungi (Glomus sp). **Research in Biotechnology**, v.5, p.01-05, 2014.
- CHAUHAN, A.; GULERIA, S.; BALGIR, P.P.; WALIA, A.; MAHAJANE, R.; MEHTA, P.; SHIRKOT, K.; Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.48, p.294-304, 2017.
- CHUANG, C.C.; KUO, Y.L.; CHAO, W.L. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. **Biology and Fertility of Soils**, v.43, p.575-584, 2007.
- COELHO, M.R.R.; DE VOS, M.; CARNEIRO, N.P.; MARRIEL, I.E.; PAIVA, E.; SELDIN, L. 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, p.5-22, 2008.
- COELHO, M.R.R.; MARRIEL, I.E.; JENKINS, S.N.; LANYON, C. V.; SELDIN, L; O'DONNELL, A.G. Molecular detection and quantification of nifH gene

- sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. **Applied Soil Ecology**, v.42, p.48–53, 2009.
- COELHO, A.M.; WAQUIL, J.M.; KARAM, D.; CASELA, C.R.; RIBAS, P.M. Seja Doutor do seu Sorgo. 2002.
- COKING, E.C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, v.252, p.169–175, 2003.
- CRUZ, A.C.; PEREIRA, F.S.; FIGUEIREDO, V.S. Fertilizantes organomineirais de resíduos do agronegócio: avaliação do potencial econômico Brasileiro. Indústria química | **BNDES Setorial**, v.45, p. 137-187, 2017.
- DE SALAMONE, G.I.E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p.249–256, 1996.
- DE WET, J.M.J. Systematics and Evolution of *Sorghum Sect. Sorghum* (Gramineae). **American Journal of Botany**, v.65, p.477-484, 1978.
- DICKO, M.H.; GRUPPEN, H.; TRAORÉ, A.S.; VORAGEN, A.G.J.; BERKEL WJH, V.A.N. *Sorghum* grain as human food in Africa : relevance of content of starch and amylase activities. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.384–395, 2006.
- 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. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, p. 173- 180. 1992.
- DEPEC – Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos. Bradesco. Disponível em: https://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_fertilizantes.pdf. Acesso em: 25 de nov. 2017.
- ELLIOT, G.N.; CHEN, W.M.; CHOU, J.H.; WANG, H.C.; SHEU, S.Y.; PERIN, L.; REIS, V.M.; MOULIN, L.; SIMON, M.F.; BONTEMPS, C.; SUNTHERLAND, J.M.; BESSI, R.; DE FARIA, S.M.; TRINICK, M.J.; PRESCOTT, A.R.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen *ex planta*. **New Phytologist**, v.173, p.168 –180,
- EMBRAPA Milho e Sorgo. Sorgo biomassa é ótima opção para geração de energia. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2246665/sorgo-biomassa-e-otima-opcao-para-geracao-de-energia>. Acesso em: 8 set. 2014.

- EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: Stacey G, Burris R H, Evans HJ eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, p.1-42, 1992.
- FAGUNDES, J.D.; SANTIAGO, G.; MELLO, A.M.D.E.; BELLÉ, R.A.; STRECK, N.A. Crescimento, desenvolvimento e retardamento da senescência foliar em girassol de vaso (*Helianthus annuus* L.): fontes e doses de nitrogênio. **Ciência Rural**, v.37, p.987–993, 2007.
- FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/436508/>. Acesso em: 10 de nov. 2017.
- FARHAT, M.B.; BOUKHRIS, I.; CHOUAYEKH, H. Mineral phosphate solubilization by *Streptomyces* sp. CTM396 involves the excretion of gluconic acid and is stimulated by humic acids. **FEMS Microbiology Letters**, v.362, p. 1-8, 2015.
- FETT NETO, A.G.; TEIXEIRA, S.L.; SILVA, E.A.M.; SANTNNA, R. Biochemical and morphological changes during in vitro rhizogenesis in cuttings of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. **Journal of Plant Physiology**, v.140, p.720-728, 1992.
- FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and soil**, 321, p.35-59, 2009.
- GYANESHWAR, P.; NARESH, K.G.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v.245, p.83–93, 2002.
- GOMES, E.A.; OLIVEIRA, C.B.; LANA, U.G.P.; SILVA, U.C.; MARIEL I.E. Potencial de Microorganismos para a Solubilização de Fosfato de Rocha. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. **Embrapa Milho e Sorgo**. Sete Lagoas – MG, p. 1-31, 2014.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, p.183-260, 1998.
- GOPALAKRISHAN, S.; SIRINAVAS, V.; VIDYA, M.S.; RATHORE, A. Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. **SpringerPlus**, v.2, p.1-8, 2013.
- GRUBER, N.; GALLOWAY, J.N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, v.451, p.293-296, 2008.
- HANDALI, H.; BOUIZGARNE, B.; HAFIDI, M.; LEBRIHI, A.; VIROLLE, M.J.; Ouhdouch, Y. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. **Applied Soil Ecology**, v 38, p. 12-19, 2008.

- HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características Fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.
- HARLAN, J.R. Agricultural Origins : Centers and Noncenters. **Science**, v.174, p.468-474, 1971.
- HARPER, J.E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K.J. et. al. **Physiology and determination of crop yield**. American Society of Agronomy, cap.11A, p.285-302, 1994.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Embrapa Soja; Brasília, DF: **Embrapa Cerrados**, 2001.
- HUNGRIA, M.; CAMPOS, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasiliense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, p.413-425, 2010.
- ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.389-395, 1992.
- ISLAM, M.T.; DEORA, A.; HASHIDOKO, Y.; RAHMAN, A.; ITO, T.; TAHARA, S. Isolation and Identification of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizoplane of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.62, p.103-110, 2007.
- JAMES, E.; OLIVARES, F.; BALDANI, J.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. *Moench*. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p.785-797, 1997.
- JOG, R.; PANDYA, M.; NARESSHKUMAR, G.; RAJKUMAR, S. Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. **Microbiology**, v.160, p.778-788, 2014.
- KENNEDY, I.R.; PEREG-GERK, L.L.; WOOD, C.; DEAKER, R.; GILCHRIST, K. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, v.194, p.65-79, 1997.
- Khalid, A.; Arshad, M.; Zahir, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.473-80, 2004.
- KNAUTH, S.; HUREK, T.; BRAR, D.; REINHOLD-HUREK, B. Influence of different *Oryza* cultivars on expression of nifH gene pools in roots of rice. **Environmental Microbiology**, v.7, p.1725-1733, 2005.
- KOWALCHUK, G.A.; BUMA, D.S.; DE BOER, W.; KLINKHAMER, P.G.L.; VAN VEEN, J.A. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soilborne microorganisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.81, p.509-521, 2002.

- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. & AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, p.1244-1251, 2004.
- KUSHWAHA, B.B.; THAKUR, N.S.; SAXENA, U.; SHRIVASTAVA, D.K.; KATARINA, V.P.; UPADHYAY, S.N.; CHOUDHARY, R.K. Effect of fertility levels, farmyard manure and Inoculants by sorghum. **Annals of Plant and Soil Research**, v.16, p.139–142, 2014.
- KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas, v. , p.1459–1465, 2007.
- LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, p. 115-175, 1991.
- LEIGH, G.J. Fixing nitrogen any which way. **Science**, v.79, p.506-507, 1998.
- LOBO, R.C.; COSTA, D.A.; LOPES, N.E.I.F.; OLIVA, M.A. Efeito Da Água E Do Nitrogênio Sobre a Fotossíntese , Respiração E Resistência Estomática Em Phaseolus Vulgaris. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.23, p.1371–1379, 1988.
- LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZZEAY, M.; LETIR, D.V.D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 583, 2002,
- LOPER, J. E. ; SCHROTH, M. N. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, v.76, p. 386–389, 1986.
- LUTZENBERGER, J.A. O absurdo da agricultura. **Estudos avançados**, v.15, p.61-74, 2001.
- LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A.A.C.; ARAUJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Genetic diversity and plant-growth related features of Burkholderia spp. from sugarcane roots. **World journal of microbiology & biotechnology**, v.26, p.1829-1836, 2010.
- MAREQUE, C.; TAULÉ, C.; BERACOCHEA, M.; BATTISTONI, F. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Annals of Microbiology**, v.65, p.1057–1067, 2015.
- MARIANO, R.L.M.; DA SILVEIRA, E.B.; DE ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; NASCIMENTO, A.R.P.; DONATO, V.M.T.S. 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.

- MARTINELLI L. A. Os caminhos do nitrogênio - do fertilizante ao poluente. **Informações agrônômicas**, número 118 junho de 2007.
- MICHELIS, K., VANDERLEYDEN, J.; VAN GOOL, A. Azospirillum - plant root associations: A review. **Biology and Fertility of Soils**, v.8, p.356–368, 1989.
- MILLET, E.; AVIVI, Y.; FELDMAN M. Yield response of various wheat genotypes to inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v.80, p.261–266, 1984.
- MOLLA, M.A.Z.; CHOWDHURY, A.A.; ISLAM, A.; HOQUE, S. Microbial mineralization of organic phosphate in soil. **Plant and Soil**, v.78, p.393-399, 1984.
- MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P.R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v.45, p.253–263, 2009.
- MOREIRA, F.T.A., SANTOS, D.R.; SILVA, G.H.; ALENCAR, L.S. Ocorrência de bactérias do gênero *Azospirillum* spp. associadas a gramíneas forrageiras no semiárido nordestino. **HOLOS**, v.29, p.205–212, 2013.
- NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: UFV, DPS, 1999. 399p.
- NUNES, M.A.; RAMALHO, J.D.C.; DIAS, M.A. Effect of nitrogen supply on the photosynthetic performance of leaves from coffee plants exposed to bright light. **Journal Experimental Botany**, v.44, p.893–899, 1993.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1591-1601, 1994.
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.366-370, 1997.
- OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. 2003. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Documentos 161- **Embrapa Agrobiologia**, 40p.
- PANDE, A.; PANDEY, P.; MEHRA, S.; SINGH, M.; KAUSHIK, S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.15, p.379-391, 2017.
- PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; LONHIENNE, T.G.A.; YEOH, Y.K.; WEBB, R.I.; LAKSHMANAN, P.; CHAN, C.X.; LIM, P.E.; RAGAN, M.A.; SCHIMIDT, S.; HUGENHOLTZ, P. A new species of Burkholderia isolated from sugarcane roots promotes plant growth. **Microbial Biotechnology**, v.7, p.142–154.

- PATIL, S.L. Azospirillum based integrated nutrient management for conserving soil moisture and increasing sorghum productivity. **African Journal of Agricultural Research**, v.9, p.1761–1769, 2014.
- PEDRINHO, E.A.N.; JÚNIOR, R.F.G.; CAMPANHARO, J.C.; ALVES, L.C.; LEMOS, E.G.M. Identificação e avaliação de Rizobactérias isoladas de raízes de Milho. **Bragantia**. Campinas, v.69,p.905 – 911, 2010.
- PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*. **Mycologia**, v. 85, p. 362-364, 1993.
- PERES, L.E.P.; KERBAWY, G.B. Controle hormonal do desenvolvimento das raízes. **Universa**, v.8, p.181-195, 2000.
- PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H.V.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, p.3103-3110, 2006.
- PINHO, R.G.Z.; FIORINI, I.V.A.; SANTOS, A.O. Botânica. In: Borém, A; Pimentel, LD; Parrela, RAC. **Sorgo do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, p.37-57, 2014.
- PRINSEN, E.; COSTACURTA A.; MICHIELS K.; VANDERLEYDEN J.; ONCKELEN H.V. *Azospirillum brasilense* Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis: Evidence for a Non-Tryptophan Dependent Pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.609-615, 1993.
- RAIJ, B.V. Fósforo no solo e interação com outros elementos. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S., eds. Fósforo na Agricultura Brasileira. Piracicaba, **Potafos**, p.107-115, 2004.
- RAMAMOORTHY, V.; VIWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systems resistance by plant growth promotion rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p.1-11, 2001.
- RODRIGUES, J. A. A., Sorgo: opção rentável para a safrinha. **Grão em Grão Jornal eletrônico da Embrapa Milho e Sorgo** (Sete Lagoas- MG). Ano 02. Edição 12. Mar. 2009. Disponível em:http://www.cnpms.embrapa.br/grao/12_edicao/grao_em_grao_artigo_01.htm. Acesso em: 14 set. 2014.
- RODRIGUES L.S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.275-284, 2006.
- RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, n.4-5, p.319-339, 1999.

- ROSOLEM, C.A.; FOLONI, J.S.S.; OLIVEIRA, R.H. Dinâmica do nitrogênio no solo em razão da calagem e adubação nitrogenada, com palha na superfície. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.301-309, 2003.
- RUPAEDAH, B.; ANAS, I.; SANTOSA, D.A.; SUMARYONO, W.; BUDI, S.W. Screening and Characterization of Rhizobacteria for Enhancing Growth and Chlorophyll Content of Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). **J Issaas**, v.20, p.86–97, 2014.
- SALISBURY, F.B.; ROOS, C.W. **Plant Physiology**. Wadsworth, California, v.17, p.357-378, 1991.
- SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v.111, p.743-767, 2013.
- SANTOS, J.B.; LIMA, D.R.M.; BARBOSA, J.G.; OLIVEIRA, J.T.C.; FREIRE, F.J.; KUNKLINSKY-SOBRA, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: Solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, p.142-149, 2012.
- SANTOS, R.D.; PEREIRA, L.G.R.; NEVES, A.L.A.; RODRIGUES, J.A.S.; COSTA, C.T.F.; OLIVEIRA, G.F. Agronomic characteristics of forage sorghum cultivars for silage production in the lower middle San Francisco Valley. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.35, p.13–19, 2013.
- SARIG, B.Y.S.; BLUMF, A.; OKON, Y. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **The Journal of Agricultural Science**, v.110, p.271–277, 1988.
- SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; AZAMBUJA, A.C.; GRANADA, C.E.; GABIATTI, N.C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Revista Ciencia Rural**, v.38, p.658-664, 2008.
- SCIVITTARO, W.B.; SANTOS, G.G.D.O.S.; FARIAS, D.G.D.E.; ANDRES, A.; CASTILHO, R.M.V. Doses de nitrogênio e de atrazine em cultivo de sorgo em terras baixas, v.11, p.315–321, 2005.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS, Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236p.
- SONG, O.R.; LEE, S.J.; LEE, Y.S.; LEE, S.C.; KIM, K.K.; CHOI, Y.L. solubilization of insoluble inorganic phosphate by burkholderia cepacia da23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.151-156, 2008.
- SOUCHIE, E.L.; ÁZCON, R.; BAREA, J.M.; SAGGIN JUNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R.. Solubilização de fosfatos em meio sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.40, p.1149-1152, 2005.
- SRINIVASAN, R.; ALAGAWADI, A.R.; YANDIGERI, M.S.; MEENA, K.K.; SAXENA, A.K. Characterization of phosphate-solubilizing microorganisms from

- salt-affected soils of India and their effect on growth of sorghum plants [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Annals of Microbiology**, vol. 62, p. 93–105, 2011.
- SOUSA, C.S.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S. produção de mudas de tomateiro em substrato orgânico inoculado e incubado com estreptomicetos. **Bragantia**, v. 68, p.195-203, 2009.
- SPRENT, J.I.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms. London: **Chapman and Hall**, 2 ed., 256p, 1990.
- SMIL, V. Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production. **MIT press**, 2004.
- STEIN, T.; HAYEN-SCHNEG, N.; FENDRIK, I. Contribution of BNF by *Azoarcus* sp. BH72 in *Sorghum vulgare*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.969–971, 1997.
- STENLID, G. Cytokinins as inhibitors of root growth. **Physiologia Plantarum**, v.56, p.500-506, 1982.
- STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial Endophytes: Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19 p.1-30.
- TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V.M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v.356, p.35–49, 2012.
- VALÉ, M.; NGUYEN, C.; DAMBRINE, E.; DUPOUEY, J.L. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.2329- 2333, 2005.
- VERMA, S.C.; LADHA, J.K. & TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal Biotechnology**, v.91, p.127-141, 2001.
- VIDEIRA, S.S.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. Research letter. **FEMS Microbiology Letters**, v.293 11–19, 2009.
- VINHAL-FREITAS, I.C.; RODRIGUES, M.B. Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho, v.31, p.143–154, 2010.
- WEI, C.Y.; LIN, L.; LUO, L.J.; XING, Y.X.; HU, C.J.; YANG, L.T.; LI, Y.R. Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth. **Biology and Fertility of Soils**, v.50, p.657–666, 2014.

- WIELAND, G.; NEUMANN, R.; BACKHAUS, H. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.5849-5854, 2001.
- YOON, V.; TIAN, G.; VESSEY, J.K.; Macfie, S.M.; Dangi, O.P.; Kumer, A.K.; Tian, L. Colonization efficiency of different sorghum genotypes by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant and Soil**, v.398, p.243–256, 2016.
- YU, X.; AI, C.; ZHOU, G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of soil Biology**, v.47, p.138-145, 2011.
- ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.B.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; VIDAVER, A.K.; FENG, Z. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants †. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2198–2208, 2002.