UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DO SEMIÁRIDO

JÉSSICA FERNANDA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS AO SORGO [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] E AO MILHETO [*Penissetum glaucum* (L.) R.Brown] CULTIVADOS NO SERTÃO DE PERNAMBUCO

Petrolina-PE

2017

JÉSSICA FERNANDA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS AO SORGO [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] E AO MILHETO [*Penissetum glaucum* (L.) R.Brown] CULTIVADOS NO SERTÃO DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Semiárido.

Área de concentração: Química e Atividade Biológica

Orientador: D.Sc. Paulo Ivan Fernandes Júnior

Petrolina-PE

2017

Silva, Jéssica Fernanda da
S586c Caracterização polifásica de bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas ao sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] e ao milheto [*Penissetum glaucum* (L.) R.brown] cultivados no sertão de Pernambuco / Jéssica Fernanda da Silva. -- Petrolina, 2017.
xv, 97 f. : il. ; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido)- Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina-PE, 2017.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior

Banca examinadora: Profa. Dra. Lindete Míria Vieira Martins, Profa. Dra. Adriana Mayumi Yano de Melo.
Referências

1. Microbiologia. 2. Bactérias. 3. Nitrogênio - Fixação. 4. Crescimento (Plantas). I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 576

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas da UNIVASF.
Bibliotecária: Luciana Souza Oliveira CRB5/1731

JÉSSICA FERNANDA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS AO SORGO [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] E AO MILHETO [*Penissetum glaucum* (L.) R.Brown] CULTIVADOS NO SERTÃO DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Semiárido.

APROVADO EM 09 DE MARÇO DE 2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior – Embrapa Semiárido
(Orientador)

Prof. Dr. Lindete Miria Vieira Martins – UNEB
(Examinador Externo)

Prof. Dr. Adriana Mayumi Yano de Melo – UNIVASF
(Examinador Externo)

Petrolina-PE

2017

Aos meus pais Carlos e Auxiliadora pelo exemplo de força e amor mais verdadeiro que se pode existir...

E as minhas irmãs Carla e Priscila por serem também minhas melhores amigas...

Dedico.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela força em todos os momentos, pelo discernimento necessário para superar dificuldades e prosseguir sempre, conduzindo-me em caminhos de melhores escolhas;

Aos meus pais Carlos e Auxiliadora a base essencial da minha vida, agradeço infinitamente pela educação e amor que me foram dados, pela motivação constante na busca e realização dos meus sonhos;

As minhas irmãs Carla e Priscila, pela cumplicidade e companheirismo, por me incentivarem sempre em novas conquistas, pela paciência e compreensão ao cuidar de nossos pais nos momentos em que necessariamente estive ausente;

A minha família de Petrolina, meu primo Antônio e sua esposa Cristina e minha prima Gersica, por me acolherem generosamente em sua casa durante todo o período do Mestrado com grande afetividade;

Ao meu orientador Paulo Ivan Fernandes Júnior, pela orientação, por me apresentar o real e verdadeiro mundo da pesquisa, por toda disponibilidade diária ao longo da realização deste trabalho, sou muito grata por todos os ensinamentos, pelas ideias “brilhantes” compartilhadas, pela confiança e paciência e por todo incentivo em conseguir realizar um de seus grandiosos projetos;

A Embrapa Semiárido pela disposição de toda a infra-estrutura essencial para realização desse trabalho,

Agradeço ao Sr. Luiz e Herbert pela imensa ajuda nos experimentos e a todos os demais funcionários e pesquisadores que colaboraram de alguma forma;

Ao amigo Jonnathan, por adotar minhas “filhas” cuidando das minhas plantas até no natal, ajudando sempre na condução dos meus experimentos e pela amizade construída;

A amiga Tainá o que seria do laboratório sem essa aspirante a humorista? Agradeço pela amizade e parceira que tornaram mais leve todo o trabalho diário;

Ao amigo Reginaldo Neto, pela amizade também essencial, me socorrendo sempre que precisei sendo meu motorista ou ajudando em outras atividades;

E a todos os demais colegas de trabalho do Laboratório de Microbiologia do Solo, que passaram ou ainda passam pela luta da Pós-Graduação, Idaline, Dalila, Layane, Marcos, Gilmar, Rejane e Lucas pela parceria e amizade, e por todos os momentos de descontração.

A todos os estagiários que contribuíram de forma essencial na execução deste trabalho, em especial a Thaise Rosa que acompanhou e me ajudou muito desde a fase inicial de coleta até a finalização de todos os experimentos;

Agradeço a Indra Elena por me acolher no laboratório disposta a me auxiliar no que fosse necessário, com seus essenciais puxões de orelha que deixaram muitos ensinamentos compartilhados; e a Ana Carla que também muito contribuiu pacientemente na maior parte da execução deste trabalho sempre com muita disponibilidade e amizade serei infinitamente grata a essas duas pessoinhas amadas.

A todos os colegas do mestrado da Univasf e a todos os amigos que fiz em Petrolina, em especial a Juliana, Anita, Geisiane, Michele, Joana, Heloísa e Camila Mahara pelos bons momentos vivenciados e pela amizade construída que será levada por toda vida;

As grandes “abygas” Carola e Micaele pelos momentos de amizade mesmo que por longas conversas a distância ou por visitas que sempre que me fortaleceram a continuar minha luta;

As amigas de infância Hemilayne, Camila, Rayane, Angélica e Larissa por manterem o nosso laço de amizade vivo mesmo com a distância necessária que nos separa;

A minha afilhada Lívia Eduarda, por me receber sempre carinhosamente quando vou visitá-la, recarregando-me as energias com as suas doses de amor dado;

A Thiago Cavalcante, pela amizade e por sempre ouvir meus dramas diários me incentivando a continuar acreditando que sou capaz de superar minhas dificuldades;

A Universidade Federal do Vale do São Francisco pela oportunidade do Mestrado e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, por todos os ensinamentos;

A FACEPE pela concessão da bolsa; Ao CNPq pelo apoio financeiro da pesquisa.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho e de um grande sonho. Muito Obrigada!

“Abelha fazendo mel vale o tempo que não voou...”.

Milton Nascimento

RESUMO

As bactérias diazotróficas associadas às plantas representam estratégias adaptativas que auxiliam no suprimento nutricional e na promoção do crescimento vegetal de culturas, tendo como principal mecanismo a capacidade de fixar nitrogênio biologicamente. Estes micro-organismos podem substituir a adição de fertilizantes nitrogenados, sendo um importante recurso natural considerado o ponto chave para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos que auxiliem a produção vegetal de forma sustentável em regiões semiáridas. O presente trabalho objetivou isolar e caracterizar a diversidade de bactérias associativas as gramíneas sorgo e milheto, quanto a eficiência na promoção do crescimento vegetal, avaliando a influência da irrigação e adubação na eficiência e biodiversidade microbiana. As bactérias foram isoladas das culturas em duas condições de cultivo. Para o isolamento foram utilizados diferentes meios semissólidos para a pré-seleção de bactérias diazotróficas. O DNA dos isolados foi extraído com kit comercial para confirmação do potencial de fixação biológica de nitrogênio pela amplificação do gene *nif*H. Os isolados também foram caracterizados quanto à capacidade de produção de fitormônios e sideróforos, por meio de análises bioquímicas. O sequenciamento parcial do gene 16s rRNA dos isolados foi realizado para determinação do posicionamento taxonômico. Com objetivo de avaliar a eficiência de inoculação das bactérias caracterizadas, estirpes selecionadas foram submetidas a ensaios de promoção do crescimento vegetal “in vivo”. Como resultados 108 bactérias foram confirmadas quanto ao potencial em FBN. Dentre os grupos identificados destaca-se os gêneros *Burkholderia* sp., *Kosakonia* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea* sp. e *Pseudomonas* sp isolados nas diferentes culturas. Quanto a eficiência de produção de fitormônios, Sideróforos e solubilização de fosfato, número expressivo dos isolados apresentou essa capacidade destacando-se os isolados provindos do milheto. Os ensaios de eficiência “in vivo” demonstram isolados proeminentes para o suprimento nutricional vegetal, indicando algumas bactérias associativas estudadas como mais eficientes na promoção do crescimento vegetal.

Palavras chave: Bactérias diazotróficas, Gramíneas, crescimento vegetal, nitrogênio.

ABSTRACT

The diazotrophic bacteria associated with plants shows adaptive strategies that helps in nutritional supply and in growth promotion of crops, exhibiting as main mechanism the ability to fix nitrogen biologically. These microorganisms can replace the supply of nitrogen fertilizers, being a natural resource considered as key point for the development of biotechnological products that supports plants production through a sustainable way in semi-arid regions. The present research aimed to isolate and characterize the diversity of associative bacteria to sorghum and pearl millet grasses, regaring their efficiency on plant growth promotion, evaluating the influence of irrigation and fertilization on microbial efficiency and biodiversity. The bacterial isolates were isolated from both crops under two growth conditions. For the isolation, different semi-solid culture media were addopted for preliminary selection of diazotrophic bacteria. The genomic DNA of the isolates was extracted with a commercial kit and the amplification of the *nif*H gene was carried out to confirm their potential for biological nitrogen fixation. The isolates were also characterized by their ability to produce indolic compounds , siderophores and solubilize phosphate *in vitro* by means of biochemical analyzes. Partial sequencing of the 16S rRNA gene from the isolates was performed to determine their taxonomic positioning. In order to evaluate the inoculation efficiency of the bacteria characterized, selected strains were submitted to *in vivo* plant growth promotion trials. As results 108 bacteria were confirmed in its potential for biological nitrogen fixation. Among the identified groups, the genera *Burkholderia* sp., *Kosakonia* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea* sp., and *Pseudomonas* sp. stood out.. Regarding the production efficiency of indolic compounds, siderophores and phosphate solubilizing, an expressive number of isolates presented this capacity, standing out the pearl millet isolates. The tests *in vivo* efficiency trial demonstrates prominent isolates for plant nutrient supply, indicating some associative bacteria studied as being more efficient in promoting plant growth.

Keywords: Diazotrophic bacteria, Grasses, plant growth promotion, nitrogen, inoculant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Película microerofílica formada por meio da inoculação de uma suspensão de raiz de milheto em meio JMV..... 39

Figura 2. Amplificação de um fragmento do gene *nif*H com iniciadores PolF e PolR dos isolados do sorgo (experimento I)..... 53

Figura 3. Amplificação de um fragmento do gene *nif*H com iniciadores PolF e PolR dos isolados do milheto (experimento II)..... 53

Figura 4. Amplificação de um fragmento do gene *nif*H com iniciadores PolF e PolR dos isolados do sorgo (experimento II)..... 54

Figura 5. Amplificação de um fragmento do gene *nif*H com iniciadores *nif*Hfor e *nif*Hrev dos isolados do sorgo (experimento II)..... 54

Figura 6. Árvore filogenética com base nas sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos do sorgo e do milheto pertencentes a *Rhizobium* sp. e *Burkholderia* sp. 61

Figura 7. Árvore filogenética com base nas sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos do sorgo e do milheto pertencentes a Enterobacteriaceae..... 63

Figura 8. Diversidade de isolados associados representados pelos diagramas de Venn..... 65

Figura 9. Padrões polimórficos entre os diferentes grupos taxonômicos identificados..... 69

Figura 10. Padrão polimórfico de amplificação dos isolados pelo método RISA..... 69

Figura 11. Padrão polimórfico de amplificação dos isolados com iniciadores do gene *rpo*B..... 70

Figura 12. Análise qualitativa de produção de sideróforos dos isolados com reagente CAS..... 79

Figura 13. Análise dos mecanismos de promoção do crescimento “in vitro” dos isolados provenientes do sorgo e do milheto avaliados..... 82

Figura 14. Avaliação da eficiência de promoção do crescimento do sorgo.... 90

Figura 15. Avaliação da eficiência de promoção do crescimento do milheto..... 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa das populações de isolados bacterianos potencialmente diazotróficos associados ao sorgo (experimento I) pela técnica de número mais provável (NMP) com probabilidade de 95%..... 47

Tabela 2. Número de isolados obtidos do sorgo (*Sorghum bicolor*) BRS Ponta Negra cultivados no Campo Experimental da Embrapa Produtos e Mercados, considerados positivos para formação de película microaerofílica..... 47

Tabela 3. Estimativa das populações de isolados bacterianos potencialmente diazotróficos associados ao sorgo (experimento II) pela técnica de número mais provável (NMP)..... 48

Tabela 4. Número de isolados obtidos do sorgo (*Sorghum bicolor*) BRS Ponta Negra e SF 150 cultivados no Campo Experimental de Bebedouro, considerados positivos para formação de película microaerofílica..... 49

Tabela 5. Estimativa das populações de isolados bacterianos potencialmente diazotróficos associados ao milheto (experimento II) pela técnica de número mais provável (NMP) com probabilidade de 95%..... 49

Tabela 6. Número de isolados obtidos do milheto (*Penissetum glaucum*) BRS 1501 cultivado no Campo Experimental de Bebedouro, considerados positivos para formação de película microaerofílica..... 50

Tabela 7. Classificação de 20 isolados bacterianos do sorgo (*Sorghum bicolor*) cultivado sob diferentes lâminas de irrigação e adubação orgânica (experimento I) por meio da comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA com aquelas disponíveis no banco de dados EzBiocloud..... 56

Tabela 8. Classificação de 27 isolados bacterianos do sorgo (*Sorghum bicolor*) cultivado com e sem adição de nitrogênio (experimento II) por meio da comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA com aquelas disponíveis no banco de dados EzBiocloud..... 57

Tabela 9. Classificação de 24 isolados bacterianos do milheto (*Pennisetum glaucum*) cultivado com e sem adição de nitrogênio (experimento II) por meio da comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA com aquelas disponíveis no banco de dados EzBiocloud..... 59

Tabela 10. Produção de compostos indólicos na presença e ausência de L-triptofano (µg mL-¹) por bactérias diazotróficas isoladas do sorgo cultivado com e sem restrição hídrica e adubação orgânica (experimento I). 71
Tabela 11. Produção de compostos indólicos na presença e ausência de L-triptofano (µg mL-¹) por bactérias diazotróficas isoladas do milheto cultivado com e sem adubação nitrogenada (experimento II)..... 72
Tabela 12. Produção de compostos indólicos na presença e ausência de L-triptofano (µg mL-¹) por bactérias diazotróficas isoladas de duas variedades de sorgo cultivado com e sem adubação nitrogenada..... 74
Tabela 13. Índice de solubilização de fosfato Tri-cálcio calculado pela razão entre o diâmetro do halo/diâmetro da colônia dos isolados associativos ao sorgo e ao milheto..... 77
Tabela 14. Quantificação da produção de sideróforos equivalentes a EDTA (mmol L'1) por bactérias isoladas do sorgo e do milheto cultivados com e sem adubação nitrogenada (experimento II)..... 80
Tabela 15. Eficiência na promoção do crescimento vegetal de bactérias associativas isoladas do sorgo cultivado com e sem restrição hídrica e adubação orgânica (experimento I) inoculadas em sorgo cultivado em condições de casa de vegetação..... 86
Tabela 16. Eficiência na promoção do crescimento vegetal de bactérias associativas isoladas do sorgo cultivado com e sem adubação nitrogenada (experimento II), inoculadas em sorgo cultivado em condições de casa de vegetação..... 89
Tabela 17. Eficiência na promoção do crescimento vegetal de bactérias associativas isoladas do milheto cultivado com e sem adubação nitrogenada (experimento II) inoculadas em milheto cultivado em condições de casa de vegetação..... 92

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA- Ácido-indol-acético

CAS-Cromo Azurol

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DO- densidade ótica

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

IAOX- via indol-3-acetamida

PCR- Reação de polimerase em cadeia

mg/g- miligrama por grama

mL- mililitro

mm- milímetro

mM- milimolar

NaCl- Cloreto de sódio

NaClO- Hipoclorito de Sódio

nm- nanômetro

NMP- número mais provável

rpm- rotações por minuto

TAM- via triptamina

µg mL-1- micrograma por mililitro

ufc g $^{-1}$- unidade formadora de colônia por grama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... **16**

2. OBJETIVOS..... **18**

2.1 OBJETIVO GERAL..... **18**

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... **18**

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... **19**

3.1 **A Região Semiárida**..... 19

3.1.1 Os sistemas produtivos de base familiar do Semiárido..... 20

3.1.2 Sorgo..... 21

3.1.3 Milheto..... 22

3.2 **Fatores limitantes da produção vegetal**..... **23**

3.2.1 Os Recursos Naturais e as estratégias para o cultivo..... 24

3.3. **Bactérias promotoras de crescimento vegetal**..... **25**

3.3.1 Fixação Biológica de Nitrogênio..... 26

3.3.2 FBN em plantas não leguminosas..... 27

3.3.3 Diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas..... 28

3.3.4 Produção de compostos indólicos por isolados bacterianos..... 30

3.3.5 Solubilização de Fosfato..... 32

3.3.6 Produção de Sideróforos..... 33

4. MATERIAL E MÉTODOS..... **35**

4.1 Coleta, Isolamento e Purificação das bactérias associativas..... **35**

4.1.1 Experimento I- Sorgo cultivado com e sem restrição hídrica e adubação orgânica..... 35

4.1.1.1 Cultivo das plantas no campo e amostragem..... 35

4.1.1.2 Isolamento e purificação de bactérias endofíticas..... 36

4.1.2 Experimento II- Sorgo e Milheto cultivados com e sem adubação nitrogenada..... 37

4.1.2.1Cultivo das plantas no campo e amostragem..... 37

4.1.4 Isolamento e purificação de bactérias endofíticas..... 38

4.2 Análises Moleculares..... **40**

4.2.1 Extração de DNA..... 40

4.2.2 Amplificação do gene *nif*H..... 40

4.2.3 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA..... 41

4.2.4 Amplificação dos genes *rpo*B, *recA, atpD*, *glnII* e da região ITS..... 41

4.3 Mecanismos de Promoção do Crescimento *in vitro*..... **43**

4.3.1 Produção de compostos indólicos..... 43

4.3.2 Produção de Sideróforos..... 43

4.3.3 Solubilização de Tri-fosfato de cálcio..... 44

4.3.4 Análise dos dados..... **44**

4.4. **Eficiência na promoção do crescimento vegetal**..... **45**

4.4.1 Implantação, condução e coleta dos experimentos..... 45

4.4.2 Análise de dados..... 46

5. RESULTADOS DISCUSSÃO..... **47**

5.1 **Quantificação e isolamento das bactérias diazotróficas**..... **47**

5.1.1 Experimento I – Sorgo cultivado sob diferentes condições de adubação e irrigação..... 47

5.1.2 Experimento II- Sorgo e Milheto cultivado com e sem adubação nitrogenada..... 48

5.2 **Caracterização Molecular**..... **53**

5.2.1 Amplificação do gene *nif*H dos isolados..... 53

5.2.2 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA..... 56

5.2.3 Amplificação dos genes *rpo*B, *recA, atpD*, *glnII* e da região ITS..... 68

5.3 **Avaliação dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal**..... **71**

5.3.1 Produção de compostos indólicos “in vitro”..... 71

5.3.2 Solubilização de Tri-fosfato de Cálcio..... 77

5.3.3 Produção de Sideróforos..... 79

5.4 **Eficiência na promoção do crescimento vegetal**..... **85**

5.4.1 Ensaio I- Eficiência dos isolados do sorgo (experimento I)..... 85

5.4.2 Ensaio II- Eficiência dos isolados do sorgo (experimento II)..... 88

5.4.3 Ensaio III-Eficiência dos isolados do milheto (experimento II)..... 91

CONCLUSÕES **97**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **98**

1. INTRODUÇÃO

O Nitrogênio é um nutriente essencial para a promoção do crescimento vegetal. Contudo, embora esteja presente de forma livre na atmosfera, não é sempre bem disponibilizado no solo, estando grande parte do nitrogênio presente como N_2 nos poros do solo ou como parte de substâncias húmicas em formas não assimiláveis. Entre os procariotos, bactérias diazotróficas podem facilitar a nutrição nitrogenada das plantas a partir da fixação biológica de nitrogênio, este processo corresponde a redução do nitrogênio atmosférico (N_2) para amônia (NH_3) e associado às plantas fornece-lo, ao menos em parte, de forma a suprir a demanda de N dacultura (MOREIRA et al., 2010; BOUFFAUD et al., 2016).

A Fixação biológica de Nitrogênio (FBN) é mais comumente associada às plantas leguminosas que estabelecem relação simbiótica com micro-organismos que formam nódulos. Entretanto, uma variedade de plantas não nodulantes também podem desenvolver-se em ambientes naturais com baixo teor de N, devido às associações com micro-organismos promotores de crescimento vegetal e fixadores de N. As bactérias diazotróficas que colonizam o interior dos tecidos vegetais denominadas endofíticas atuam no processo de fixação biológica do nitrogênio e apesar da especificidade da associação das bactérias endofíticas com seus hospedeiros ser baixa essa é mais frequente em gramíneas (BALDANI, 1997; DOTY et al., 2016; BOUFFAUD et al., 2016).

Além de atuarem na fixação biológica do nitrogênio, as bactérias diazotróficas endofíticas possuem uma importante papel na agricultura favorecendo o desenvolvimento vegetal pela produção de fitormônios e sideróforos, contribuindo na resistência a patógenos e produção de antibióticos (MAGNANI et al., 2010). Em regiões Semiáridas a produção vegetal é ameaçada em decorrência do clima, caracterizado pela escassez de chuvas e altas temperaturas, que resultam na desestruturação da unidade familiar produtiva (SILVA et al., 2014). Dentre as atividades econômicas mais viáveis para esta região destaca-se a produção animal e o cultivo de culturas resistentes e adaptadas ao clima semiárido (SANTOS et al., 2010) como as gramíneas forrageiras sorgo e milheto.

O cultivo vegetal de forragem requer a adição de grandes quantidades de fertilizantes, como os nitrogenados para suprir as necessidades nutricionais dessas culturas que embora sejam adaptadas à baixa precipitação e ao clima semiárido precisam se estabelecer em solos de fertilidade reduzida. A adição de fertilizantes nitrogenados, além de elevar os custos de produção, pode poluir o meio ambiente. Cerca de 50% do fertilizante nitrogenado adicionado às culturas não é assimilado, e as diferentes perdas resultam em poluição do solo e corpos de água, causando impacto negativo à saúde animal e humana (BERGAMASCHI et al., 2007; CLAVIJO et al., 2012).

Os recursos genéticos são fontes promissoras para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável. As bactérias promotoras de crescimento são alternativas naturais para prover a nutrição vegetal em níveis adequados, assim, identificar diferentes estirpes e caracterizá-las, quanto a sua eficiência de promoção do crescimento pode contribuir para produção de produtos biotecnológicos que venham a contribuir com a produção agrícola na região semiárida, a partir da formulação de inoculantes com isolados nativos de culturas de importância para região, sendo sustentável e economicamente favorável (BABALOLA, 2010; GUPTA, 2013; MAREQUE et al., 2015).

Os inoculantes são produtos desenvolvidos com base nos estudos de diversidade e caracterização de isolados aliados com a biotecnologia, algumas culturas de gramíneas já possuem a indicação como inoculantes específicos para o milho e o trigo o que pode representar maior rendimento e economia para o produtor (HUNGRIA, 2011). O sorgo *Sorghum bicolor* (L.) Moench e o milheto *Penissetum glaucum* (L.) representam grande importância agrícola para a região semiárida e estruturação da agricultura familiar pelo alto potencial de rendimento, mesmo em condições limitadas (IIJIMA et al., 2016). Porém, não possuem indicação de produtos inoculantes específicos, o que torna necessário os estudos focados para estas gramíneas na busca por selecionar estirpes que favoreçam o crescimento vegetal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar bactérias associativas potencialmente diazotróficas do sorgo e do milheto utilizando diferentes abordagens bioquímicas, moleculares e ecológicas visando selecionar isolados eficientes para a promoção do crescimento vegetal.

2.2 Objetivos Específicos

Obter bactérias potencialmente promotoras do crescimento vegetal oriundas de plantas de sorgo e milheto cultivadas em condições de campo irrigado em Petrolina, PE;

Avaliar a variabilidade genética dos isolados por meio da amplificação do gene *nif*H e das sequências parciais do gene 16S rRNA;

Analisar a capacidade de produção de compostos indólicos, sideróforos e solubilização de fosfato “in vitro”, como possíveis mecanismos de promoção do crescimento vegetal dos isolados potencialmente diazotróficos obtidos;

Avaliar a eficiência dos isolados selecionados na promoção do crescimento vegetal do sorgo e do milheto “in vivo”.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 A Região Semiárida

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, extensa área geográfica que compreende uma variedade de diferentes tipos de vegetação. Representa a região do Semiárido ocupando grande parte do Nordeste, sendo caracterizada pelo agrupamento de vegetação arbustiva e floresta seca, abrangendo cerca de 800.000 km² e suportando um grande número de espécies vegetais, apresentando condições edafoclimáticas distintas que criam unidades de paisagens diferenciadas (SANTOS et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2014; NUNES et al., 2015).

As espécies típicas da Caatinga são adaptadas ao clima semiárido. Os municípios desta região integram áreas de ocorrência do bioma apresentando fragilidade socioeconômica e vulnerabilidades decorrentes da escassez de água e da distribuição irregular das chuvas (BRASIL, 2011). Em contraste com outras áreas semiáridas do mundo, no Brasil essa região é muito populosa representando mais ou menos 11% da população total do país. Além da expressiva presença de agricultores familiares, possui um elevado percentual de pessoas em extrema pobreza sendo uma região com menor expectativa de vida, maior índice de analfabetismo e baixa renda per capta (SILVA et al., 2014 ; QUEIROZ et al., 2005).

A grande área da Caatinga, com diferentes fisionomias de relevo e a associação de sistemas climáticos entre as regiões de Nordeste e Sudeste propicia diversos períodos chuvosos e em diferentes quantidades, caracterizando o clima do Nordeste como um dos mais complexos do país (QUEIROZ et al., 2005). O clima incomum da Caatinga serve como um importante laboratório para estudos de como plantas se adaptam a precipitação altamente variável e ao stress ambiental. Apesar da riqueza em diversidade de espécies vegetais do bioma, florestas tropicais secas têm recebido atenção reduzida e estudos focados nesse ecossistema apresentam os escores mais baixos em termos de esforço de pesquisa e geração de conhecimento sendo indicado como um dos menos conhecidos e mais negligenciados dos biomas brasileiros (SANTOS et al., 2011; MONTEIRO et al., 2015).

O desenvolvimento de uma estrutura sociocultural peculiar e uma forte relação com o uso dos recursos naturais disponíveis na região é uma estratégia de sobrevivência diante das dificuldades enfrentadas pelos baixos índices de desenvolvimento humano do Semiárido (QUEIROZ et al., 2005). A melhoria da agricultura sustentável requer um bom uso e gestão da fertilidade do solo e suas propriedades físicas, onde ambos dependem dos processos biológicos e da biodiversidade (SARATHAMBAL et al., 2015). Para todas as culturas importantes em média, os rendimentos são apenas uma fração - algo entre 20% e 50% dos rendimentos recordes; estas perdas são principalmente devido à seca e à alta salinidade do solo, condições ambientais que tendem a piorar devido à mudança climática global (SHRIVASTAVA & KUMAR, 2014).

O grande potencial biotecnológico da região semiárida envolve a aplicação dos diferentes recursos genéticos devido às suas características peculiares decorrente das estratégias adaptativas às condições locais. Estas estratégias, principalmente da biodiversidade vegetal, resultam em organismos com elevada concentração de metabólitos com diferentes aplicações farmacológicas (MONTEIRO et al., 2014).

Apesar de haver certo número de estudos sobre caracterização e exploração da biodiversidade vegetal, poucos estudos objetivaram avaliar a diversidade e aplicação biotecnológica de micro-organismos funcionais da região semiárida. Estudos que objetivam avaliar a diversidade e as características funcionais de micro-organismos benéficos são importantes, pois, poderão resultar em benefício para a produção vegetal sustentável com a formulação de inoculantes microbianos para a promoção do crescimento vegetal (BABALOLA, 2010).

3.1.1 Os sistemas produtivos de base familiar do Semiárido

Em decorrência da seca, a desestruturação da unidade familiar produtiva pode ocorrer com as perdas totais ou parciais da safra e debilitação ou morte do rebanho que acabam fragilizando a agricultura familiar do Semiárido (SILVA et al., 2014). Dada a crescente demanda na produção de alimentos e a necessidade em assegurar fontes de subsistência para os rebanhos, há um grande interesse em ampliar o conhecimento sobre as plantas forrageiras nestas áreas. Com investigações voltadas para caracterizar os recursos naturais locais e determinar alternativas que podem minimizar as dificuldades enfrentadas (NUNES et al., 2015).

A distribuição irregular de chuvas reduz a possibilidade de produzir culturas anuais, sendo a produção animal considerada uma das opções importantes para o Nordeste do Brasil. O bioma Caatinga é um importante recurso forrageiro para esta região com uma grande diversidade de plantas potenciais para alimentação animal (SANTOS et al., 2010; NUNES et al., 2015). Porém, devido ao clima semiárido esta região sofre com fatores ambientais, sendo afetada por grande influência da sazonalidade climática, limitando o potencial produtivo e nutricional da vegetação, que acaba dificultando a produção animal principalmente em períodos de seca.

Várias culturas alimentares de cereais adaptadas a ambientes com disponibilidades diferentes de água são relatadas quanto a utilização em todo o mundo no fornecimento de alimento para seres humanos e animais, tais como milheto e sorgo, usados desde muito tempo, por apresentarem alto potencial de rendimento, mesmo em condições limitadas (IIJIMA et al., 2016).

3.1.2 Sorgo

Dentre as culturas forrageiras, o sorgo é caracterizado por apresentar rendimento mesmo sob o estresse ambiental da região semiárida. É uma cultura tradicional tolerante à seca com potencial para sustentar altos rendimentos, mesmo nos ambientes onde a água é limitante. Planta do tipo C4, ereta, constituída a partir de um tronco principal com desenvolvimento dependente do genótipo e das condições de cultivo, como temperatura e fontes de nutrientes (CIAMPITTI & PRASAD, 2016). O tamanho final da planta é relacionado à resposta à sensibilidade ao fotoperíodo e condições de crescimento, apresenta um sistema radicular fibroso e vem sendo utilizado como principal fonte de alimento em grande parte dos países da África, sul da Ásia e América Central e ainda, como importante componente da alimentação animal nos Estados Unidos, Austrália e América do Sul (TARDIN & RODRIGUES, 2008; SUTKA et al., 2016).

Segundo Ciampitti e Prasad (2016) o sorgo tem várias aplicações de grãos, forragem, alimentação e bioenergia, além do considerável valor nutricional da planta com uma composição global dos grãos de 70-80% de carboidratos, 2-5% de gordura, 1-3% de fibra e 1-2% de cinzas, contendo ainda cerca de 11-13 % de proteína, que é livre de glúten sendo uma vantajosa fonte de alimento de pessoas que sofrem com problemas celíacos.

As adaptações da cultura a uma gama de ambientes permitem o seu desenvolvimento e expansão em regiões de cultivo com distribuição irregular de chuvas e em sucessão a culturas de verão. Uma série de características torna a cultura de Sorgo resistente à seca, podendo responder favoravelmente em áreas com baixa precipitação e irrigação suplementar. Porém, diferenças consideráveis entre variedades são observadas em resposta a irrigação em relação à resistência a seca e rendimentos nessas condições limitantes (TARDIN & RODRIGUES, 2008; FAO, 2015).

3.1.3 Milheto

O Milheto pertence à família Poaceae sendo o sétimo cereal mais importante de colheita global. É uma cultura que geralmente prospera em áreas com chuvas escassas, sendo bem-adaptada a vários estresses abióticos como a seca, a alta temperatura e salinidade, que podem ocorrer individualmente ou combinados. Cultivada principalmente em regiões marginais no Árido e Semiárido da Ásia e África para produção de grãos e forragem onde outras culturas, como milho e sorgo são propensas a serem bem sucedidas (YADAV et al., 2010; GUPTA et al., 2013; VADEZ et al., 2012; SHIVHARE & LATA, 2016).

Seu êxito de cultivo no Brasil é atribuído por ser uma cultura de fácil instalação e desenvolvimento em regiões com precipitação entre 200 e 800 mm anuais e temperatura média anual de 18 a 30 ºC. Além disso, apresenta um sistema radicular profundo permitindo que os nutrientes extraídos do solo permaneçam em função da rápida decomposição, além disso apresentam produção de massa seca e grãos com alto valor nutritivo. No que diz respeito à qualidade nutricional, o milheto é equivalente ao milho e geralmente superior ao sorgo em proteínas, taxa de eficiência proteica, valores de conteúdo e qualidade e níveis de energia metabolizável. Sendo considerado componente principal de segurança alimentar das populações rurais pobres em áreas secas (EMBRAPA, 2008; VADEZ et al., 2012).

Segundo Valdez e colaboradores (2012), o milheto tende a ter um ciclo de cultivo mais curto do que outros cereais, sendo esta característica relacionada ao mecanismo de escape a seca, pela floração precoce herdada de progenitores selvagens, tendo evoluído com ciclos de vida curtos. Seu potencial de crescimento não é comparável a outros cereais de maior duração que crescem em ambientes

favoráveis, porém sua elevada taxa de crescimento da cultura confere um potencial elevado sob condições ideais.

3.2 Fatores limitantes à produção vegetal

A água é um dos fatores mais limitantes para o desenvolvimento das plantas, bem como todas as formas de vida, sendo determinante para a vegetação e exploração dos recursos naturais na região Nordeste, devido ao clima variável desde o super-úmido até o semiárido, ficando as chuvas restritas a uns poucos meses do ano. O estresse hídrico é uma ameaça que afeta o rendimento vegetal (QUEIROZ et al., 2005; KAVAMURA et al., 2013 ; SOUSSI et al., 2015).

A salinização é outro fator considerado um dos maiores problemas de degradação do solo no mundo, podendo resultar em limitação no crescimento vegetal e atividade microbiana do solo devido ao estresse osmótico e presença de íons tóxicos, com alta concentração de sódio que influencia a estabilidade estrutural do solo pelo processo de sodicidade (YAN, 2015). Esses processos limitam o rendimento de culturas e a área afetada vem aumentando a cada dia (SHRIVASTAVA & KUMAR, 2014).

Entre os fatores limitantes também são destacadas as respostas à temperatura que diferem entre as espécies vegetais ao longo do seu ciclo de vida e são principalmente respostas fenológicas isto é, estão relacionadas às fases de desenvolvimento da planta (HATFIELD & PRUEGER, 2015). Os estresses bióticos e abióticos podem ocorrer de forma interativa e simultânea, sendo relatada a influência da temperatura combinada com patógenos de plantas, indicando que a alta temperatura aumenta a susceptibilidade das plantas às doenças (RAMEGOWDA & SENTHIL-KUMAR, 2015).

A maioria de cultivos agrícolas é dependente da utilização de fertilizantes químicos sintetizados, os quais proporcionam nutrientes essenciais para as plantas, otimizando os processos produtivos, porém o uso indiscriminado desses produtos pode ocasionar a contaminação de solo e corpos de água, além dos altos custos de

produção e impacto negativo na saúde animal e humana (BERGAMASCHI et al., 2007; CLAVIJO et al., 2012).

Levando em consideração os diferentes limites a serem enfrentados para o sucesso da produção vegetal, Silveira & Freitas (2007) ressaltaram a importância da manutenção da atividade microbiana e níveis de fertilidade do solo. Em condições ideais, a microbiota do solo é favorecida permitindo a liberação gradual de nutrientes para a nutrição das plantas sem perdas por lixiviação. Porém, a fixação temporária dos nutrientes pode ser prejudicada pela diminuição microbiana e empobrecimento do solo (HUNGRIA et al., 1997). A degradação do solo é considerada um significativo problema global que restringe cada vez mais os ganhos na produção agrícola, tendo os efeitos reconhecidos como obstáculos significativos à agricultura, produtividade e segurança alimentar (BASS et al., 2016).

3.2.1 Os Recursos Naturais e as estratégias para o cultivo

A grande necessidade em poupar recursos naturais, reduzindo custos econômicos e minimizando os impactos ambientais, tornam indispensável à busca por soluções para amenizar a utilização de fontes finitas na agricultura. A sustentabilidade de sistemas agrícolas esta relacionada ao manejo adequado dos recursos para satisfazer as necessidades do homem, mantendo ou melhorando a qualidade do ambiente e os recursos naturais (BOHLOOL et al., 1992, HUNGRIA et al., 1997, SILVEIRA & FREITAS, 2007).

A agricultura e a produção agrícola diretamente afetadas em regiões áridas por estresses abióticos, são favorecidas pelas estratégias de adaptação, com micro-organismos capazes de lidar com difíceis condições ambientais adversas, desenvolvendo respostas de estresse fisiológicos e moleculares específicos, o que lhes permite prosperar sob condições normalmente desfavoráveis (SOUSSI et al., 2015).

Dentre as possíveis fontes potenciais na busca das alternativas sustentáveis, destaca-se o solo que é um ecossistema de enorme riqueza microbiana. Micro-organismos podem desempenhar um papel significativo para superar as limitações de produção vegetal, se explorarmos suas propriedades únicas, tais como a

tolerância à salinidade, diversidade genética, síntese de solutos compatíveis, produção de hormônios promotores de crescimento das plantas, potencial de biocontrole, e sua interação com plantas cultivadas (SILVEIRA & FREITAS, 2007; CLAVIJO et al., 2012; SHRIVASTAVA & KUMAR, 2014; SOUSSI et al., 2015).

A rizosfera representa uma das regiões de interação biológica mais complexas do planeta sendo considerado como principal fonte de mecanismo para resolução de problemas agrícolas e sustentabilidade florestal, favorecendo em diferentes aspectos a preservação da biodiversidade, de recursos hídricos e diminuição das alterações climáticas pelas suas características químicas, físicas e biológicas únicas. A interação entre plantas e diferentes micro-organismos é uma estratégia natural para enfrentar estresses bióticos e abióticos (JONES & HINSINGER, 2008; TRABELSI & MHAMDI, 2013).

Diante da atual necessidade por novas tecnologias, os micro-organismos associados à promoção de crescimento vegetal, demonstram ser uma excelente alternativa para a agricultura de maneira sustentável. A aplicação de bactérias promotoras de crescimento vegetal e fixadoras de nitrogênio é uma alternativa tecnológica que visa atender a essas necessidades melhorando a fertilidade do solo e reduzindo os impactos negativos. Apesar do uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas ser considerado uma alternativa promissora à adubação com fertilizantes sintéticos para o cultivo de sorgo, que é uma cultura que exige grande demanda de fertilizantes para produtividade ideal. São escassos estudos sobre a dinâmica populacional de bactérias endofíticas colonizando milheto, na busca por seu potencial de utilização como biofertilizantes (BABALOLA, 2010; GUPTA, 2013; MAREQUE et al., 2015).

3.3. Bactérias promotoras de crescimento vegetal

Micro-organismos associados à promoção de crescimento vegetal são considerados uma alternativa promissora para favorecer a agricultura de maneira sustentável. As bactérias se destacam entre os micro-organismos mais abundantes em associação com diferentes plantas, devido a grande capacidade de proporcionar por meio de mecanismos diretos e indiretos, o crescimento da raiz e da planta, sendo comumente definidas como Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

(BPCV's), que promovem o crescimento direto ou indireto das plantas por diversos mecanismos (GUPTA et al., 2013; SOUSSI et al., 2015).

Soussi e colaboradores (2015) ressaltaram, com base nos resultados demonstrados na aplicação das bactérias, que estirpes têm sido propostas como candidatos a biofertilizantes pelas suas propriedades envolvidas na promoção de crescimento vegetal. A seleção de estirpes competitivas em condições de solo natural para utilizá-las em número elevado, permitindo que esta população introduzida seja favorecida em detrimento de outras indesejáveis e em menor número no solo (REIS, 2007).

3.3.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes em sistemas biológicos, compreendendo um dos componentes de ácidos nucleicos e proteínas, dentre as suas múltiplas funções, sendo um suprimento crucial para a produção vegetal. É um dos principais componentes para elevadas produções na agricultura formando cerca de 80% da atmosfera na forma gasosa de N_2 que não é aproveitável pelas plantas, sendo apenas os procariotos diazotróficos capazes de transformar o N_2 em formas assimiláveis (CHANWAY et al., 2014; COLLINO et al., 2015, DOBEREINER, 1997).

O processo de FBN já é bem esclarecido em plantas leguminosas, sendo a soja um dos principais exemplos de cultura, na qual a obtenção de todo nitrogênio necessário se dá pela interação rizóbio-leguminosa, fato que levou o Brasil, a ser o segundo maior produtor de soja no mundo e ter um produto mais competitivo no mercado internacional, pelo baixo custo de produção, tornando a soja um dos principais produtos de exportação do país há muitos anos (DOBEREINER, 1997). Segundo Raymond e colaboradores (2004), a fixação biológica de N_2 é um processo que ocorre em variados contextos metabólicos abrangendo ambientes aeróbicos e anaeróbicos, ocorrendo nos mais diversos ambientes da Terra. O processo de redução do nitrogênio atmosférico a NH_3 é catalisado pelo complexo enzimático nitrogenase em um complexo ativo redox constituído de duas proteínas, a dinitrogenase e a dinitrogenase redutase interagindo cooperativamente na FBN, a reação ocorre acoplada a produção de H_2. O local ativo da redução é a subunidade dinitrogenase I ou Mo-Fe proteína, que pode ser encontrada em alguns organismos

diazotróficos com o Mo substituído por V ou Fe. A dinitrogenase redutase ou Fe-proteína é a subunidade responsável pela transferência de elétrons para que ocorra a redução do N_2 sendo mais sensível ao O_2 (RAYMOND et al., 2004; REIS & TEIXEIRA, 2005)

As práticas agrícolas devem diversificar as técnicas de cultura, buscando reproduzir os ecossistemas naturais, e estimar a contribuição da FBN é uma forma crucial de análise do uso de nutrientes e impacto humano sobre o ciclo do N em agro-ecossistemas (AUSTIN et al., 2013; COLLINO et al., 2015).

Na década de 80 os estudos com inoculação de bactérias diazotróficas desenvolvidos por Dobereiner e colaboradores impulsionaram as pesquisas com FBN no Brasil. Nestes estudos, verificou-se grande variação entre as diferentes culturas como arroz, milho, sorgo, trigo que apresentaram rendimento em torno de 20-30% (DOBEREINER & DAY, 1976; REIS, 2007), demonstrando a necessidade de se selecionar pares simbiontes mais eficazes para a FBN, o que tem sido um dos alvos dos estudos com FBN no Brasil desde então.

3.3.2 FBN em plantas não leguminosas

Desde os primeiros trabalhos desenvolvidos pela Dra. Johanna Döbereiner algumas bactérias diazotróficas passaram a ser associadas com plantas não leguminosas sendo descritas as primeiras espécies de bactérias fixadoras de N_2 isoladas a partir de gramíneas no Brasil: *Beijerinckia fluminensis* (Döbereiner e Ruschel, 1958) e *Azotobacter paspali* (Dobereiner, 1966). Segundo Dobereiner (1997), o sucesso da FBN observado em diferentes culturas de leguminosas, ocorre através das interações simbióticas entre as plantas e os micro-organismos, principalmente pelas bactérias de diversos gêneros, onde por meio da formação de nódulos desenvolvem estruturas favoráveis e necessárias ao processo de fixação de N_2, sendo um grande desafio compreender a extensão da FBN para plantas não leguminosas.

A adaptação de meios semissólidos com diferentes composições nutricionais favoreceu os avanços das pesquisas sobre a FBN e isolamento de bactérias fixadoras de N em plantas não leguminosas. Esse tipo de meio de cultura cria um ambiente com um gradiente de concentração de oxigênio, o que permite aos

isolados diazotróficos o estabelecimento em um ponto com a concentração de oxigênio adequada na coluna do meio proporcionando as condições microaerofílicas necessárias, em situação semelhante ao que ocorre *in vivo* nos tecidos vegetais (BALDANI et al., 2014).

James e Baldani (2012) ressaltam que os trabalhos visando à identificação de diazotróficas para FBN e promoção de crescimento em gramíneas (Poaceae) e outras não leguminosas, já resultaram no sequenciamento dos genomas dos micro-organismos mais eficientes (*Azoarcus, Azospirillum* spp*., Burkholderia* spp*., Gluconacetobacter diazotrophicus e Herbaspirillum seropedicae*). Estes diazotróficos fornecem uma visão sobre como espécies não leguminosas, especialmente Poaceae, podem interagir intimamente em uma associação benéfica não simbiótica, mesmo sendo estes apenas uma pequena representação diante da enorme diversidade de bactérias susceptíveis a se associar com não leguminosas.

Quando se aborda o processo de FBN em plantas não leguminosas, é observada a influência exercida pelo genótipo da planta no processo de interação entre gramíneas e bactérias potenciais fixadoras de N_2, além dos fatores abióticos do meio e da competitividade com os demais micro-organismos locais, levando-se em consideração principalmente as características genéticas do hospedeiro onde a variação de rendimento de culturas é demonstrada em diferentes genótipos (BERGAMASCHI et al., 2007; DOBEREINER, 1997; REIS et al., 2000; OLIVEIRA, 2012).

O conceito de associativo abordado por Dobereiner (1992) foi modificado, introduzindo-se o conceito de endofítico para o campo da FBN, a partir da identificação de novas bactérias fixadoras de nitrogênio colonizando o interior das plantas e pela íntima interação entre macro e micro simbiontes que foram essenciais para avanços na compreensão fisiológica, ecológica e genética bem como a interação entre planta e bactéria (BALDANI & BALDANI, 2005).

3.3.3 Diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas

Inicialmente a inoculação de bactérias associativas não simbióticas como pertencentes ao gênero *Azotobacter* foi introduzida largamente na Rússia nas

décadas de 1930 e 1940, porém a prática foi abandonada pelos resultados inconclusivos (BASHAN,1998). Somente no final década de 1970 ocorreram os dois maiores avanços da tecnologia de inoculação, que consistiram na capacidade de *Azospirilum* sp. em promover o crescimento vegetal de plantas não leguminosas pela influência no metabolismo vegetal e a investigação do potencial de biocontrole associado a grupos de micro-organismos pertencentes a *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* (DOBEREINER & DAY,1976; BASHAN,1998).

Diferentes gramíneas de importância agrícola como cana-de-açúcar, trigo, sorgo e milho se associam com numerosas bactérias diazotróficas, tais como *Gluconacetobacter* sp.*, Herbaspirillum* sp., *Azospirillum* sp., dentre outros, porém a capacidade de fixação de nitrogênio é variada nas associações com plantas não leguminosas (PRAKAMHANG et al., 2009).

Haiyambo et al. (2015) ao avaliarem a eficiência de bactérias associadas as gramíneas *Phragmites australis*, *Sporobolus* sp., *Sorghum bicolor*, *Pennisetum glaucum* e *Vetiveria nigritana,* relataram a diversidade de isolados entre os diferentes grupos, destacando *Pennisetum glaucum e Sorghum bicolor* como principais fontes de isolamento de bactérias associativas, sendo pertencentes a *Pseudomonas veronii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Paenibacillus validus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kocuria* sp., *Bacillus licheniformis.* Maropola et al. (2015) ao avaliarem a diversidade de bactérias endofíticas em *Sorghum bicolor* demonstraram variação entre os nichos de isolamento, sendo dominante ao tecido radicular isolados pertencentes a *Leuconostoc* sp., *Sphingobium* sp., e restritos ao tecido do caule *Rhodococcus* sp., *Lactococcus* sp., e *Swaminathania* sp. São relatadas ainda várias associações de bactérias diazotróficas pertencentes a *Enterobacter dissolvens*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas* sp. (PRAKAMHANG et al.,2009).

É destacado ainda que as gramíneas são capazes de estabelecer uma relação associativa com diferentes bactérias promotoras de crescimento vegetal do gênero *Azospirillum*, sendo demonstrado os benefícios da inoculação com *Azospirillum* sobre o crescimento e a produção de diversas culturas (SALAMONE et al., 2012), havendo inclusive bactérias de *Azospirillum brasilense* recomendadas

oficialmente para as culturas do milho, trigo e arroz no Brasil (HUNGRIA et al., 2010).

Apesar da diversidade de bactérias endofíticas associadas ao sorgo ser considerada baixa quando comparada com a comunidade rizosférica (RAMOND et al., 2013). Diferentes gêneros bacterianos de isolados endofíticos do sorgo tais como *Pseudomonas, Erwinia, Stenotrophomonas, Agrobacterium, Bacillus* e *Paenibacillus* foram identificados, tendo o seu potencial metabólico associado à planta, como a influência na aquisição de nutrientes, potencial de agentes antimicrobianos, produção de fitormônios e ação contra patogenicidade (MAROPOLA et al., 2015).

GUPTA et al. (2013) avaliando a dominância de espécies colonizando o milheto em vários estágios do crescimento, descreveram pertencentes a *Bacillus, Microbacterium*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Curtobacterium*, *Nocardioides*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium* e *Rhizobium*, destacando os isolados de *Pseudomonas* sp. como os micro-organismos mais eficientes em colonização e promoção do crescimento vegetal.

KUMAR et al. (2014) ao estudarem a diversidade e o potencial na promoção do crescimento vegetal de isolados associados ao milheto cultivado nas regiões áridas e semiáridas identificaram *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp. e *Agrobacterium tumefaciens* enfatizando que a prevalência desses grupos em regiões com baixos índices pluviométricos pode contribuir na formulação de produtos biofertilizantes.

3.3.4 Produção de compostos indólicos por isolados bacterianos

Dentre as auxinas o AIA (ácido-indol-acético) é a auxina natural mais estudada, possui a propriedade de transporte polar em plantas e pode ser sintetizado por bactérias promotoras de crescimento vegetal, é um fitormônio que desempenha um importante papel no efeito do crescimento das plantas, sendo capaz de regular quase todos os aspectos como a divisão celular, alongamento, desenvolvimento dos frutos e senescência. Atuando na rizosfera para estimulação do crescimento radicular com o aumento em número e comprimento de raízes

favorecendo a absorção de nutrientes e estimulando a colonização bacteriana (BABALOLA, 2010; SUGAWARA et al., 2015; SHAO et al., 2015).

Segundo MANO & NEMOTO (2012), diferentes espécies de plantas apresentem características únicas com estratégias e modificações que otimizem suas vias metabólicas. Contudo, estas também compartilham de alguns mecanismos fundamentais, evolutivamente conservados, para biossíntese de AIA por ser um elemento fundamental no ciclo de vida da planta.

Diversas bactérias associativas ou simbióticas de plantas podem produzir quantidades significativas desses compostos indólicos como um dos principais mecanismos para promoção do crescimento de plantas juntamente com a fixação biológica de nitrogênio, sendo relatado em diversos trabalhos de caracterização de bactérias isoladas de plantas leguminosas e de gramíneas (BERGAMASCHI, 2007; ABD-ALLA et al., 2013; FERNANDES-JÚNIOR et al., 2015; SHARMA et al., 2016; FELESTRINO et al., 2017).

O AIA produzido por bactérias promotoras de crescimento vegetal atuam também como uma molécula sinalizadora importante à resposta ao estresse, favorecendo as plantas hospedeiras para superarem os estresses abióticos (OUYANG et al., 2016).

São propostas duas vias de biossíntese do AIA em plantas as quais podem ser dependente ou independente de triptofano. Entre os dependentes do triptofano encontram-se a via indol-acetamina (IAM), onde em duas etapas o triptofano é convertido inicialmente a IAM pela enzima monoxigenase e em seguida o IAM convertido em AIA pela enzima indol-3-acetamina hidrolase; a via indol-3-pirúvico (AIP) onde há desaminação do triptofano por uma aminotrasferase seguido da conversão de AIP a indol-3-acetaldeído o qual é oxidado a AIA; e ainda duas vias menos observadas incluem a via triptamina (TAM) e a via indol-3-acetamida (IAOX) (MANO & NEMOTO, 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Várias vias de biossíntese do AIA também são utilizadas por bactérias, podendo uma única estirpe bacteriana apresentar mais de uma via. O nível de expressão de AIA depende da via de biossíntese; localização dos genes envolvidos, as sequências reguladoras de DNA cromossômico ou plasmídico e a presença de

enzimas que podem converter AIA livre ativo numa forma conjugada inativa. (PATTEN & GLICK, 1996).

3.3.5 Solubilização de Fosfato

Assim como a baixa disponibilidade de N representa uma dificuldade de cultivo, o fósforo também é um nutriente mineral considerado um elemento-chave necessário ao rendimento vegetal. Ainda que seja abundante em solos em formas orgânicas ou inorgânicas, ocorre em formas insolúveis tornando a disponibilidade limitada, sendo a deficiência de P um desafio significativo para produtividade agrícola em muitas regiões do mundo (SASHIDHAR & PODILE, 2009; SIMPSON et al., 2011; SHARMA et al., 2013).

Entre as funções desempenhadas pelo P observa-se um envolvimento deste em praticamente todos os principais processos metabólicos incluindo a transdução de sinais químicos, fotossíntese, transferência de energia, biossíntese de macromoléculas e respiração (KHAN et al., 2010). As fontes adequadas de P no crescimento vegetal influenciam no desenvolvimento das fases iniciais das partes reprodutivas, sendo importantes no aumento das ramificações radiculares conferindo força, vitalidade e resistência a doenças, auxiliando também na formação de sementes e na maturação precoce de culturas, incluindo leguminosas e cereais (SHARMA et al., 2013).

A adição de fertilizantes fosfatados ao solo é adotada, porém o aproveitamento desses produtos pelas plantas é reduzido, sendo necessárias aplicações de fertilizantes em doses maiores do que a quantidade requerida pela cultura, buscando neutralizar a forte ligação do fosfato ao solo (STUTTER et al., 2012; SHARMA et al., 2013).

Outro fator que pode influenciar a necessidade de adição de fertilizantes fosfatados são as perdas em sistemas pastoris. Em pastagem, grande parte do P absorvido pelas plantas é devolvido ao solo pelos animais, representando grandes entradas do nutriente, porém, este é muitas vezes devolvido para o solo numa localização distante do ponto de consumo (SIMPSON et al., 2011; NASH et al., 2014).

A disponibilidade do fósforo na forma solúvel é de fundamental importância para suprir as necessidades nutricionais das culturas e os micro-organismos presentes no solo ajudam neste processo com o emprego de diferentes estratégias de solubilização das formas indisponíveis de fosfato favorecendo o crescimento vegetal (SASHIDHAR & PODILE, 2009). Mais significativamente micro-organismos usando estratégias tomadas a partir de sistemas naturais e interações planta-solo-micro-organismo decompõem e mineralizam P a partir de alterações orgânicas do solo (SIMPSON et al., 2011; STUTTER et al., 2012).

Bactérias diazotróficas podem favorecer o crescimento de plantas por meio de mecanismo de solubilização de formas insolúveis de fósforo a formas assimiláveis tornando disponíveis para as plantas. Diversos relatos demonstraram essa capacidade de diversos isolados caracterizados como eficientes na promoção do crescimento vegetal (GUPTA, 2013; SHARMA et al., 2016; ANTUNES, 2016).

Diferentes mecanismos são utilizados por bactérias que solubilizam fosfato tornando formas insolúveis em solúveis. Ácidos orgânicos são liberados pelos micro-organismos e estes agem como quelantes de cátions divalentes juntamente com a liberação de fosfatos a partir de compostos fosfatados insolúveis. Além disso, ácidos orgânicos podem formar complexos insolúveis com íons metálicos associados ao fósforo insolúvel sendo assim o fosfato liberado (SASHIDHAR & PODILE, 2009).

3.3.6 Produção de Sideróforos

O ferro (Fe) é um elemento essencial no desenvolvimento de quase todos os organismos vivos atuando como catalisador em alguns dos processos enzimáticos mais fundamentais como metabolismo de oxigênio, transferência de elétrons, síntese de DNA e RNA. Embora seja um elemento abundante na crosta terrestre, pode ser encontrado em forma não disponível para as plantas, em solos com valor de pH próximo ou acima de 6, encontrar-se na forma oxidada (Fe^{3+}) que se precipita e não é absorvida pelos vegetais ou como complexos de hidratos de óxido insolúveis. (FROEHLICH & FEHR, 1981; SCHALK et al., 2011)

A associação benéfica entre bactérias e plantas tem demonstrado um mecanismo de proteção contra toxicidade de metais auxiliando na promoção do crescimento vegetal, além de ser considerado importante componente tecnológico de fitorremediação, onde a compreensão dessas estratégias de sobrevivência é o

ponto chave para o melhor aproveitamento dessas associações (CHEN et al., 2016_a).

Os metais pesados são elementos considerados tóxicos para as plantas, animais e humanos, sendo também graves poluentes do mundo moderno, diante disso, há uma necessidade de remediação da poluição por esses materiais. As bactérias endofíticas podem desempenhar um importante papel na fitorremediação pelo seu potencial de atuação na remoção de contaminantes no solo, sendo notável o crescente interesse nas aplicações biotecnológicas desses micro-organismos em melhoria da agricultura sustentável. A fitorremediação é uma tecnologia emergente tendo a rizosfera e os micro-organismos simbiontes um importante papel devido ao benefício oferecido, principalmente pelas bactérias incluindo as diazotróficas através da conversão de metais pesados em formas biodisponíveis pelos processos de metilação, quelação, lixiviação e reações redox, e na produção de sideróforos (RYAN et al., 2007; ULLAH et al., 2015)

Sideróforos são agentes quelantes de baixo peso molecular produzidos por bactérias, fungos e plantas para facilitar absorção de ferro (Fe), desempenham um papel fundamental na solubilização extracelular de minerais de Fe tornando-os disponíveis. Apresentam diferentes estruturas químicas, formando uma família de pelo menos 500 compostos diferentes (SCHALK et al., 2011**;** WANG et al., 2014). Dentre os micro-organismos, diferentes bactérias vem sendo investigadas quanto a promoção de crescimento vegetal associado a produção de sideróforos, um exemplo são as bactérias do grupo *Pseudomonas* que apresentam característica fluorescente, conferida justamente por um sideróforo denominado genericamente pioverdina e produzido em condições de deficiência de ferro (SILVEIRA & FREITAS, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos diferentes. No primeiro, realizado na Embrapa Produtos e Mercados, o sorgo foi cultivado sob diferentes adubações orgânicas e regimes hídricos. Já no segundo experimento, no Campo Experimental de Bebedouro, nas dependências da Embrapa Semiárido, o sorgo e o milheto foram cultivados com e sem adubação nitrogenada. O detalhamento de cada experimento de campo utilizado para a obtenção dos isolados bacterianos encontra-se descrito a seguir.

4.1 COLETA, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS

4.1.1 - Experimento I- Sorgo cultivado com e sem restrição hídrica e adubação orgânica

4.1.1.1 Cultivo das plantas no campo e amostragem

A variedade de sorgo-forrageiro [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] BRS Ponta Negra foi cultivada no campo experimental da Embrapa Produtos e Mercados que fica situada em Petrolina-PE. As plantas foram cultivadas com e sem restrição hídrica promovida por meio da adoção de duas diferentes lâminas de irrigação representando 30% e 100% do total da demanda hídrica da cultura, calculado por meio de seu kc. Neste experimento outro tratamento aplicado foi a adubação orgânica de esterco caprino (3 L por m), perfazendo um esquema experimental fatorial: 2 (lâminas de irrigação) x 2 (aplicação ou não do esterco) com três repetições. As plantas foram semeadas em linhas de 10 m espaçadas 1 m entre linhas e 0,2 m entre plantas. Cada parcela foi constituída de 5 linhas de 10 m e as plantas foram coletadas na linha central. O experimento foi implantado em agosto de 2015 para a feira da agricultura familiar “SemiáridoShow” e as coletas ocorreram em outubro de 2015, após a realização da feira.

Em cada parcela, foram coletadas três amostras compostas por três plantas. As plantas foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e posteriormente armazenadas por 24h em câmara fria a 10 °C no Laboratório de Microbiologia do

Solo da Embrapa Semiárido para o isolamento das bactérias endofíticas. Amostras do solo de cada ponto de coleta foram retiradas para caracterização da fertilidade de acordo com Embrapa (1997) Os resultados demonstraram as seguintes características químicas: pH= 5,4; C.E.= 0,35 (dS/m), P= 2,30 (mg dm^{-3}) K=0,07(cmolc/dm^{-3}), não foram realizadas correções de solo neste experimento.

4.1.1.2 Isolamento e purificação de bactérias endofíticas

Com o objetivo de isolar os micro-organismos endofíticos da raiz seguiu-se a metodologia de Döbereiner et al. (1995). O excesso de solo da raiz foi removido e 10 g de raiz foi lavada em água corrente. A desinfestação superficial foi realizada por meio da imersão por 10 minutos em uma solução de NaClO (2% v/v), sendo o excesso do agente sanitizante removido por diversas lavagens em água destilada esterelizada (ADE). Posteriormente, a raiz foi triturada em um miniprocessador com 90 mL de NaCl 0,85% (p/v) para a obtenção das suspensões. Casa suspensão foi diluída seriadamente até a diluição 10^{-4}.

Alíquotas de 0,1 mL das suspensões foram inoculadas em triplicata em frascos de vidro contendo 7 mL dos meios de cultura NFb, JMV, LGI, LGI-P (DOBEREINER et al., 1995) e BMGM (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001) semissólidos recomendados para o isolamento de bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas. Os frascos com os meios inoculados foram incubados a 28º C, por dez dias. Aqueles que desenvolveram película microaerofílica característica foram selecionados e reinoculados no mesmo meio de cultura respectivo e mantidos em crescimento por dez dias.

Avaliando o crescimento das bactérias nas diferentes repetições, a concentração total de bactérias diazotróficas foi determinada pelo método do número mais provável (NMP) (HUNGRIA & ARAUJO, 1994). Os isolados que desenvolveram película novamente foram plaqueados em placas de Petri contendo os mesmos meios sólidos e as colônias apresentando diferentes morfologias foram inoculadas nos respectivos meios semissólidos para confirmação de da capacidade diazotróficas.

Após a confirmação as bactérias foram reinoculadas em placa de Petri contendo os respectivos meios sólidos e para a obtenção das colônias puras. Posteriormente, as colônias purificadas foram novamente inoculadas no meio semissólido para confirmação da formação de película, dos tubos positivos que apresentaram formação de película foram plaqueados os isolados em meio sólido e preservados em meio líquido com glicerol (25 %), armazenados em freezer a –20 ºC e –80 ºC na Coleção de Micro-organismos de interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CMISA).

4.1.2 – Experimento II - Sorgo e Milheto cultivados com e sem adubação nitrogenada

4.1.2.1 Cultivo das plantas no campo e amostragem

Duas variedades de sorgo *Sorghum bicolor* BRS Ponta Negra e SF 150 e uma variedade de milheto *Penissetum glaucum*, BRS 1501, foram implantadas no Campo Experimental de Bebedouro da Embrapa Semiárido situado em Petrolina, PE. Foram implantadas duas linhas de cada variedade com a extensão de aproximadamente 50 m. As linhas de cada variedade foram plantadas com distância de 1m entre linhas e 0,2 m entre plantas. As linhas de 50 m foram divididas ao meio e das metades foi adubada com fertilizante nitrogenado na forma de ureia (45% N) na dose de 100 kg N ha^{-1}. A adubação nitrogenada foi dividida em duas aplicações sendo uma aos 7 e outra aos 35 dias após o plantio.

Uma amostra composta do solo de cada ponto de coleta foram retiradas para caracterização da fertilidade de acordo com Embrapa (1997) Os resultados demonstraram as seguintes características químicas: pH= 6,7, matéria orgânica= 5,9 (g/k), P= 34,40 (mg dm^{-3}), K=0,5 (cmolc/dm^{-3}). A adubação fosfatada foi feita em toda a área com superfosfato simples (18% de P_2O_5) na dose de 20 kg P_2O_5 ha^{-1}. A adubação potássica foi realizada com cloreto de potássio (60% de K_2O) na dose de 20 kg de K_2O ha^{-1}. Cada parcela foi constituída de aproximadamente 8 m lineares nas duas linhas de cada variedade.

Para a coleta das plantas, as amostras foram compostas de três plantas colhidas aleatoriamente em cada parcela. A coleta e o acondicionamento das plantas foram feito de acordo com o descrito no item 4.1.1.1.

4.1.4 Isolamento e purificação de bactérias endofíticas

Com o objetivo de isolar os micro-organismos seguiu-se a metodologia de (DÖBEREINER et al., 1995). Para o isolamento das bactérias, foram preparadas três diferentes suspensões bacterianas contendo as bactérias isoladas da superfície da raiz, do interior da raiz e do colmo, conforme descrito a seguir.

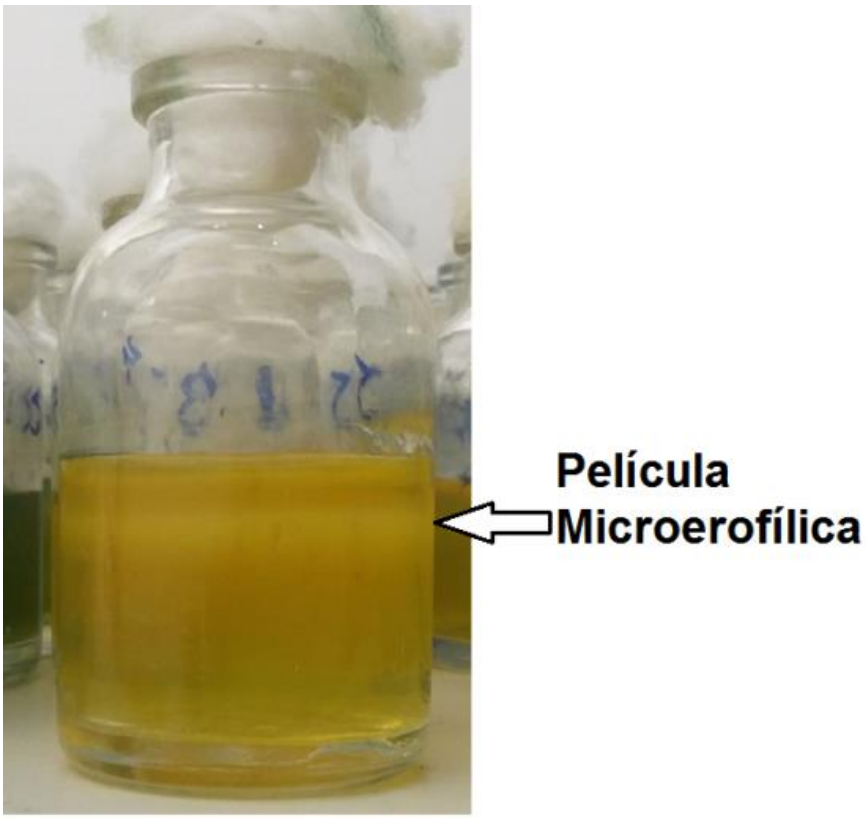
A suspensão da superfície da raiz, chamada de suspensão 1, foi obtida a partir de 10 g de raiz lavadas levemente em água corrente. A essas amostras de raiz foi adicionado 90 mL de NaCl (0,85 % p/v) e em seguida agitada manualmente de forma vigorosa. A solução salina resultante foi utilizada para as diluições seriadas. Para a obtenção da suspensão 2, com o objetivo de isolar os micro-organismos endofíticos, a raiz foi manipulada conforme descrito no subitem 4.1.1.2.

A partir das amostras de colmo foi obtida a suspensão 3. Utilizou-se a região do colo ou coleto, que é parte de transição da raiz para o colmo. Para cada planta, 10 g do colmo foi desinfestado superficialmente e triturado em solução salina conforme descrito para as amostras de raiz (subitem 4.1.1.1).

As três suspensões obtidas (Suspensões 1, 2 e 3) para cada uma das parcelas foram diluídas seriadamente até a diluição $10^{-3.}$ As diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3}, para cada uma das suspensões, foram inoculadas, em triplicata, em meio semissólido para a obtenção dos micro-organismos capazes de fixar o N em condições microaerofílicas. (DÖBEREINER et al., 1995). Alíquotas de 0,1 mL das suspensões foram inoculadas em triplicata em frascos de vidro contendo 7 mL dos meios de cultura NFb, JMV, LGI, LGI-P (Dobereiner et al., 1995) e BMGM (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001) semissólidos recomendados para o isolamento de bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas. Os frascos com os meios inoculados foram incubados a 28º C, por dez dias. Aqueles que desenvolveram película microaerofílica característica (Figura1) foram selecionados e reinoculados no mesmo meio de cultura e mantidos em crescimento por dez dias.

A concentração de bactérias nos tecidos vegetais avaliados foi determinada de acordo com a metodologia de NMP conforme descrito acima. Da mesma forma, a purificação e estoque dos isolados foram realizados como descrito anteriormente

Figura 1**.** Película microerofílica formada por meio da inoculação de uma suspensão de raiz de milheto em meio JMV. Foto: Jéssica Fernanda da Silva.



4.2 ANÁLISES MOLECULARES

4.2.1 Extração de DNA

Todas as bactérias isoladas estocadas foram reativadas e cultivadas em placas de Petri contendo os meios de cultura utilizados no isolamento. Colônias isoladas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido Dyg's (RODRIGUES NETO et al., 1986) e mantidas sob agitação constante de 120 rotações por minuto (rpm) por 48h em agitador orbital. Após o período de crescimento, o DNA das amostras foi extraído com Kit de extração de DNA genômico bacteriano Wizard Genomic DNA Clean-Up System (Promega) conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA foram armazenadas a –20 ºC até manipulações futuras.

4.2.2 Amplificação de um fragmento do gene *nif*H

A caracterização genotípica dos micro-organismos endofíticos isolados foi realizada a partir da amplificação de um fragmento do gene *nif*H que codifica uma subunidade da enzima dinitrogenase que atua no complexo enzimático nitrogenase, responsável pela fixação de nitrogênio.

O gene *nif*H foi amplificado por PCR direta utilizando-se os iniciadores PolF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3') e PolR (5'ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') (POLY et al., 2001), amplificando um fragmento de 360 pb do gene *nif*H aproximadamente. E quando adotada a estratégia de nested-PCR utilizados os iniciadores *nif*Hfor (ACCCGCCTGATCCTGCACGC) *nif*Hrev (ACGATGTAGATTTCCTGGGC) (SOARES et al., 2006).

Para cada reação de PCR foi preparado um mix de soluções, ajustado para 10 uL, contendo tampão 1x, $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 6 mM, 1,0 µM de cada iniciador PolF e PolR ou *nif*Hfor e *nif*Hrev e 1U de Taq DNA polimerase. As condições da reação consistiram em um ciclo de desnaturação inicial (5 minutos a 94 ºC); 35 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94 ºC), anelamento (45 segundos a 55 ºC); extensão (1 minuto a 72 ºC); um ciclo de extensão final (10 minutos a 72 ºC) e manutenção das amostras a 4 ºC final em termociclador Veriti 96 well (Applied

Biosystems). Os produtos da PCR foram corados com GelRed, (Biotium) separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e observados em transiluminador UV.

Os isolados considerados positivos para a amplificação foram selecionados para avaliação dos mecanismos de promoção do crescimento *in vitro*.

4.2.3 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Para a identificação dos isolados o gene 16S rRNA de cada um dos isolados considerados "*nif*H positivos" foi amplificado e sequenciado. O gene 16S rRNA foi amplificado em uma reação de PCR com volume final de 30 µl, o mix de soluções foi preparado com tampão 1x, $MgCl_2$ 3,0 mM, dNTP 1,0 mM, 1,0 U taq DNA polimerase, água, 0,75 µM de cada iniciador 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (TACGGYTACCTTGTTACG) (WEISBURG et al.,1991). As condições da reação foram de uma etapa de desnaturação inicial a 94 ºC por 5 min, anelamento 1 min a 58 ºC; seguido de 35 ciclos com 1 min a 94 ºC, 2 min a 72 ºC e 5 min de extensão final a 72 ºC. Os produtos da PCR foram purificados o Kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) e enviados para o sequenciamento na empresa Macrogen, Coreia do Sul. A qualidade das sequências foi verificada utilizando o programa SeqScanner 2.0 (Applied Biosystems). As sequências foram comparadas com aquelas disponíveis na plataforma EZBiocloud (YOON et al., 2017).

4.2.4 Amplificação dos genes *rpo*B, *recA, atpD*, *glnII* e da região ITS

O gene *rpo*B foi inicialmente amplificado para sequenciamento parcial e identificação dos isolados juntamente ao 16S rRNA, visando uma caracterização com a abordagem polifásica. Porém, ao apresentar padrões polimórficos inesperados entre diferentes grupos demais genes constitutivos *rec*A*, atp*D*, gln*II foram amplificados, além da região ITS pelo método RISA (Ribossomal Intergenic Space Analysis – CARDINALE et al., 2004) utilizado para comparação dos padrões polimórficos.

Foram selecionados isolados pertencentes aos diferentes gêneros identificados para análise dos padrões polimórficos de amplificação com os primers *rpo*BF (CCTSATCGAGGTTCACAGAAGGC) e *rpo*BR (AGCGTGTTGCGGATATAGGCG) as condições de reação consistiram em uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C

por 5 min, 3 ciclos de desnaturação por 2 min a 94 °C, anelamento por 2 min a 58°C, e extensão por 1 min a 72 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturação por 30s a 94°C, anelamento por 1 min a 58 °C, extensão por 1 min a 72 °C e extensão final por 5 min a 72°C. Para a amplificação com os iniciadores *rec*AF (CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG) e *rec*AR (CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG), *atp*DF (TCTGGTCCGYGGCCAGGAAG) e *atp*DR (CGACACTTCCGARCCSGCCTG) e *gln*IIF (AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG) e glnIIR (SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCG) as condições consistiram em uma etapa de desnaturação inicial por 2 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação por 45s a 95 °C, anelamento por 30s a 58 °C, extensão por 1,5 min a 72 °C e extensão final por 7 min a 72 °C. Os fragmentos foram corados com GelRed e submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% (p/v) e observados em transiluminador UV. Em seguida foram analisados os padrões polimórficos obtidos, comparando o agrupamento dos diferentes gêneros com o perfil de amplificação da região ITS com os iniciadores ITSF (GTCGTAACAAGGTAGCCGTA) e ITSR (GCCAAGGCATCCACC) nas condições de uma etapa de desnaturação inicial por 3min a 94 ºC seguido de 30 ciclos de desnaturação por 45s a 94 ºC, anelamento por 1min a 55 ºC, extensão por 2 min a 72 ºC e extensão final por 7 min a 72 ºC.

4.3 MECANISMOS DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO *IN VITRO*

4.3.1 Produção de Compostos Indólicos

A produção de compostos indólicos foi quantificada para 108 isolados selecionados a partir da caracterização molecular, tendo *Azospirillum brasiliense* (Ab-V5) como bactéria de referência, tendo como base o método colorimétrico desenvolvido por Sarwar e Kremer (1995). A partir de um pré-inóculo, as bactérias foram inoculadas em 5 mL do meio líquido Dyg's com e sem suplementação com triptofano, e incubadas sob agitação constante durante sete dias (100 rpm). Após o período de crescimento a densidade ótica (DO) dos isolados foi avaliada em espectrofotômetro a 540 nm e ajustada para DO_{540} 0,3. Posteriormente alíquotas de 1 mL das culturas foram centrifugadas por 3 min a 6000g. Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi adicionado em placa multipoços e sobre este 100 µL de reagente Salkowski (2% de Fe Cl_3 0,5M em 35% de ácido perclórico) em seguida foram incubadas no escuro por 30 min, após esse período as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva padrão foi previamente obtida de concentrações conhecidas de AIA sintético para estimativa de produção de compostos indólicos pelos isolados bacterianos.

4.3.2 Produção de Sideróforos

Para avaliação da produção de Sideróforos foi utilizada a metodologia preconizada por Schwyn e Neilands (1987), sendo adaptada como método quantitativo. As bactérias foram crescidas em meios Dyg's líquido por 48 h sob agitação constante (100 rpm). Uma alíquota de 1 mL da cultura foi centrifugada e 100 µL do sobrenadante adicionado em placa multipoços sobre este 100 µL do reagente CAS (6 mL de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio-HDTMA; 1,5 mL de solução de $FeCl_3.6H_2O$; 4,307 g de piperazina anidra; 6,25 mL HCl). A placa foi incubada no escuro por 15 min, observando a mudança da coloração de azul para laranja em uma avaliação qualitativa da produção, e para quantificação as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 630 nm tendo uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas de EDTA para estimar a produção de sideróforos pelos isolados.

4.3.3 Solubilização de Tri-fosfato de Cálcio

As bactérias foram submetidas à avaliação da capacidade em solubilizar fosfato inorgânico realizada segundo a metodologia descrita por Sylvester-Bradley et al. (1982). Os isolados foram cultivados em meio líquido Dyg's e alíquotas de 10 µl foram inoculadas em meio sólido contendo glicose (10 g L^{-1}), extrato de levedura (0,5 gL^{-1}) e ágar (15 gL^{-1}) em triplicata. Ainda, antes da distribuição do meio em placas, cloreto de cálcio (10% 100 mL L^{-1}) e fosfato de sódio bibásico (10% 50 mL L^{-1}) foram adicionados e homogeneizados. As placas foram incubadas por 15 dias e a capacidade de solubilização do fosfato foi avaliada por meio da formação do halo translúcido ao redor das colônias. O índice de solubilização foi calculado pela razão do diâmetro do halo de solubilização pelo diâmetro da colônia bacteriana que foram medidos com auxílio de uma régua milimetrada.

4.3.4 Análise dos dados

Todos os experimentos para avaliação dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal *in vitro* foram conduzidos com três repetições. Os dados foram avaliados quanto a distribuição normal e submetidos à análise de variância e comparação de médias por meio do teste de Skott-Knott (p>0,05%). Para as análises, o programa Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2013) foi utilizado.

4.4 EFICIÊNCIA NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL

4.4.1 – Implantação, condução e coleta dos experimentos

Três ensaios foram conduzidos para avaliar a promoção do crescimento *in vivo* dos isolados provenientes dos dois experimentos. O primeiro ensaio foi conduzido com o cultivo de sorgo em vasos a pleno sol no setor do Metabolismo Animal da Embrapa Semiárido, localizado em Petrolina-PE no período de Junho a Agosto de 2016. A variedade de sorgo-forrageiro BRS Ponta negra foi utilizada. As sementes foram inoculadas no momento do plantio com 28 isolados selecionados originários do isolamento de plantas de sorgo cultivadas no campo experimental da Embrapa Produtos e Mercados (experimento I).

Além da inoculação dos 28 isolados, foi avaliado o tratamento inoculado com a estirpe de referência de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5), dois tratamentos sem inoculação e com a adubação nitrogenada (50% e 100% de nitrogênio demandado pela cultura em uma dose de 100 kg N ha^{-1}) e a testemunha absoluta (sem inoculação e sem adubação) em quatro repetições, que totalizaram 128 unidades experimentais. Amostras superficiais de um Argissolo Vermelho-Amarelo coletado no campo experimental do Bebedouro da Embrapa Semiárido foi utilizado como substrato. E as plantas foram coletadas aos 55 dias após o plantio.

Um segundo ensaio foi realizado como os isolados obtidos de plantas de sorgo cultivadas no campo Experimental de Bebedouro (experimento II). O experimento foi implantado e conduzido nas mesmas condições de cultivo do primeiro ensaio utilizando-se a variedade de sorgo forrageiro BRS Ponta negra para inoculação dos isolados do sorgo. Neste ensaio foram avaliados 33 isolados bacterianos do sorgo, além dos tratamentos controle descritos acima. Assim, este ensaio foi constituído de 148 unidades experimentais.

No terceiro experimento, a variedade de milheto BRS 1501 foi utilizada como planta para inoculação de isolados do milheto obtidos a partir do experimento de campo II conduzido no Campo Experimental de Bebedouro. O experimento foi implantado e conduzido nas mesmas condições de cultivo dos primeiros ensaios.

O segundo e o terceiro experimentos foram implantados em novembro de 2016 e colhidos em janeiro de 2017. O milheto foi coletado aos 47 dias após a

emergência das plantas (DAE) e o sorgo aos 54 DAE para avaliação da massa seca da raiz e parte aérea e o nitrogênio total acumulado (descritos a seguir).

Para a inoculação nos três experimentos, os isolados bacterianos foram crescidos em meio líquido Dyg's por 48 h até atingirem o final da fase exponencial do crescimento (em torno de 10^9 células por mL). Foram semeadas quatro sementes por vaso e a inoculação de 2 mL do caldo de cultivo por semente foi realizada, logo após o plantio, diretamente sobre as sementes que foram em seguida cobertas com solo. Aos 10 DAE um desbaste foi realizado e foram deixadas duas plantas por vaso. Os tratamentos nitrogenados receberam 50% da dose de N na forma de ureia aos 4 DAE e os 50% restantes aos 24 DAE.

Para os tratamentos inoculados, foi realizada uma reinoculação das plantas com os mesmos isolados bacterianos aos 24 DAE. As plantas foram irrigadas com água destilada duas vezes ao dia. Aos 45 dias de cultivo as plantas foram coletadas separando-se raiz e parte aérea para secagem a 65 ºC em estufa de circulação forçada de ar até atingirem peso constante. Foram determinadas a massa das raízes e partes aéreas secas por pesagem. Para a quantificação do teor de nitrogênio acumulado na parte aérea, as mesmas foram moídas em moinho tipo Wiley. A quantificação do N se deu em um analisador elementar TruSpec LecoSorb CN (Leco, EUA), por meio do método da combustão seca. O nitrogênio acumulado na parte aérea foi calculado por meio da multiplicação do teor de nitrogênio (em %) pela massa da parte aérea (em g) x 10 (fator de correção).

4.4.2 – Análise dos dados

Para os ensaios de avaliação da capacidade de promoção do crescimento vegetal, os dados foram avaliados quanto a distribuição normal e submetidos à análise de variância e comparação de médias por meio do teste de Skott-Knott com significância de ($p>0,05\%$ ou $p> 0,1\%$) com o emprego da transformação dos dados em $(x +1)^{0,5}$ utilizando-se o programa Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação e isolamento das bactérias diazotróficas

5.1.1 Experimento I – Sorgo cultivado sob diferentes condições de adubação e irrigação.

A população de bactérias diazotróficas encontrada variou entre 35,7 à 91,7 x 10^3 UFC por grama de raiz entre os isolados do sorgo. (Tabela 1.)

Tabela 1. Estimativa das populações de isolados bacterianos potencialmente diazotróficos associados ao sorgo (experimento I) pela técnica de número mais provável (NMP) com probabilidade de 95%.

Irrigação + Adubação	Repetição	NMP	IC (min)	IC (max)
30% C	R1	35,7x 10^3	8,7	205,8
	R2	91,7x 10^3	28,8	377,3
100% C	R1	35,7x 10^3	8,7	205,8
	R2	91,7x 10^3	28,8	377,3
30%S	R1	35,7x 10^3	8,7	205,8
	R2	91,7x 10^3	28,8	377,3
100%S	R1	91,7x 10^3	28,8	377,3
	R2	35,7x 10^3	8,7	205,8
	R3	91,7x 10^3	28,8	377,3

(C: com adição de esterco caprino, S: sem adição, 30%: lâmina de 30% de irrigação, 100%: lâmina de 100% de irrigação).

Tabela 2. Número de isolados obtidos do sorgo (*Sorghum bicolor*) BRS Ponta Negra cultivados no Campo Experimental da Embrapa Produtos e Mercados, considerados positivos para formação de película microaerofílica.

Tratamento	NFb	LGI	JMV	BMGM	Total
30% C	7	2	0	0	9
100% C	6	0	7	2	15
30% S	1	2	6	0	9
100% S	1	0	0	2	3
Total	**15**	**4**	**13**	**4**	**36**

(30%: lâmina com 30% de irrigação, 100%: lâmina com 100% de irrigação, S: sem esterco, C: com esterco).

Em relação à distribuição das bactérias potencialmente diazotróficas 41,7% foram isolados no meio NFb, 11,1% no LGI, 36,11% em JMV e 11,11% no meio BMGM (Tabela 2.).

5.1.2 Experimento II- Sorgo e Milheto cultivado com e sem adubação nitrogenada

Os valores variaram entre 0,057x 10^4 a 366,17x10^4 UFC g $^{-1}$ de amostra vegetal do sorgo e de 0,0357 à 91,7x 10^4 UFC g $^{-1}$ de amostra vegetal do milheto. (Tabelas 3 e 5).

Tabela 3. Estimativa das populações de isolados bacterianos potencialmente diazotróficos associados ao sorgo (experimento II) pela técnica de número mais provável (NMP) com probabilidade de 95%.

Variedade	Adubação	Nicho	Repetição	NMP	IC (min)	IC (max)
Sorgo SF 150	N+	Superfície da raiz	R1	9,527x 10^4	3,75	39,788
			R2	0,37x 10^4	0,87	2,10
			R3	357,92x 10^4	8,99	209,57
		Endofítico da raiz	R1	186,97x 10^4	58,47	775,18
			R2	35,7x 10^4	8,7	205,8
			R3	12,74x 10^4	3,75	58,31
		Superfície da raiz	R1	3,57x 10^4	0,87	20,58
			R2	3,57x 10^4	0,87	20,58
	N-	Superfície da raiz	R1	3,57x 10^4	0,87	20,58
			R2	357,36x 10^4	87,09	2060,06
		Endofítico da raiz	R1	3,57x 10^4	0,87	20,58
			R2	366,17x 10^4	89,88	58,31
		Endofítico do colmo	R2	3,57x 10^4	87	20,58
Sorgo BRS Ponta negra	N+	Superfície da raiz	R1	360,57x 10^4	87,87	2078,58
		Endofítico da raiz	R1	357x 10^4	87	2058
			R2	357x 10^4	87	2058
	N-	Superfície da raiz	R1	0,057x 10^4	0,0087	0,2058
		Endofítico do colmo	R1	360,57x 10^4	87,87	2078,58

(N+: com adição de nitrogênio, N-: sem adição de nitrogênio).

Dentre os isolados do sorgo neste experimento, 17,64% das bactérias foram isoladas em meio NFb, 11,76% em LGI, 35,29% em meio BMGM e em JMV (Tabela 4.).

Tabela 4. Número de isolados obtidos do sorgo (*Sorghum bicolor*) BRS Ponta Negra e SF 150 cultivados no Campo Experimental de Bebedouro, considerados positivos para formação de película microaerofílica.

Variedade	Nicho	Adubação	NFb	LGI	BMGM	JMV	Total Isolados
BRS Ponta Negra	Raiz S	c/N	2	0	1	2	5
	Colmo	c/N	0	0	0	0	0
	Raiz E	c/N	1	0	2	0	3
	Raiz S	s/N	2	0	1	0	3
	Colmo	s/N	0	0	1	0	1
	Raiz E	s/N	0	0	0	0	0
SF 150	Raiz S	c/N	1	0	2	9	12
	Colmo	c/N	0	0	2	0	2
	Raiz E	c/N	2	1	2	7	12
	Raiz S	s/N	0	2	2	0	4
	Colmo	s/N	1	2	0	0	3
	Raiz E	s/N	0	1	5	0	6
	Total		9	6	18	18	51

(S: superfície, E: endofítico, s/N: sem nitrogênio, c/N: com nitrogênio)

Tabela 5. Estimativa das populações de isolados bacterianos potencialmente diazotróficos associados ao milheto (experimento II) pela técnica de número mais provável (NMP) com probabilidade de 95%.

Adubação	Isolamento	Repetição	NMP	IC (min)	IC (max)
N+	Superfície da raiz	R1	$9{,}17 \times 10^4$	2,88	37,73
		R2	$0{,}0357 \times 10^4$	0,0087	0,2058
		R3	$0{,}357 \times 10^4$	0,087	2,058
	Endofítico da raiz	R1	$35{,}7 \times 10^4$	8,7	205,8
		R2	917×10^4	288	3773
	Endofítico do colmo	R1	$91{,}7 \times 10^4$	28,8	37,73
		R2	357×10^4	87	2058
N-	Superfície da raiz	R1	$0{,}357 \times 10^4$	0,087	2,058
		R2	$0{,}357 \times 10^4$	0,087	2,058
	Endofítico da raiz	R1	$9{,}17 \times 10^4$	28,8	37,73
		R2	$9{,}17 \times 10^4$	28,8	37,73
		R3	357×10^4	87	2058
	Endofítico do colmo	R1	$91{,}710^4$	28,8	37,73
		R2	$3{,}57 \times 10^4$	0,87	20,58
		R3	$3{,}57 \times 10^4$	0,87	20,58

(N+: com adição de nitrogênio, N-: sem adição de nitrogênio).

Em relação à distribuição das bactérias diazotróficas associadas ao milheto 27,9% foram isoladas no meio NFb, 39,53% no meio LGI, 4,65% em BMGM e 27,9% em JMV (Tabela 6.)

Tabela 6. Número de isolados obtidos do milheto (*Penissetum glaucum*) BRS 1501 cultivado no Campo Experimental de Bebedouro, considerados positivos para formação de película microaerofílica.

Tratamento	Adubação	NFB	LGI	BMGM	JMV	Total
Raiz S	c/N	1	5	2	2	10
Colmo	c/N	3	2	0	0	5
Raiz E	c/N	2	2	0	1	5
Raiz S	s/N	0	2	0	1	3
Colmo	s/N	0	1	0	3	4
Raiz E	s/N	6	5	0	5	16
Total		12	17	2	12	43

(S: superfície, E: endofítico)

São escassos os relatos sobre a quantificação e caracterização de bactérias diazotróficas associadas ao sorgo e ao milheto sendo mais comumente relatada a eficiência de bactérias diazotróficas isoladas de plantas como milho, arroz e trigo (KUSS et al., 2007; BERGAMASCHI, 2007; SALAMONE et al., 2012; ABD-ALLA et al., 2013; JI et al., 2014).

A densidade total de bactérias potencialmente diazotróficas observada no experimento I demonstrou um equilíbrio entre os tratamentos de adubação com esterco e irrigação. Levando em consideração o número de repetições e de isolados considerados positivos após a purificação, foram obtidos mais isolados das amostras do sorgo cultivado na área com a lâmina de 100% da irrigação necessária e com adubação orgânica com esterco caprino. Segundo Kipe-Nolt et al. (1985) os genótipos de sorgo tem mostrado diferentes níveis de atividade enzimática da nitrogenase dos isolados associados, sendo influenciada por diferentes fatores bióticos e abióticos que são diretamente relacionados à composição e liberação dos exsudatos radiculares pelas plantas, que determinam as interações e o estabelecimento de micro-organismos promotores de crescimento.

No presente trabalho a maior disponibilidade de água pode ter favorecido a liberação de exsudatos radiculares, permitindo assim uma maior colonização por micro-organismos no tratamento com adubação orgânica. Porém, o sorgo é uma

cultura adaptada a condições de baixa disponibilidade hídrica e outras condições desfavoráveis, desse modo as bactérias promotoras de crescimento vegetal auxiliam suprindo as necessidades nutricionais para a resistência da cultura (SUTKA et al., 2016) o que justifica o número de isolados diazotróficos também obtidos dos tratamentos com baixa disponibilidade hídrica com ou sem adubação com esterco.

Em relação aos genótipos avaliados no experimento II foi observado que dos 94 isolados, 43 foram provenientes do milheto (BRS 1501) e 51 das duas variedades de sorgo (SF 150 e BRS Ponta Negra), sendo destacada melhor associação das bactérias diazotróficas com o milheto e ainda uma diferença entre as variedades do sorgo. Gupta et al. (2013), ao estudar o padrão de colonização de isolados bacterianos endofíticos de diferentes partes do milheto e em diferentes estágios do crescimento vegetal, encontraram valores totais de 0,2-8,6 × 10^4 UFC g $^{-1}$ de peso fresco de material vegetal, sendo semelhante aos resultados desse estudo.

Segundo Doberëiner (1997) o processo de FBN em plantas não leguminosas é influenciado pelo genótipo da planta e a competitividade entre micro-organismos locais, os fatores abióticos do meio e a interação direta de bactérias e gramíneas podem determinar a diversidade de micro-organismos diazotróficos encontrados. Além disso, a variedade de exsudatos liberados pelas plantas pode variar entre os genótipos influenciando a associação com os micro-organismos (BERGAMASCHI et al., 2007). O que pode justificar as diferenças na variação de isolados do sorgo e milheto estudadas.

Comparando o sucesso de colonização nos diferentes nichos ecológicos, observa-se que no milheto a maioria dos isolados foi resultante da raiz das plantas cultivadas sem adubação nitrogenada em colonização endofítica, o que sugere a maior efetividade das bactérias para suprir, mesmo que parcialmente a demanda de N da cultura em solo com deficiência de N (SARATHAMBAL et al., 2015). Além disso, as bactérias endofíticas podem ter uma vantagem sobre bactérias associativas e rizobactérias já que se estabelecem dentro dos tecidos das plantas em nichos menos competitivos com melhores condições de fixação e assimilação do N (CARVALHO et al., 2014).

Já em relação ao sorgo, o maior número de micro-organismos potencialmente diazotróficos foi variável entre os diferentes nichos sendo no sorgo BRS Ponta

Negra cultivado com adição de N, a superfície radicular melhor hospedeira para os isolados e a colonização endofítica e da superfície das raízes do sorgo SF 150 sendo equivalentes em número de isolados.

O metabolismo das diferentes fontes de carbono, nos diferentes meios de cultura utilizados neste estudo, representa um mecanismo de pré-seleção de bactérias, pois permite estimar as características das culturas e os grupos isolados em comparação com padrões de bactérias diazotróficas já descritas (VIDEIRA et al., 2007). São comuns relatos de isolamento de bactérias dos gêneros *Azospirilum* e *Herbaspirilum* em associação com gramíneas forrageiras como *Azospirilum brasilense* e *Azospirilum lipoferum* isolados com o meio semissólido NFb (REIS JÚNIOR et al., 2004; BRASIL et al., 2005), assim como o isolamento de *Azospirilum amazonense* utilizando-se o meio LGI (DÖBEREINER et al., 1995, REIS JÚNIOR et al., 2004) e de isolados de *Burkholderia* (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001) *Enterobacter* e *Bacillus* (FERNANDES-JÚNIOR et al., 2015). Assim, a utilização de diferentes meios de cultura é uma estratégia importante que pode nos permitir acessar maior diversidade de bactérias com exigências nutricionais distintas.

5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

5.2.1 Amplificação do gene *nif*H dos isolados

Por meio da amplificação de um fragmento do gene *nif*H foi observado um amplicom de 360 pb em 29 dos 36 isolados do sorgo (experimento I) (Figura 2) e 38 dos 42 isolados provenientes do milheto (experimento II) (Figura 3), utilizando os iniciadores PolF e PolR.

Figura 2. Amplificação de um fragmento do gene *nif*H com iniciadores PolF e PolR dos isolados do sorgo (experimento I). Isolados de 1 a 36 seguidos de duas bactérias de BR 3299 (*Microvirga vignae*) e BR 3262 (*Bradyrhizobium pachyrhizi*) respectivamente, M= marcador 100 pb DNA Ladder.

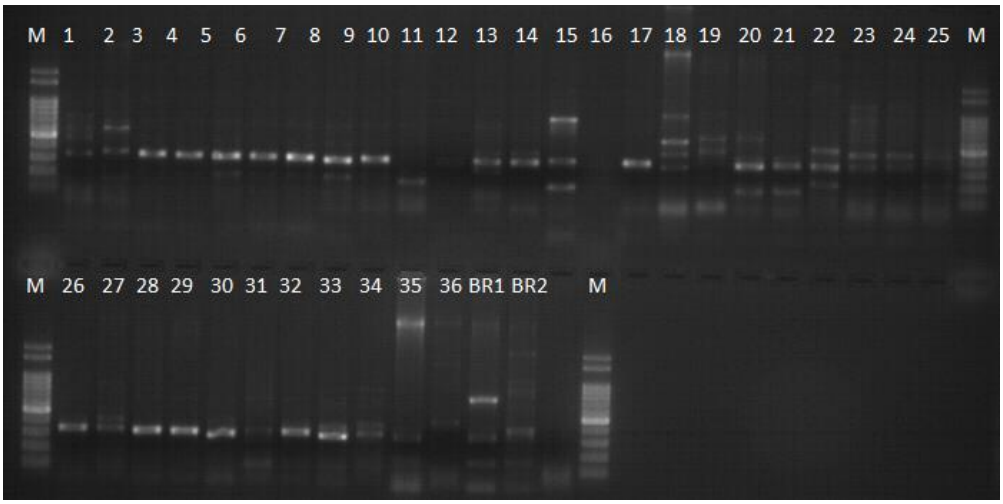
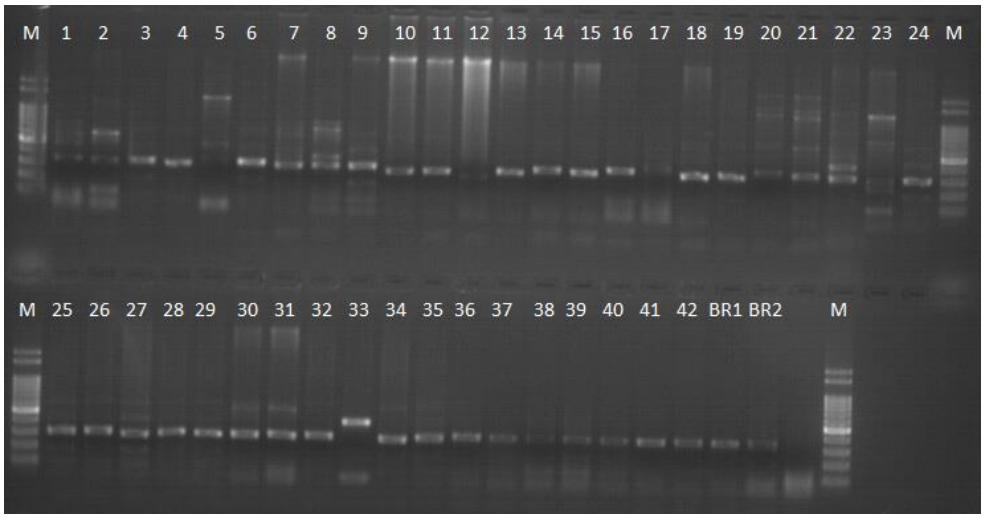


Figura 3. Amplificação de um fragmento do gene *nif*H com iniciadores PolF e PolR dos isolados do milheto (experimento II). Isolados de 1 a 42 seguidos de duas bactérias de BR 3299 (*Microvirga vignae*) e BR 3262 (*Bradyrhizobium pachyrhizi*) respectivamente, M= marcador 100 pb DNA Ladder.



Os resultados pela amplificação do fragmento nos isolados provenientes do sorgo (experimento II) utilizando apenas os mesmos iniciadores não foram satisfatórios (Figura 4.), pois apenas 16 bactérias apresentaram a amplificação positiva de um total de 46 isolados. Contudo foi adotada a estratégia do nested-PCR com utilização dos iniciadores *nif*Hfor e *nif*Hrev, sendo observada uma banda menor porém, característica em 42 dos 46 isolados (Figura.5).

Figura 4. Amplificação de um fragmento do gene *nif*H com iniciadores PolF e PolR dos isolados do sorgo (experimento II). Isolados de 1 a 46 seguidos de duas bactérias de BR 3299 (*Microvirga vignae*) e BR 3262 (*Bradyrhizobium pachyrhizi*) re*sp*ectivamente, M= marcador 100 pb DNA Ladder.

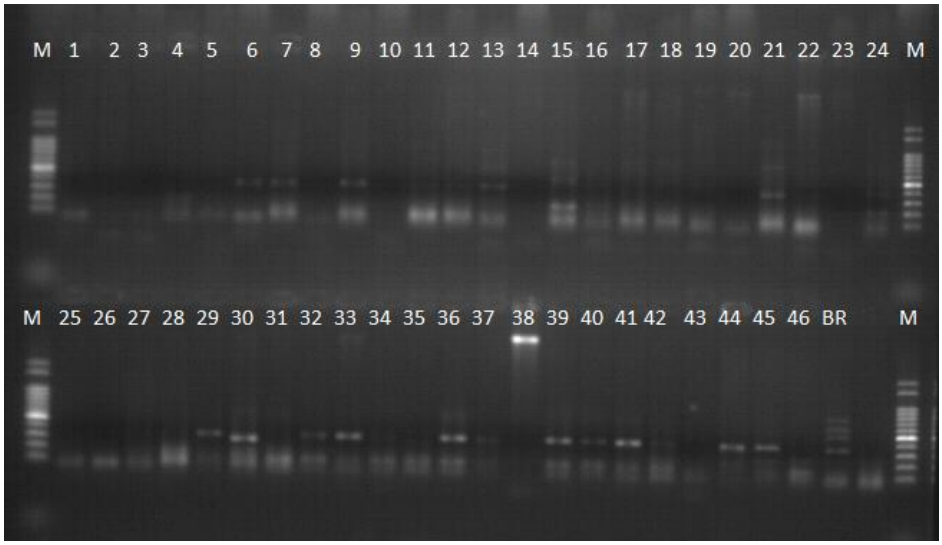
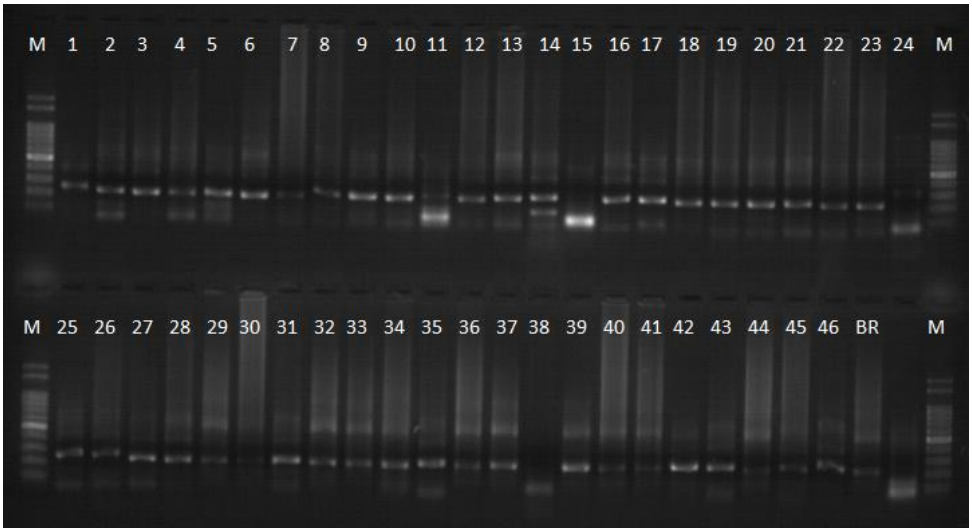


Figura 5. Amplificação de um fragmento do gene *nif*H com iniciadores *nif*Hfor e *nif*Hrev dos isolados do sorgo (experimento II). Isolados de 1 a 46 seguidos de duas bactérias de BR 3299 (*Microvirga vignae*) e BR 3262 (*Bradyrhizobium pachyrhizi*) respectivamente, M= marcador 100 pb DNA Ladder.



Os isolados considerados positivos pela amplificação do *nif*H foram selecionados para realização das avaliações posteriores com relação aos mecanismos de promoção do crescimento vegetal.

A amplificação do fragmento do gene *nif*H foi utilizada como ferramenta de seleção para bactérias potencialmente diazotróficas, por considerar os isolados que apresentam o amplicom característico com 360pb, sendo positivos quanto ao potencial de fixação biológica do nitrogênio. A análise de transcrição de gene *nif*H determina a abundância de bactérias capazes de fixar nitrogênio (SHARMA & SINGH, 2017).

Este método de seleção já é utilizado para determinar o potencial de bactérias diazotróficas, como no estudo de FERNANDES-JÚNIOR et al. (2013) ao caracterizar bactérias fixadoras de nitrogênio associadas ao arroz silvestre de forma complementar a utilização dos meios semissólidos com diferentes fontes de carbono para seleção de isolados diazotróficos assim como adotado no presente trabalho e bem como em diversos relatos existentes (JHA & KUMAR, 2009; VENIERAKI et al., 2011; SILVA et al., 2013_a; FERRANDO & ESCAVINO, 2015; FELESTRINO et al., 2017). O *nif*H também é utilizado para caracterizar comunidades de micro-organismos diazotróficos diretamente do solo (SILVA, 2013_b).

Segundo Coelho et al. (2008) o gene *nif*H que codifica a subunidade da proteína de ferro nitrogenase é o gene mais estudado minuciosamente entre os genes do *nif* operon com uma extensa coleção de sequências obtidas de micro-organismos cultivados a partir de vários ambientes, pode ser utilizado como marcador molecular tendo como principal vantagem a forte evidência para o potencial de fixação de nitrogênio, sendo relatado boa correlação entre o gene *nif*H e a filogenia do 16s rRNA para micro-organismos diazotróficos.

O gene *nif*H é frequentemente usado para examinar a fixação de nitrogênio em vários ambientes devido a alta conservação entre os procariotos e ser largamente correlacionado com 16S rRNA filogeneticamente (BOUFFAUD et al., 2016).

5.2.2 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Todos os isolados foram submetidos ao sequenciamento a partir da amplificação do gene 16S rRNA, e estão apresentados nas tabelas 7, 8 e 9. Aqueles que não apresentaram sequências satisfatórias, não puderam ser identificados.

Tabela 7. Identificação de 20 isolados bacterianos do sorgo (*Sorghum bicolor*) cultivado sob diferentes lâminas de irrigação e adubação orgânica (experimento I) por meio da comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA com aquelas disponíveis no banco de dados EzBiocloud (Yoon et al., 2017).

Isolado	Gênero	Similaridade	Tamanho do fragmento	Número de Acesso
S02	*Kosakonia* sp.	98.38%	924 pb	EF488759
S03	*Kosakonia* sp.	99.43%	877 pb	AY563134
S04	*Kosakonia* sp.	99.46%	934 pb	EF488759
S05	*Kosakonia* sp.	99.23%	914 pb	EF488759
S06	*Kosakonia* sp.	99.78%	908 pb	EF488759
S07	*Kosakonia* sp.	98.78%	924 pb	EF488759
S11	*Enterobacter* sp.	99.78%	890 pb	AB004744
S12	*Klebsiella* sp.	99.26%	811 pb	AF250285
S13	*Rhizobium* sp.	99.88%	852 pb	AF531767
S15	*Klebsiella* sp.	99.68%	932 pb	CP010523
S16	*Burkholderia* sp.	92.74%	730 pb	CP000086
S20	*Kosakonia* sp.	99.68%	939 pb	EF488759
S21	*Enterobacter* sp.	97.82%	804 pb	DQ273688
S22	*Pantoea* sp.	99.09%	882 pb	DQ504305
S24	*Enterobacter* sp.	98.93%	935 pb	Z96079
S27	*Pantoea* sp.	100%	885 pb	DQ504305
S28	*Enterobacter* sp.	99.66%	878 pb	AB004744
S29	*Enterobacter* sp.	99.46	922 pb	Z96079
S30	*Klebsiella* sp.	99.78%	927 pb	AJJI01000018
S31	*Klebsiella* sp.	99.89%	938 pb	AJJI01000018

Os isolados pertencentes à *Kosakonia* sp., representaram o grupo dominante em colonização no sorgo (experimento I) com sete isolados, dentre os 20 identificados. As bactérias apresentaram entre 98% e mais de 99% de similaridade com as sequências disponíveis no banco de dados EzBiocloud, o segundo grupo predominante abrange cinco isolados apresentando entre 97% e mais de 99% de similaridade com o gênero *Enterobacter*, seguido de quatro isolados com mais de 99% de similaridade com *Klebsiella* sp., dois isolados com similaridade entre 99% e

100% com *Pantoea* sp., um isolado com 99% de similaridade com *Rhizobium* sp. e um identificado como *Burkholderia* sp. com uma afinidade filogenética mais baixa de 92,73% de similaridade com as sequências depositadas no banco de dados.

Tabela 8. Identificação de 27 isolados bacterianos do sorgo (*Sorghum bicolor*) cultivado com e sem adição de nitrogênio (experimento II) por meio da comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA com aquelas disponíveis no banco de dados EzBiocloud (Yoon et al., 2017).

Isolado	Gênero	Similaridade	Tamanho do fragmento	Número de Acesso
SSB449	*Sphingomonas* sp.	98.01%	854 pb	CP006644
SSB452	*Rhizobium* sp.	99.58%	963 pb	AF531767
SSB453	*Rhizobium* sp.	98.69%	989 pb	AF531767
SSB454	*Pseudomonas* sp.	98.83%	854 pb	BBIV01000080
SSB456	*Sphingobium* sp.	97.99%	993 pb	JH992904
SSB457	*Rhizobium* sp.	99.79%	953 pb	AF531767
SSB462	*Rhizobium* sp.	98.87%	706 pb	AM931436
SSB463	*Burkholderia* sp.	99.90%	961 pb	JX986970
SSB464	*Rhizobium* sp.	99.77%	858 pb	AF531767
SSB465	*Stenotrophomonas* sp.	99.37%	951 pb	GQ86217
SSB466	*Chitinophaga* sp.	99.46%	932 pb	AB078049
SPB467	*Stenotrophomonas* sp.	99.23%	970 pb	JALV01000036
SPB470	*Flavobacterium* sp.	96.43%	896 pb	KP711654
SPB471	*Citrobacter* sp.	98.14%	807 pb	AF025368
SSB472	*Pantoea* sp.	97.85%	836 pb	DQ504305
SSB476	*Pseudomonas* sp.	99.78%	910 pb	AB021391
SSB481	*Burkholderia* sp.	99.23%	908 pb	AB021423
SSB482	*Burkholderia* sp.	99.57%	921 pb	AB021423
SSB483	*Stenotrophomonas* sp.	99.18%	979 pb	JALV01000036
SSB485	*Burkholderia* sp.	99.22%	774 pb	AB021423
SSB486	*Burkholderia* sp.	98.48%	984 pb	AB021423
SPB488	*Bacillus* sp.	99.70%	996 pb	AMXN00
SPB489	*Burkholderia* sp.	98.59%	990 pb	AB021423
SSB490	*Kosakonia* sp.	98.21%	896 pb	EF488759
SSB491	*Pseudomonas* sp.	100%	878 pb	AB021391
SPB492	*Rhizobium* sp.	97.95%	928 pb	AQHN01000056
SSB493	*Kosakonia* sp.	99.47%	943 pb	EF488759

1ª letra= S: Sorgo 2ª letra= S: Sacarino, P: Ponta negra, 3ª letra= B: Bebedouro

Isolados bacterianos fixadores de nitrogênio já foram obtidos previamente das raízes do sorgo e milheto apresentando grande diversidade de Enterobacteriaceae como *Klebisiela pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Erwinia herbícola,* além de

Pantoea sp. *Pseudomonas* sp. e *Rhizobium* sp. em estudos conduzidos em Minas Gerais no Brasil (COELHO et al, 2008) e na Índia (GUPTA et al, 2013).

Ao analisar os isolados associados ao sorgo do segundo experimento observa-se uma maior diversidade em grupos. Embora o isolamento de bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* seja mais comparado a relação simbiótica estabelecida com plantas leguminosas (DOBEREINER, 1997), entre os doze grupos identificados, este gênero representou um grupo com maior número de bactérias composto por seis isolados que apresentaram entre 97% e 100% de similaridade com as sequências disponíveis no banco de dados.

Os isolados de *Rhizobium* sp podem favorecer a cultura por mecanismos individuais ou associados aos mecanismos de outras estirpes agregadas. Hahn et al. (2016) ao avaliarem a inoculação e coinoculação de estirpes de *Rhizobium* sp., juntamente com um produto comercial contendo *Azospirillum* brasiliense que é uma estirpe indicada a inoculação em gramíneas, observou efeito positivo quanto a eficiência na promoção do crescimento de arroz tanto pelos isolados de forma individual quanto pela coinoculação.

O isolamento de *Rhizobium* sp. no presente trabalho corrobora com diversos relatos sobre o isolamento deste gênero também em associação com gramíneas no Brasil inclusive na região da Caatinga (PISA et al., 2011; FERNANDES-JÚNIOR et al., 2013; ZHANG et al., 2015; ANTUNES, 2016).

Tabela 9. Identificação de 24 isolados bacterianos do milheto (*Pennisetum glaucum*) cultivado com e sem adição de nitrogênio (experimento II) por meio da comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA com aquelas disponíveis no banco de dados EzBiocloud (Yoon et al., 2017).

Isolado	Gênero	Similaridade	Tamanho do fragmento	Número de Acesso
M122	*Pantoea* sp.	98.64%	588 pb	DQ504305
M123	*Pantoea* sp.	98.34%	879 pb	EU216736
M124	*Kosakonia* sp.	99.32%	589 pb	AY563134
M126	*Kosakonia* sp.	98.10%	631 pb	EF488759
M129	*Pseudomonas* sp.	92.87%	926 pb	AB021405
M131	*Pseudomonas* sp.	98.42%	824 pb	AB021405
M134	*Burkholderia* sp.	99.67%	916 pb	AB021423
M135	*Burkholderia* sp.	99.78%	925 pb	AB021423
M136	*Burkholderia* sp.	99.56%	912 pb	AB021423
M139	*Burkholderia* sp.	99.76%	925 pb	AB021423
M140	*Kosakonia* sp.	99.67%	915 pb	EF488759
M141	*Rhizobium* sp.	100%	907 pb	FJ969841
M142	*Rhizobium* sp.	100%	929 pb	AF531767
M144	*Enterobacter* sp.	99.77%	887 pb	AB004744
M145	*Kosakonia* sp.	99.24%	924 pb	EF488759
M146	*Kosakonia* sp.	99.75%	925 pb	EF488759
M147	*Kosakonia* sp.	99.57%	929 pb	EF488759
M148	*Kosakonia sp.*	99.36%	939 pb	EF488759
M149	*Kosakonia sp.*	99.8%	929 pb	EF488759
M150	*Kosakonia sp.*	98.05%	840 pb	EF488759
M151	*Burkholderia* sp.	97.41%	773 pb	AB021423
M152	*Burkholderia* sp.	96.94%	784 pb	AB021423
M154	*Rhizobium* sp.	98.64%	663 pb	JX446583
M155	*Kosakonia* sp.	94.21%	587 pb	EF488759

A maioria das bactérias pertencentes a *Rhizobium* sp. foram isoladas na superfície rizosférica ou de forma endofítica na raiz do sorgo cultivado sem adubação nitrogenada.

Entre os isolados provenientes do sorgo e do milheto nos dois experimentos, grande parte apresentou similaridade com *Burkholderia* sp., *Kosakonia* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea* sp., e *Pseudomonas* sp., sendo os isolados do sorgo (experimento II) o grupo com maior diversidade em gêneros pela identificação de *Sphingomonas* sp., *Sphingobium* sp.,

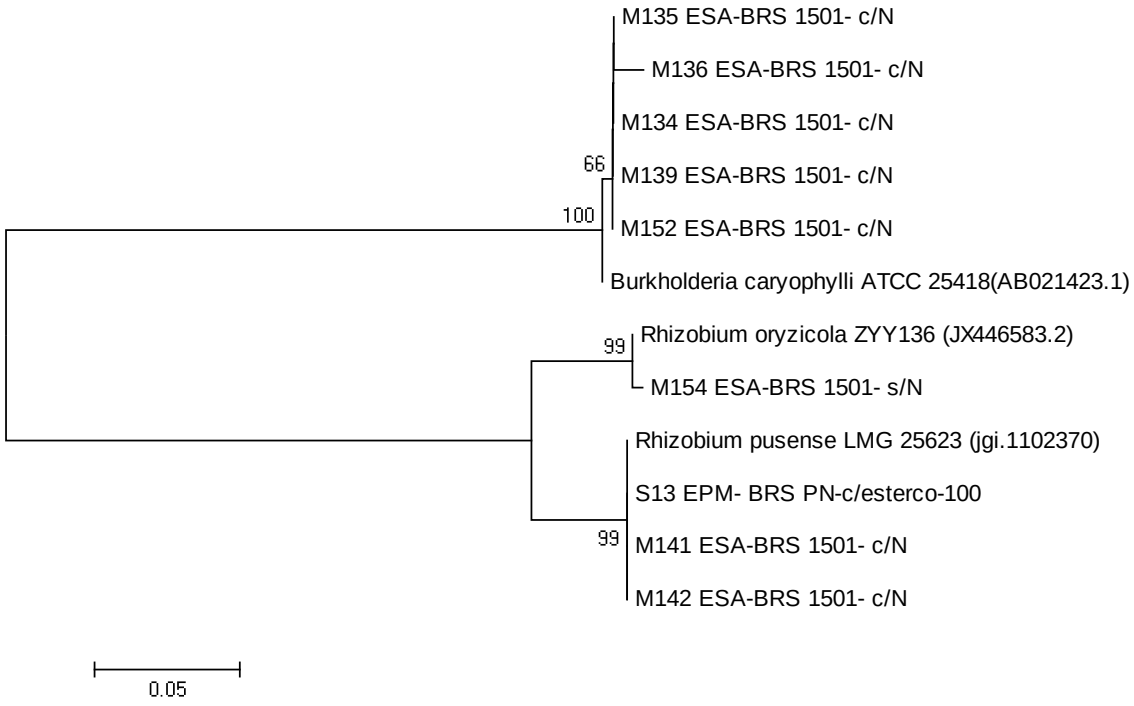
Stenotrophomonas sp., *Chitinophaga* sp.*, Flavobacterium* sp.*, Citrobacter* sp. *e Bacillus* sp.

Os grupos identificados no presente trabalho corroboram com alguns dos isolados diazotróficos que vem sendo obtidos de forma endofítica das raízes de diferentes gramíneas como o sorgo, milheto, arroz, *Tripogon spicatus* apresentando grande diversidade com membros de *Klebisiela pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia herbícola*, além de *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Azospirilum* sp., *Herbaspirillum* sp., *Gluconacetobacter* sp. e *Bacillus* sp. (COELHO et al., 2008; PRAKAMHANG et al., 2009; GUPTA et al., 2013; HAIYAMBO et al., 2015; FERNANDES- JÚNIOR et al., 2015).

A ocorrência de grupos identificados em associação as culturas cultivadas nas mesmas condições de outras gramíneas relatadas podem indicar a influência das condições ambientais em relação à diversidade de colonização de bactérias diazotróficas associativas. Fernandes-Júnior et al. (2015) ao isolarem bactérias diazotróficas de *Tripogon spicatus* na região semiárida do Brasil, caracterizou isolados que apresentaram similaridade a Enterobacteriaceae como pertencentes a *Pantoea* sp. e *Enterobacter* sp., além de isolados de *Bacillus* sp., *Strenotrophomonas* sp. e *Rhizobium* sp. assim como foi observado no presente estudo pelos isolados das gramíneas sorgo e milheto também cultivados na região da Caatinga .

A variabilidade genética pode ser analisada nas figuras 6 e 7, de acordo com a comparação das sequências realizada, entre os grupos mais abundantes identificados com aquelas disponíveis no EzBioClound (YOON et al., 2017).

Figura 6. Árvore filogenética com base nas sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos do sorgo e do milheto pertencentes a *Rhizobium* sp. e *Burkholderia* sp. Agrupamento utilizado Neighbour-Joing. Números de Bootstrap (1000 réplicas) superiores a 50% representados.



Ao analisar a relação filogenética entre as bactérias mais abundantes, observa-se que o isolado M154 proveniente do milheto cultivado sem adição de nitrogênio, apresentou similaridade a estirpe de *Rhizobium orizycola* e o isolado S13 proveniente do sorgo BRS Ponta Negra cultivado em uma lâmina de 100% da irrigação com esterco caprino, juntamente com M141 e M142 isolados *d*o milheto cultivado com adição de nitrogênio, constituíram um grupo com similaridade a estirpe de referência de *Rhizobium pusense* (Figura 6).

Foi observada a ocorrência de isolados da mesma espécie colonizando as diferentes culturas tanto do sorgo quanto do milheto, sendo o gênero *Rhizobium* relatado dentre as bactérias ambientais pelo seu potencial para promover o crescimento de plantas por meio da fixação biológica do nitrogênio e outros mecanismos. Zhang et al., (2015) caracterizaram diversas bactérias pertencentes a *Rhizobium*, dentre elas descreveu a espécie de *Rhizobium orizycola* isolada do

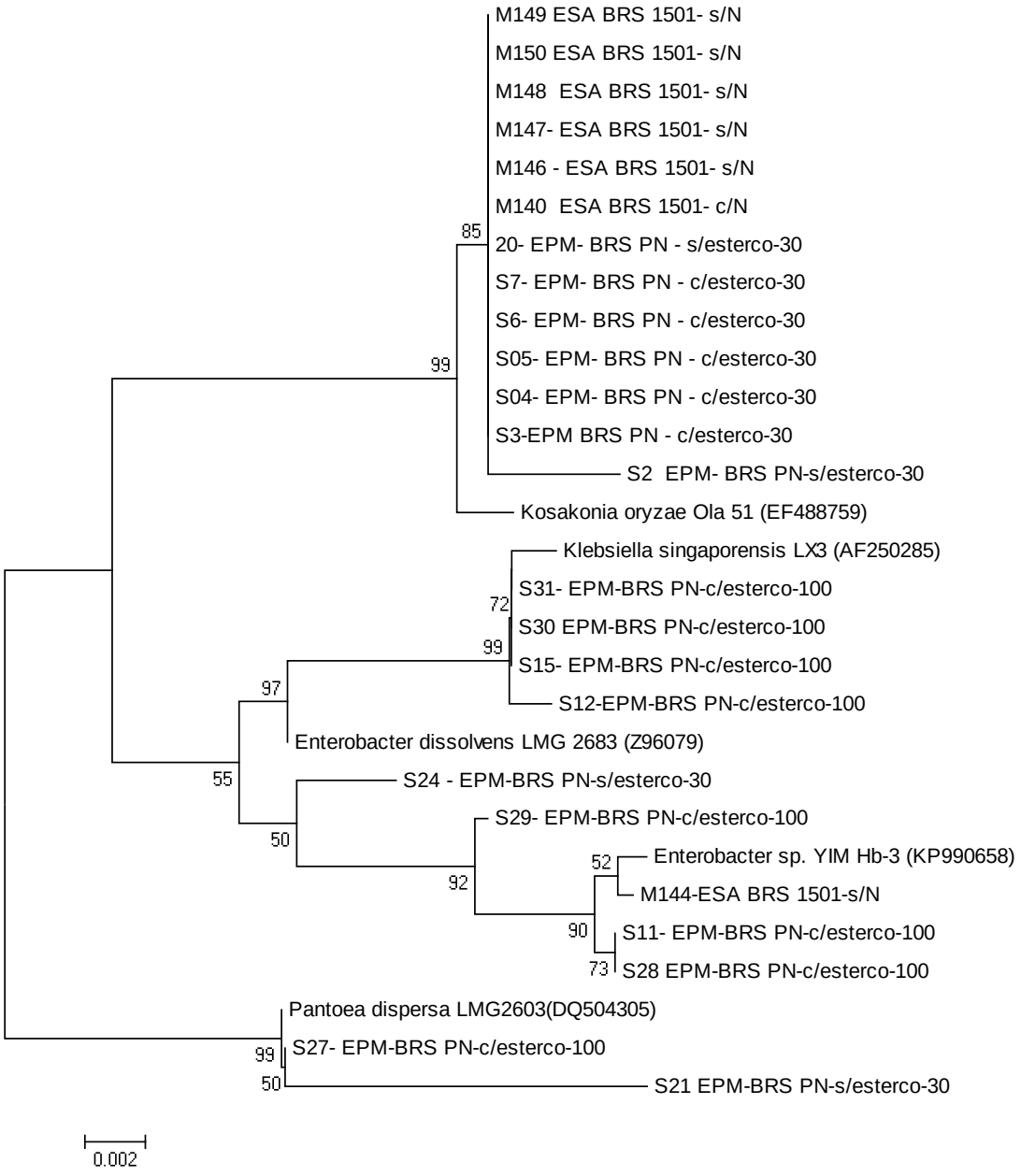
arroz, destacando o potencial de isolados desta nova espécie quanto a capacidade para promover o crescimento vegetal de gramíneas.

Panday et al. (2011) ao isolar diferentes estirpes de *Rhizobium* sp. a partir do solo rizosférico, caracterizou estas bactérias quanto ao potencial de nodulação, desse modo descreveu a espécie *Rhizobium pusense* como uma nova espécie entre isolados de *Rhizobium* sp. que não apresentam a capacidade de nodular e podem se associar a plantas não leguminosas como no presente estudo.

Os isolados M134, M135, M136, M139 e M152 provenientes do milheto cultivado com adição de nitrogênio, foram agrupados pela relação filogenética com a estirpe de referência de *Burkholderia caryophylli.* O gênero *Burkholderia* é constituído de diversas espécies de bactérias provenientes de diferentes ambientes, incluindo animais, humanos, plantas, sedimentos, rios e solo (AIZAWA et al., 2011).

Recentemente foi proposta a divisão taxonômica do gênero *Burkholderia*, e a partir dessa nova divisão as estirpes de bactérias humanas são agrupadas dentro do mesmo gênero e as bactérias de fontes ambientais reclassificadas em um novo gênero (SAWANA et al., 2014). Estirpes pertencentes à *Burkholderia caryophylli* estão sendo classificadas a partir deste novo posicionamento taxonômico dentro do novo gênero *Paraburkholderia*. Estão presentes no grupo de bactérias ambientais não patogênicas 20 espécies capazes de fixar nitrogênio atmosférico através da relação simbiótica com plantas leguminosas e formação de nódulos ou de forma endofítica em associação com plantas não leguminosas (ANGUS et al., 2014; SILVA et al., 2016).

Figura 7. Árvore filogenética com base nas sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos do sorgo e do milheto pertencentes a Enterobacteriaceae. Agrupamento utilizado Neighbour-Joing Números de Bootstrap (1000 réplicas) superiores a 50% representados.



Em relação ao agrupamento de isolados de Enterobacteriaceae são destacadas bactérias que apresentaram similaridade a *Kosakonia oryzae,* sendo estas isoladas do milheto tanto do cultivo com ou sem adição de nitrogênio, além de isolados do sorgo cultivado em lâminas de 30% da irrigação com ou sem esterco. A relação filogenética entre os grupos de Enterobacteriaceae foi reclassificada sendo *Kosakonia* um dos novos gêneros que agrupam bactérias antes classificadas a *Enterobacter* (BRADY et al., 2013; CHEN et al., 2014; KÄMPFER et al., 2016).

O gênero *Enterobacter* foi reclassificado sendo transferidas onze espécies para *Cronobacter* e três novos gêneros *Lelliottia*, *Pluralibacter* e *Kosakonia*. Dentre as espécies agrupadas no gênero *Kosakonia* são destacados relatos dessas bactérias colonizando gramíneas de forma endofítica e do potencial para a promoção do crescimento vegetal por diferentes mecanismos como a fixação de nitrogênio (CHEN et al., 2014; KÄMPFER et al., 2016).

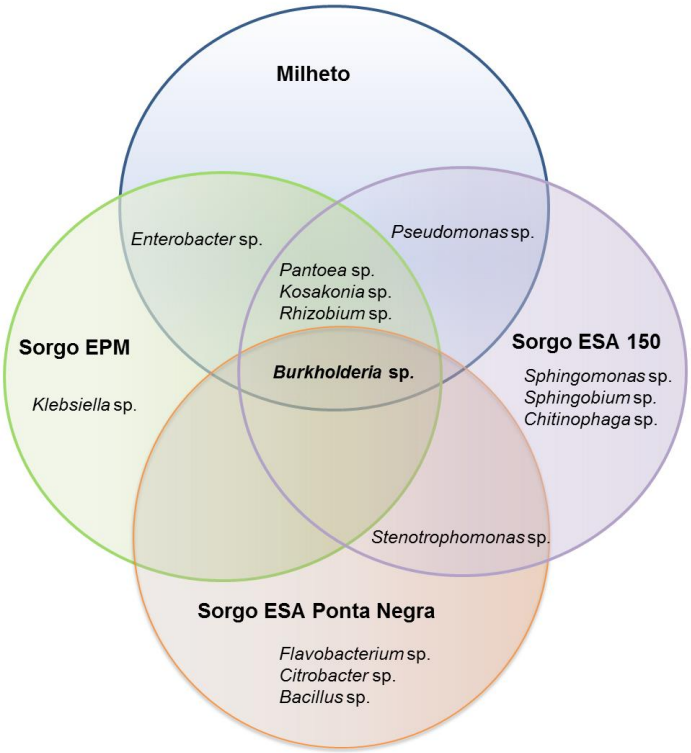
Kosakonia oryzae tem sido associada ao arroz apresentando propriedades promotoras do crescimento de plantas, principalmente pela fixação do nitrogênio atmosférico (MENG et al., 2015).

Um grupo de isolados do sorgo BRS Ponta Negra cultivado em lâmina de 100% da demanda hídrica foram agrupados a estirpe tipo de *Klebsiella singaporensis*; embora *K. singaporensis* tenha sido descrita pela identificação e caracterização de isolados bacterianos do solo (LI et al., 2004). Dentre as espécies constituintes de *Klebsiella* são escassos relatos de associação com diferentes plantas, sendo diferentes espécies desse gênero comumente relacionadas a patógenos humanos (BRISSE et al., 2014), ou espécies ambientais atuando na fitorremediação pela acumulação de metais em solos contaminados (BOECHAT et al., 2016) e na tolerância a salinidade em plantas por meio de mecanismo de promoção do crescimento (SHARMA et al., 2016).

Demais isolados do sorgo apresentaram similaridade a *Pantoea dispersa,* e a *Enterobacter* sp. ou *Enterobacter dissolvens.* O gênero *Enterobacter* abrange uma vasta gama de bactérias colonizando diferentes ambientes, como a rizosfera, plantas, animais e humanos. Algumas espécies são promotoras de crescimento vegetal por meio dos diferentes mecanismos diretos e indiretos (RAMESH et al., 2014). Estes gêneros de bactérias são relatados em associação com plantas não

leguminosas, como os isolados de *Enterobacter* sp. e *Pantoea* sp. associados a espécies vegetais da Caatinga (FERNANDES-JÚNIOR et al.,2015; ANTUNES, 2016).

Figura 8. Diversidade de isolados associados representados pelos diagramas de Venn. Fonte: Jéssica Fernanda da Silva.



Em relação à dominância dos grupos isolados nos diferentes nichos, são observados (Figura 8) isolados pertencentes à *Burkholderia* sp. constituindo um grupo comum de bactérias associativas, obtidas do sorgo em ambos os experimentos e variedades e do milheto no experimento II. Pertencentes a *Kosakonia* sp., *Pantoea* sp., e *Rhizobium* sp. também foram grupos considerados frequentes não sendo identificados estes gêneros apenas entre os isolados do sorgo variedade Ponta Negra no segundo experimento.

Uma avaliação do diagrama de Venn nos permite analisar que alguns gêneros bacterianos foram identificados de forma exclusiva a algumas culturas avaliadas. O milheto apresentou isolados pertencentes à *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. como grupos em comum com o sorgo cultivado no campo experimental da Embrapa Produtos e Mercados EPM (Experimento I) e o sorgo cultivado no campo

experimental da Embrapa Semiárido ESA 150 (Experimento II) respectivamente. Não foram observados grupos de isolados em associação exclusiva a esta cultura.

Klebsiella sp. foi o único gênero exclusivamente encontrado associado ao sorgo EPM (experimento I). As variedades de sorgo cultivadas na Embrapa Semiárido (Experimento II) apresentaram o maior número de grupos únicos isolados, em comparação com as demais culturas estudadas, apresentando maior diversidade de isolados. Embora doze grupos tenham sido identificados, apenas os gêneros *Stenotrophomonas* foi comum as duas variedades. Antunes (2016) também ao isolar e caracterizar bactérias promotoras de crescimento em associação com diferentes plantas forrageiras cultivadas na mesma região da Caatinga encontrou pertencentes à *Stenotrophomonas* sp. entre os isolados da variedade de sorgo BRS Ponta Negra.

O sorgo SF 150 foi a variedade com maior predominância de grupos isolados quando comparado com a BRS Ponta Negra. Esse resultado indica que variedades com aplicações agronômicas distintas, como é o exemplo do sorgo forrageiro BRS Ponta Negra, e do sorgo sacarino SF 150, podem se associar a diferentes grupos bacterianos.

Mareque et al. (2015) ao isolar e caracterizar bactérias endofíticas associadas ao sorgo, identificaram entre a diversidade de isolados, alguns pertencentes a Alphaproteobacteria com bactérias do gênero *Rhizobium*, Gammaproteobacteria incluindo *Enterobacter* e *Pantoea,* Firmicutes com isolados de *Bacillus*, assim como no presente estudo, além de isolados relacionados a Actinobacteria e Bacterioidetes com gêneros que não foram identificados neste trabalho.

Dentre as bactérias aqui identificadas, sete isolados representam o grupo dominante em colonização sendo pertencentes ao gênero *Kosakonia* e grande parte provenientes dos tratamentos com plantas do milheto sem adubação nitrogenada ou sorgo cultivado com adubação orgânica e submetido à restrição hídrica com irrigação de 30% da demanda da cultura.

A diversidade de bactérias diazotróficas pode ser influenciada pela variedade de exsudatos que podem ser liberados entre as culturas ou pelo genótipo da planta que acabam influenciando a associação com os micro-organismos (BERGAMASCHI et al, 2007). *Sorghum bicolor* é descrito como um hospedeiro com grande

diversidade de bactérias associativas, pertencentes a *Pseudomonas* sp. *Stenotrophomonas* sp., e *Bacillus* sp. (HAIYAMBO et al., 2015), grupos que foram identificados também nesse estudo. Foi relatado, também, variação entre os nichos de isolamento com isolados do gênero *Sphingobium* dominante ao tecido radicular do sorgo (MAROPOLA et al., 2015), como observado no presente trabalho.

Dentre os grupos dominantes aos isolados do milheto foi observada maior predominância do gênero *Kosakonia*, apresentando cerca de 99% de similaridade com as sequências depositadas no EzBiocloud (YOON et al., 2017) entre sete dos dez isolados, seguido de *Burkholderia* sp. com 99% de similaridade em quatro dos seis isolados considerados pertencentes a esse gênero. Em relação ao nicho, grande parte das bactérias pertencentes a *Kosakonia* sp. são endofíticas da raiz e as *Burkholderia* sp. isoladas na superfície da raiz do milheto.

Entre os diferentes grupos taxonômicos são relatados os mais favoráveis à colonização e promoção do crescimento de plantas. A dominância de colonização. de *Pseudomonas* sp. já foi relatada em vários estágios do crescimento do milheto (GUPTA et al., 2013). A eficiência de colonização deste gênero também pode estar relacionada às formas estratégicas desenvolvidas para suprir a necessidade nutricional do vegetal, já que no presente estudo este grupo de bactérias foi identificado em associação com plantas do milheto cultivadas sem adição de nitrogênio.

5.2.3 Amplificação dos genes *rpo*B, *recA, atpD*, *glnII* e da região ITS

A amplificação do gene *rpo*B apresentou um polimorfismo inesperado, com agrupamento de isolados de diferentes gêneros por padrões específicos fato que poderia permitir utilizar esse fragmento como uma nova ferramenta molecular para o agrupamento de bactérias associativas, para isso foi realizada a amplificação dos demais genes constitutivos e da região ITS que já é aplicada para este fim.

Os isolados identificados a partir do sequenciamento do fragmento do gene 16s rRNA tiveram seu posicionamento taxonômico determinado quando comparadas as sequências com as disponíveis no EzBiocloud. As sequências com melhor identidade foram utilizadas para a construção da arvore filogenética apresentada na Figura 9.

Foi observado um padrão polimórfico característico pela amplificação do RISA entre os grupos avaliados, tornando possível agrupá-los pelos diferentes padrões obtidos correspondentes a cada gênero (Figura 10). Analisando a amplificação com os iniciadores para os genes *gln*II, *rec*A e *atp*D não foi possível fazer essa determinação tão concisa como pelo método RISA, pois os tamanhos dos fragmentos foram semelhantes entre todos os isolados, não apresentando polimorfismo considerável para agrupamento e seleção dos grupos de bactérias. Porém, o padrão de amplificação com iniciadores para o gene *rpo*B apresentou polimorfismo correspondente ao que foi observado pelo RISA agrupando os diferentes grupos com os diferentes padrões obtidos e pode ser observado na figura 11.

Não há relatos que abordem este polimorfismo do gene *rpo*B para o agrupamento de bactérias associativas, sendo descrito mais comumente análises dos fragmentos de amplificação deste gene com restrição por enzimas, avaliando os perfis obtidos. Além do sequenciamento desse gene para determinação taxonômica de isolados que também é aplicado para os demais genes estudados (ASERSE et al., 2013; HADIFAR et al., 2015).

Figura 9. Padrões polimórficos entre os diferentes grupos taxonômicos identificados.

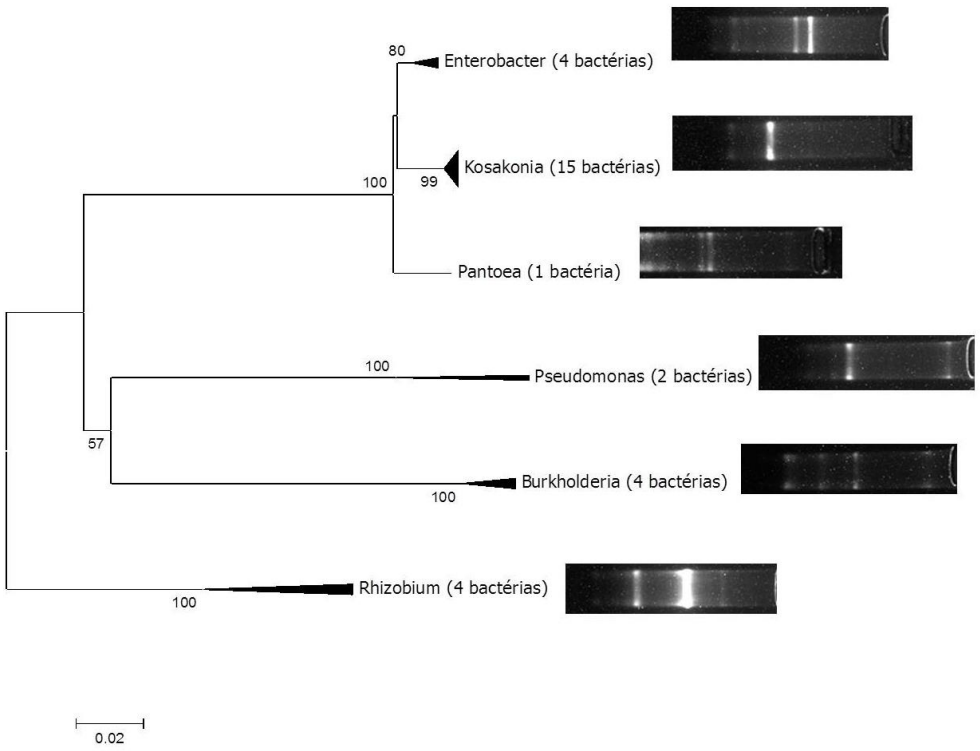


Figura 10. Padrão polimórfico de amplificação dos isolados pelo método RISA

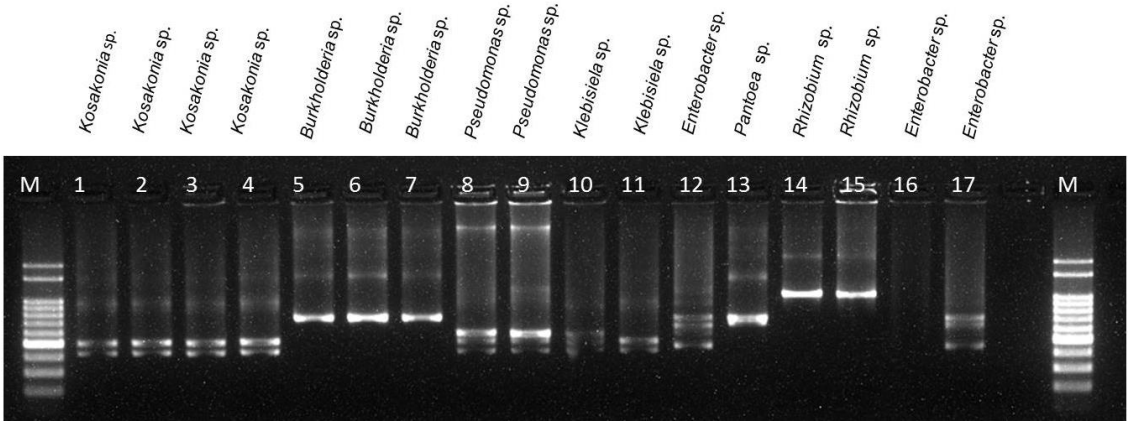
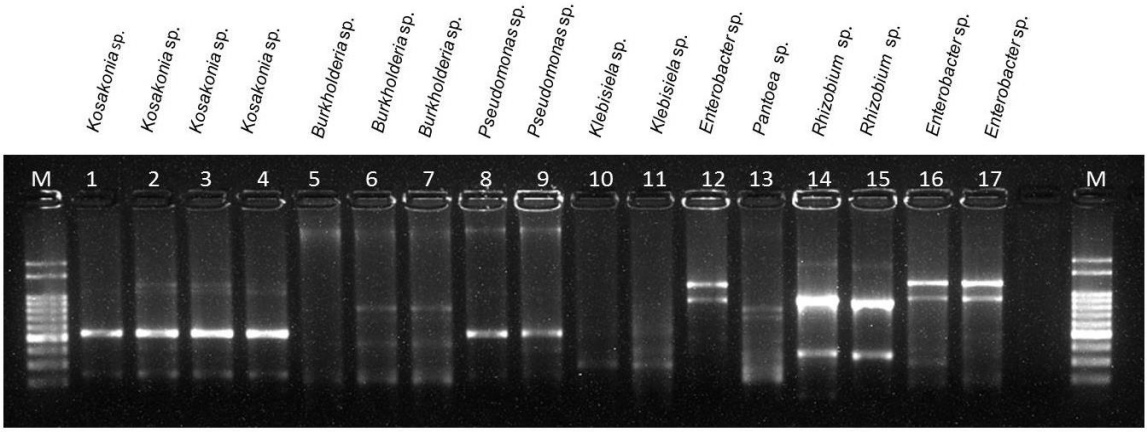


Figura 11. Padrão polimórfico de amplificação dos isolados com iniciadores do gene *rpo*B.



Embora a aplicação do método RISA seja favorecido pela alta similaridade entre os isolados agrupados, estudos recentes abordam que o RISA pode não seguir perfeitamente o ritmo evolutivo, exibindo variações intra-estirpes ou intra-espécies em uma ampla variedade de organismos (CHEN et al., 2016_b) O polimorfismo do *rpo*B pode ser mais vantajoso em relação ao RISA pelo fato do fragmento amplificado ser um gene constitutivo e não um espaço intergênico podendo se manter mais conservado e ser mais representativo.

5.3 Avaliação dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal

5.3.1 Produção de compostos indólicos “in vitro”

Tabela 10. Produção de compostos indólicos na presença e ausência de L-triptofano (µg mL-¹) por bactérias diazotróficas isoladas do sorgo cultivado com e sem restrição hídrica e adubação orgânica (experimento I).

Isolado	Gênero	Adubação orgânica	Irrigação	Indol c/L-triptofano	Indol s/L-triptofano
S01	NI	s/E	30%	110,0^{b}	91,2^{b}
S02	*Kosakonia* sp.	c/E	30%	158,5^{a}	90,2^{b}
S03	*Kosakonia* sp.	c/E	30%	112,1^{b}	106,2^{b}
S04	*Kosakonia* sp.	c/E	30%	143,5^{a}	130,0^{a}
S05	*Kosakonia* sp.	c/E	30%	75,7^{b}	77,6^{b}
S06	*Kosakonia* sp.	c/E	30%	92,6^{b}	93,3^{b}
S07	*Kosakonia* sp.	c/E	30%	113,3^{b}	93,5^{b}
S08	NI	c/E	30%	126,9^{b}	108,8^{b}
S11	*Enterobacter* sp.	c/E	100%	94,0^{b}	136,9^{a}
S12	*Klebsiella* sp.	c/E	100%	129,5^{b}	128,5^{a}
S13	*Rhizobium* sp.	c/E	100%	126,6^{b}	138,5^{a}
S15	*Klebsiella* sp.	c/E	100%	192,8^{a}	207,6^{a}
S16	*Burkholderia* sp.	s/E	100%	71,2^{b}	113,3^{b}
S18	NI	c/E	30%	98,5^{b}	124,5^{b}
S19	NI	c/E	30%	79,0^{b}	141,6^{a}
S20	*Kosakonia* sp.	s/E	30%	90,0^{b}	89,5^{b}
S21	*Enterobacter* sp.	s/E	30%	83,5^{b}	85,7^{b}
S22	*Pantoea* sp.	s/E	30%	80,7^{b}	84,7^{b}
S23	NI	s/E	30%	122,8^{b}	105,2^{b}
S24	*Enterobacter* sp.	s/E	30%	140,9^{a}	78,3^{b}
S25	NI	s/E	30%	100,4^{b}	93,5^{b}
S26	NI	c/E	100%	113,5^{b}	97,8^{b}
S27	*Pantoea* sp.	c/E	100%	111,4^{b}	88,8^{b}
S28	*Enterobacter* sp.	c/E	100%	106,4^{b}	103,3^{b}
S29	*Enterobacter* sp.	c/E	100%	186,6^{a}	99,5^{b}
S30	*Klebsiella* sp.	c/E	100%	109,5^{b}	146,4^{a}
S31	*Klebsiella* sp.	c/E	100%	102,6^{b}	120,4^{b}
S33	NI	c/E	100%	180,5^{a}	140,7^{a}
S35	NI	c/E	100%	123,1^{b}	158,8^{a}
Ab V5	Azospirillum brasilense			**138,92^{a}**	**112,14^{b}**

Letras minúsculas compara entre isolados com ou sem try, letras iguais não diferem pelo teste de Skott-Knott a 5% ($p<0,05$) (NI: não identificado).

Tabela 11. Produção de compostos indólicos na presença e ausência de L-triptofano (µg mL-¹) por bactérias diazotróficas isoladas do milheto cultivado com e sem adubação nitrogenada (experimento II).

Isolado	Gênero	Nicho	Adubação Nitrogenada	Indol c/L triptofano	Indol s/L-triptofano
M122	*Pantoea* sp.	raiz S	c/ N	166,40^{c}	252,60^{b}
M123	*Pantoea* sp.	raiz E	c/ N	144,74^{c}	360,93^{a}
M124	*Kosakonia* sp.	raiz E	c/ N	84,50^{c}	164,50^{c}
M126	*Kosakonia* sp.	Colmo	c/ N	385,93^{a}	81,88^{c}
M127	NI	Colmo	c/ N	159,50^{c}	235,45^{b}
M128	NI	raiz E	s/N	300,21^{b}	197,83^{b}
M129	*Pseudomonas* sp.	raiz E	s/N	113,55^{c}	383,79^{a}
M130	NI	raiz E	s/N	135,69^{c}	226,17^{b}
M131	*Pseudomonas* sp.	raiz E	s/N	124,74^{c}	299,02^{a}
M133	NI	raiz E	s/N	127,60^{c}	359,74^{a}
M134	*Burkholderia* sp.	raiz S	c/N	97,12^{c}	128,07^{c}
M135	*Burkholderia* sp.	raiz S	c/N	146,40^{c}	263,79^{b}
M136	*Burkholderia* sp.	raiz S	c/N	282,60^{b}	361,40^{a}
M138	NI	raiz (S	c/N	161,88^{c}	216,64^{b}
M139	*Burkholderia* sp.	raiz E	c/N	170,21^{c}	296,88^{a}
M140	*Kosakonia* sp.	raiz E	c/N	156,40^{c}	120,21^{c}
M141	*Rhizobium* sp.	Colmo	c/N	121,64^{c}	379,26^{a}
M142	*Rhizobium* sp.	Colmo	c/N	137,36^{c}	312,12^{a}
M143	NI	raiz S	s/N	125,69^{c}	349,02^{a}
M144	*Enterobacter* sp.	raiz S	s/N	290,45^{b}	318,55^{a}
M146	*Kosakonia* sp.	raiz E	s/N	224,26^{b}	219,50^{b}
M148	*Kosakonia* sp.	raiz E	s/N	148,79^{c}	221,64^{b}
M149	*Kosakonia* sp.	raiz E	s/N	95,69^{c}	279,74^{a}
M150	*Kosakonia* sp.	Colmo	s/N	349,74^{a}	337,83^{a}
M151	*Burkholderia* sp.	raiz S	c/ N	413,79^{a}	203,55^{b}
M152	*Burkholderia* sp.	raiz S	c/ N	505,45^{a}	61,64^{c}
M154	*Rhizobium* sp.	raiz S	s/N	304,26^{b}	135,69^{c}
M155	*Kosakonia* sp.	raiz E	s/N	71,17^{c}	93,07^{c}
M156	NI	raiz E	s/N	297,12^{b}	235,45^{b}
M157	NI	raiz E	s/N	70,69^{c}	98,55^{c}
M158	NI	raiz E	s/N	244,50^{b}	218,79^{b}
M159	NI	raiz E	s/N	215,21^{b}	223,55^{b}
M160	NI	Colmo	s/N	250,93^{b}	207,83^{b}
M161	NI	Colmo	s/N	267,12^{b}	150,21^{c}
M162	NI	Colmo	s/N	213,31^{b}	136,17^{c}
M163	NI	raiz S	c/ N	349,74^{a}	159,98^{c}
M164	NI	raiz S	c/ N	425,21^{a}	93,55^{c}
Ab-V5	*Azospirillum brasiliense*			**278,31^{b}**	**235,21^{b}**

Letras minúsculas compara entre isolados com ou sem try, letras iguais não diferem pelo teste de Skott-Knott a 5% ($p<0,05$) (raiz E: isolados endofíticos da raiz, raiz S= isolados da superfície da raiz, NI: não identificado).

Todos os isolados analisados produziram compostos indólicos em alguma quantidade quando submetidos às condições de crescimento com ou sem a suplementação do meio de cultura com L- triptofano. Os resultados das avaliações estão apresentados nas tabelas 10 para isolados do sorgo (experimento I), 11 e 12 para isolados do milheto e sorgo (experimento II) respectivamente. As concentrações de compostos indólicos foram obtidas a partir da equação y = 0,0014x + 0,0027 (R^2 = 0,9871) determinada por meio de quantidades conhecidas de AIA sintético.

A produção de compostos indólicos pelas bactérias isoladas do sorgo (experimento I) no ensaio com adição do precursor triptofano, apresentou valores que variaram entre 71,2 µg mL^{-1} e 192,8 µg mL^{-1} para os isolados S16 e S15 respectivamente. Os isolados considerados mais promissores foram S 2, S 4, S15, S24, S 29, S33 com uma produção estatisticamente igual a estirpe de referência Ab-V5 que produziu 138,92 µg mL^{-1}

Os valores de compostos indólicos com triptofano variaram de 70,69 µg mL^{-1} à 505,45 µg mL^{-1} entre os isolados M157 e M152 respectivamente provenientes do milheto. Sendo observada a melhor produção de compostos indólicos por alguns isolados considerados mais promissores quando comparados com a estirpe de referência que produziu 278,31 µg mL^{-1}, apresentando valores superiores entre os isolados tais como M126, M150, M151, M152, M163, M164.

Os valores de compostos indólicos com triptofano entre os isolados do sorgo (experimento II) variaram de 60,93 à 254,74 µg mL^{-1} entre os isolados SSB450 e SSB476 respectivamente, embora todos os isolados tenham produzido valores significativos de compostos indólicos estes não foram superiores a produção observada entre os isolados do milheto, indicando que a eficiência da síntese dos compostos pode estar relacionada à planta hospedeira. Os isolados mais efetivos quanto à produção dos compostos indólicos apresentaram valores considerados iguais aos da estirpe de referência e estes representam 50% dos 42 isolados avaliados.

Tabela 12. Produção de compostos indólicos na presença e ausência de L-triptofano (µg mL-¹) por bactérias diazotróficas isoladas de duas variedades de sorgo cultivado com e sem adubação nitrogenada.

Isolado	Gênero	Nicho	Adubação nitrogenada	Indol c/L triptofano	Indol s/L-triptofano
SSB445	NI	raiz S	c/N	144,98[a]	97,83[c]
SSB446	NI	raiz E	c/N	105,45[b]	176,40[b]
SSB447	NI	raiz E	c/N	81,40[b]	91,17[c]
SSB448	NI	Colmo	s/N	134,50[a]	122,12[c]
SSB449	*Sphingomonas* sp.	raiz S	c/N	110,93[b]	208,31[b]
SSB450	NI	raiz S	c/N	60,93[b]	83,07[c]
SSB452	*Rhizobium* sp.	raiz S	s/N	70,93[b]	95,21[c]
SSB453	*Rhizobium* sp.	raiz S	s/N	115,45[b]	122,83[c]
SSB454	*Pseudomonas* sp.	raiz S	c/N	165,21[a]	114,50[c]
SSB456	*Sphingobium* sp.	raiz E	c/N	83,07[b]	100,45[c]
SSB457	*Rhizobium* sp.	raiz E	c/N	100,93[b]	111,88[c]
SSB459	NI	Colmo	c/N	161,17[a]	214,74[b]
SSB462	*Rhizobium* sp.	raiz E	s/N	153,79[a]	244,98[b]
SSB463	*Burkholderia* sp.	raiz E	s/N	119,26[a]	360,45[a]
SSB464	*Rhizobium* sp.	raiz E	s/N	127,60[a]	73,07[c]
SSB465	*Stenotrophomonas* sp.	raiz E	s/N	170,93[a]	302,60[a]
SSB466	*Chitinophaga* sp.	raiz E	s/N	109,98[b]	82,83[c]
SPB467	*Stenotrophomonas* sp.	raiz E	c/N	113,07[b]	101,88[c]
SPB468	NI	raiz E	c/N	128,79[a]	74,50[c]
SPB470	*Flavobacterium* sp.	raiz E	s/N	130,69[a]	64,50[c]
SPB471	*Citrobacter* sp.	raiz S	c/N	76,64[b]	60,69[c]
SSB472	*Pantoea* sp.	raiz S	c/N	94,50[b]	89,26[c]
SSB473	NI	raiz S	c/N	104,02[b]	82,60[c]
SSB474	NI	raiz S	c/N	113,31[b]	93,31[c]
SSB476	*Pseudomonas* sp.	raiz S	c/N	254,74[a]	201,88[b]
SSB477	NI	raiz S	c/N	82,60[b]	54,02[c]
SSB478	NI	raiz S	c/N	76,64[b]	52,60[c]
SSB479	NI	raiz S	c/N	138,79[a]	69,98[c]
SSB480	NI	raiz S	c/N	180,45[a]	97,83[c]
SSB481	*Burkholderia* sp.	raiz E	c/N	135,69[a]	112,60[c]
SSB482	*Burkholderia* sp.	raiz E	c/N	99,02[b]	84,02[c]
SSB483	*Stenotrophomonas* sp.	raiz E	c/N	118,55[a]	86,64[c]
SSB484	NI	raiz E	c/N	106,64[b]	99,74[c]
SSB485	*Burkholderia* sp.	raiz E	c/N	133,79[a]	107,83[c]
SSB486	*Burkholderia* sp.	raiz E	c/N	130,21[a]	100,93[c]
SSB487	NI	raiz E	c/N	125,21[a]	74,50[c]
SPB488	*Bacillus* sp.	raiz S	c/N	120,93[a]	77,36[c]
SPB489	*Burkholderia* sp.	raiz S	c/N	143,55[a]	88,07[c]
SSB492	*Kosakonia* sp.	raiz S	s/N	93,79[b]	222,83[b]
SSB493	*Pseudomonas* sp.	raiz E	s/N	132,12[a]	115,21[c]
SSB494	*Rhizobium* sp.	Colmo	s/N	93,31[b]	95,69[c]

SSB495	*Kosakonia* sp.	Colmo	s/N	85,21[b]	99,98[c]
Ab V5	Azospirillum brasiliense			**135,93[a]**	**111,17[c]**

Letras minúsculas compara entre isolados, letras iguais não diferem pelo teste de Skott-Knott a 5% (p<0,05). (raiz E: isolados endofíticos da raiz, raiz S: isolados da superfície da raiz, SS: sorgo Sacarino SF150, SP: Sorgo Ponta Negra, B: Bebedouro, NI: não identificado).

A produção de compostos indólicos foi analisada em meio com e sem a suplementação com L-triptofano, embora melhores resultados tenham sido observados na presença do precursor, o que demonstra a elevada capacidade das bactérias em produzir indóis pela via metabólica dependente do triptofano, que é a rota metabólica mais bem entendida na síntese de auxinas (ABD-ALLA et al., 2013).

É possível observar um alto índice de produção de compostos indólicos entre os isolados provenientes do milheto também submetidos ao ensaio em cultivo sem suplementação do meio com L-triptofano. Dentre eles é possível ressaltar a eficiência do isolado M150 pertencente ao gênero *Kosakonia* que produziu valores superiores à estirpe de referência nas duas condições testadas. Entre os isolados do sorgo (experimento I) também foi observado um alto índice de produção de compostos indólicos pelo cultivo sem L-triptofano. Além disso, apenas nessa condição avaliada vários isolados foram superiores a estirpe de referência.

Segundo Khamna et al. (2010), os altos níveis de triptofano presentes no exsudatos radiculares das plantas influenciam diretamente a biossíntese de AIA de micro-organismos isolados a partir de suas rizosferas. Os índices de produção de compostos indólicos pelos isolados do sorgo demonstraram resultados superiores com suplementação do meio de cultura com L-triptofano, corroborando com diversos relatos da literatura. Os compostos indólicos podem ser sintetizados pelos micro-organismos em diferentes rotas metabólicas, podendo ser pela via dependente do triptofano como precursor ou pela via independente com diferentes precursores como o indol-3-glicerol fosfato em rotas metabólicas pouco conhecidas.

Além disso, embora o AIA seja a principal auxina sintetizada e de maior importância para o crescimento vegetal, outros compostos intermediários indólicos podem ser produzidos e a análise apenas quantitativa não diferencia os compostos biossintetizados, este fato pode justificar os valores significativos observados pelos isolados que apresentaram maior eficiência na ausência de triptofano como os

valores produzidos pelos isolados do sorgo, considerados superiores à estirpe de referência (MANO & NEMOTO, 2012; SZKOP & BIELAWSKI; 2013).

As concentrações de compostos indólicos associadas à biossíntese dos isolados no presente estudo foram muito superiores a relatos descritos na literatura. Bergamaschi et al. (2007) ao avaliarem a quantificação de AIA das bactérias isoladas do sorgo forrageiro encontraram valores de 0,70 µg /mg a 10,70 µg /mg. Abd-Alla et al. (2013) ao avaliarem a produção de AIA por *Streptomyces* sp. associados a cultura de gramíneas relatam índices de produção dos isolados que variaram entre 3 à 22,5 µg mL^{-1} e Ji et al. (2014) ao caracterizarem isolados endofíticos de várias partes do arroz descrevem a maior atividade de produção de auxina variando entre 11 à 24,6 µg mL^{-1}.

Comparando a eficiência de produção entre isolados provenientes do cultivo com e sem adição de N observa-se que os isolados que mais produziram compostos indólicos com triptofano foram provenientes do isolamento de plantas de milheto cultivadas com adubação nitrogenada, porém destaca-se que a maioria dos isolados do cultivo sem adição de N apresentaram valores de produção de compostos indólicos superiores a estirpe controle.

Já os isolados das variedades de sorgo que apresentaram melhores resultados foram provenientes de plantas cultivadas sem adição de N nas duas condições do ensaio. Segundo Mano & Nemoto (2012), apesar de espécies vegetais serem diferentes, estas apresentam estratégias únicas e modificações para otimizar suas vias metabólicas, compartilhando mecanismos fundamentais que foram conservados evolutivamente para a biossíntese de auxina AIA por ser um elemento fundamental no ciclo de vida vegetal.

Avaliando os isolados mais eficientes destaca-se grupos pertencentes aos gêneros *Kosakonia*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Rhizobium*. Diversos estudos apontam *Burkholderia* sp. como promotora no crescimento de plantas tanto em associações rizosféricas como endofíticas, sendo relatada a eficiência de produção de hormônios na presença de triptofano (NAVEED et al., 2015).

A biossíntese de auxinas por micro-organismos associados a gramíneas como o sorgo e milheto tem sido pouco relatada, e os altos níveis de quantificação

dos compostos indólicos induzidos pelas diferentes vias dependente e independente do triptofano, no presente trabalho podem indicar estas culturas como boas hospedeiras propicias de bactérias promotoras de crescimento vegetal, destacando-se que o AIA é um importante fitormônio que auxilia o crescimento radicular, aumentando o metabolismo da raiz e absorção de água sendo uma alternativa para o favorecimento da produção agrícola no semiárido.

5.3.2 Solubilização de Tri-fosfato de Cálcio

Ao analisar a capacidade de solubilização de tri-fosfato de cálcio pelos isolados, 24 bactérias apresentaram essa característica com a formação do halo transparente em diferentes diâmetros observados ao redor da colônia.

Tabela 13. Índice de solubilização de fosfato Tri-cálcio calculado pela razão entre o diâmetro do halo/diâmetro da colônia dos isolados associativos ao sorgo e ao milheto.

Sorgo (Exp.I)		**Sorgo (Exp.II)**		**Milheto (Exp.II)**	
Isolado	IS	Isolado	IS	Isolado	IS
S6	4,0[a]	S448	7,7[a]	M123	5,8[a]
S12	3,1[a]	S453	1,4[d]	M124	5,5[a]
S28	3,5[a]	S462	1,6[d]	M126	4,0[b]
S33	3,8[a]	S464	1,3[d]	M127	3,7[b]
S35	3,5[a]	S470	4,3[b]	M131	3,7[b]
Ab-V5	1,1[b]	S471	2,0[c]	M133	3,8[b]
		S477	1,6[d]	M134	3,9[b]
		S480	2,0[c]	M142	3,6[b]
		Ab-V5	1,1[d]	M144	3,3[b]
				M160	3,5[b]
				M161	3,1[b]
				Ab-V5	1,1[c]

Dentre os isolados que mais se destacaram, cinco foram provenientes do isolamento do sorgo (experimento I), com índice de solubilização (IS) entre 3,5 e 4,0 em oito isolados do sorgo (experimento II) com IS entre 1,3 e 7,7 e o maior número de isolados capazes de solubilizar fosfato tri-cálcio estavam entre as bactérias obtidas do milheto com IS entre 3,1 e 5,8. Todos os isolados foram considerados superiores a estirpe de referência Ab-V5 que apresentou IS de 1,1.

Os resultados foram superiores aos encontrados por Venieraki et al. (2011) que ao caracterizarem isolados associativos a gramíneas relataram índices de solubilização entre 1,7 e 4,7.

Os isolados com capacidade de solubilização foram classificados como pertencentes a *Kosakonia* sp., *Klebsiella sp*., *Enterobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Flavobacterium* sp., *Citrobacter* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp.

A capacidade dos micro-organismos em solubilizar formas insolúveis em solúveis de fosfatos, é atribuída às estratégias tomadas pelas interações planta-solo-micro-organismo em sistemas naturais, decompondo e mineralizando P a partir de alterações orgânicas do solo (SIMPSON et al., 2011; STUTTER et al., 2012). Entre os mecanismos para a ocorrência da solubilização é relatado à produção de ácido glucônico, dentre outros ácidos orgânicos, que favorece a solubilização de fosfatos inorgânicos e vem sendo atribuído a isolados como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Azospirillum* (VENIERAKI et al., 2011).

Essa característica contribui para o favorecimento do crescimento vegetal de forma sustentável, pois, embora o fósforo seja um nutriente mineral de grande importância nutricional, ocorre em formas insolúveis com disponibilidade limitada assim como o nitrogênio (SASHIDHAR & PODILE, 2009; SHARMA et al., 2013).

Os resultados positivos quanto à eficiência de solubilização de fosfato indicam o potencial desses isolados para promoção do crescimento vegetal. Selecionando as estirpes mais promissoras por apresentarem essa característica e podendo ser complementar a outros mecanismos de promoção do crescimento

Desse modo, a identificação de isolados atuantes na promoção do crescimento vegetal pela capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos, pode vir a contribuir com a produção vegetal. Visto que a necessidade de adição de fertilizantes químicos para suprir a necessidade nutricional e em quantidades elevadas para neutralizar a forte ligação do fosfato ao solo, acaba prejudicando o meio ambiente com diferentes danos causados pela síntese química e perdas ao solo desses compostos (STUTTER et al., 2012; SHARMA et al., 2013).

5.3.3 Produção de Sideróforos

Os isolados foram avaliados quanto a produção de sideróforos por análise qualitativa (Figura 12). Seguida de quantificação da produção por espectrofotometria, em leitura num comprimento de onda de 630 nm. As concentrações foram determinadas a partir da equação y = -9,9143x + 0,1414 (R^2 = 0,9961) obtida por doses conhecidas de EDTA utilizado para comparação por ser considerado um quelador de ferro. Os valores estão apresentados na tabela 13.

Ao avaliar os isolados de forma qualitativa é possível notar a modificação na cor entre os isolados que reagiram com o CAS, do azul de maior por menor intensidade indicando a produção de sideróforos (Figura 12), porém embora a mudança na coloração seja mais evidente para alguns isolados, modificações pouco perceptíveis não determinam sua capacidade produtiva. Assim a quantificação em espectrofotômetro adotada possibilitou avaliar em valores a eficiência de produção dos compostos de todas as estirpes estudadas

Figura 12. Análise qualitativa de produção de sideróforos dos isolados com reagente CAS. Maior produção de compostos observada pelas amostras em amarelo. Menor produção de sideróforos nas amostras em azul. Foto: Jéssica Fernanda da Silva.

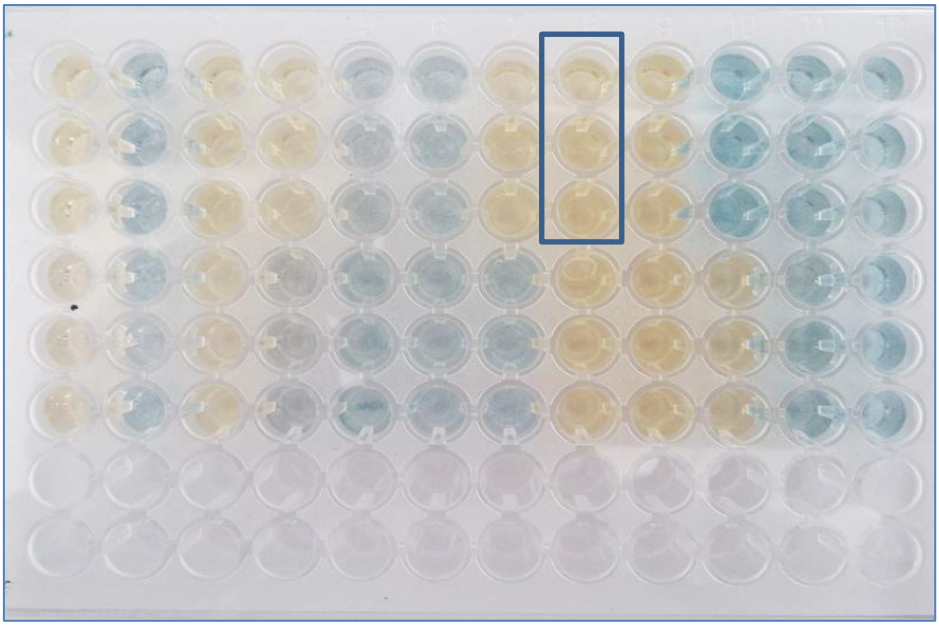


Tabela 14. Quantificação da produção de sideróforos equivalentes a EDTA (mmol L'1) por bactérias isoladas do sorgo e do milheto cultivados com e sem adubação nitrogenada (experimento II).

Sorgo (Exp.I)		**Sorgo (Exp.II)**		**Milheto (Exp.II)**	
Isolado	Produção	Isolado	Produção	Isolado	Produção
S01	0,19[b]	SSB445	0,36[a]	M122	0,51[a]
S02	0,10[d]	SSB446	0,04[c]	M123	0,49[a]
S03	0,26[a]	SSB447	0,47[a]	M124	0,31[c]
S04	0,25[a]	SSB448	0,04[c]	M126	0,33[b]
S07	0,20[b]	SSB449	0,51[a]	M127	0,50[a]
S08	0,02[f]	SSB450	0,19[b]	M128	0,40[b]
S15	0,06[e]	SSB452	0,32[b]	M129	0,49[a]
S20	0,23[a]	SSB453	0,25[b]	M130	0,39[b]
S21	0,06[e]	SSB454	0,26[b]	M131	0,33[b]
S23	0,12[c]	SSB459	0,15[c]	M133	0,14[d]
Ab-V5	0,23[a]	SSB462	0,01[c]	M134	0,35[b]
		SSB465	0,09[c]	M135	0,36[b]
		SSB472	0,01[c]	M136	0,51[a]
		SSB473	0,19[b]	M138	0,33[b]
		SSB474	0,26[b]	M139	0,51[a]
		SSB476	0,14[c]	M140	0,35[b]
		SSB477	0,13[c]	M141	0,51[a]
		SSB478	0,30[b]	M142	0,50[a]
		SSB479	0,15[c]	M143	0,16[d]
		SSB480	0,39[a]	M144	0,49[a]
		SSB481	0,13[c]	M146	0,29[c]
		SSB482	0,27[b]	M148	0,03[e]
		SSB487	0,13[c]	M149	0,23[c]
		SPB488	0,07[c]	M150	0,14[d]
		SPB489	0,20[b]	M151	0,51[a]
		SSB492	0,52[a]	M152	0,20[c]
		SSB493	0,16[c]	M154	0,03[e]
		SSB494	0,20[b]	M155	0,32[b]
		SSB495	0,23[b]	M156	0,30[c]
		Ab-V5	**0,22[b]**	M157	0,28[c]
				M158	0,28[c]
				M159	0,29[c]
				M160	0,22[c]
				M161	0,26[c]
				M162	0,46[a]
				M163	0,43[a]
				M164	0,14[d]
				Ab-V5	**0,25[c]**

Letras minúsculas compara entre isolados, letras iguais não diferem pelo teste de Skott-Knott a 5% ($p<0,05$). (S: sorgo, SS: sorgo Sacarino SF150, SP: Sorgo Ponta Negra, B: Bebedouro M: milheto).

Ao analisar a produção de sideróforos entre os 29 isolados do sorgo (experimento I) observa-se que apenas 10 isolados tiveram capacidade de produção desses compostos, com valores entre 0,02 e 0,26 mM em quantidades equivalentes as mesmas quantidades de EDTA para os isolados S08 e S03. Os isolados S20, S03 e S04 que produziram 0,26, 0,25 e 0,23 respectivamente, foram mais eficazes na produção de sideróforos por serem considerados iguais a estirpe de referência que produziu 0,23.

Dos 42 isolados do sorgo (experimento II) avaliados, 29 produziram sideróforos, com valores que variaram entre 0,01 (isolados SSB462 e SSB472) e 0,52 (isolado SSB492), destacando-se os isolados SSB445, SSB447, SSB449, SSB480, SSB492 que apresentaram produção elevada sendo superior a estirpe de referência que produziu 0,22 mM em quantidades equivalentes as mesmas quantidades de EDTA.

Resultados positivos também foram observados por todos os isolados do milheto, com valores que variaram entre 0,03 (isolados M148 e M154) e 0,51 (isolados M122, M141 e M151). As estirpes consideradas mais eficientes foram M122, M123, M127, M129, M136, M139, M141, M142, M144, M151, M162, M163 que apresentaram valores superiores a produção da estirpe de referência de 0,25 mM em quantidades equivalentes a quantidades de EDTA.

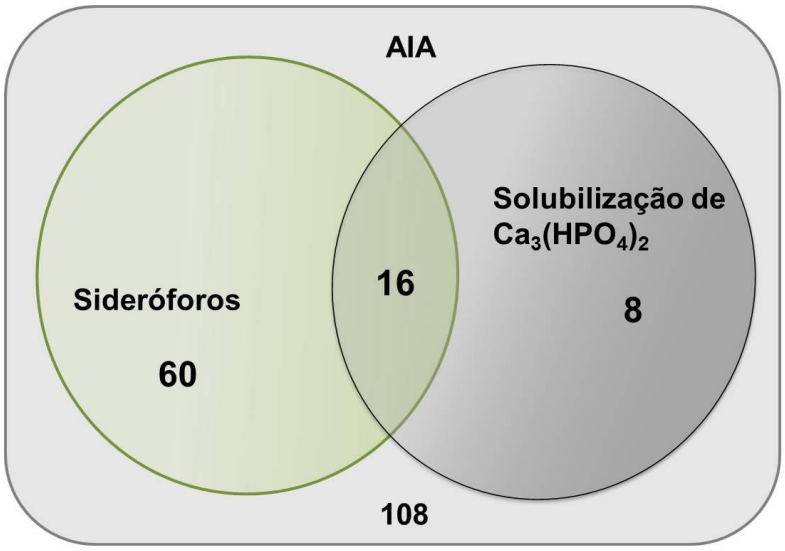
A produção e utilização de sideróforos é a estratégia mais eficaz dos micro-organismos para adquirir ferro protegendo-se dos efeitos tóxicos potenciais, estes compostos desempenham a função de solubilizar o ferro, em presença de outros íons metálicos, e incorporá-lo ao metabolismo celular (BENITE & MACHADO, 2002).

Muitos relatos sobre a produção de sideróforos são encontrados apenas com avaliações qualitativas, e os índices de caracterização em número de isolados com essa capacidade é muito inferior quando comparado às análises quantitativas como realizada nesse estudo. KUMAR et al. (2014) em análise qualitativa descreve que dos isolados provenientes de milheto e algodão 20,58% foram capazes de produzir sideróforos. Comparando com o presente trabalho, 69,04% dos isolados do sorgo e 97,36% dos isolados do milheto demonstraram essa capacidade em análises quantitativa.

A identificação de novas estirpes com potencial na produção de sideróforos em associação com uma diversidade de culturas de gramíneas indicam resultados positivos quanto a capacidade na promoção do crescimento vegetal, sendo a principal função desses compostos quelar o ferro diminuindo assim a disponibilidade para patógenos, além de serem considerados importantes componentes tecnológicos para fitorremediação pelo mecanismo de proteção contra toxicidade de metais (SCHALK et al., 2011; WANG et al., 2014; CHEN et al., 2016ª).

Figura 13. Análise dos mecanismos de promoção do crescimento “in vitro” dos isolados provenientes do sorgo e do milheto avaliados. Diagrama de Venn Fonte: Jéssica Fernanda da Silva

.



Ao analisar os diferentes mecanismos de promoção do crescimento vegetal “in vitro” observa-se que entre os 108 isolados obtidos dos quais todos foram capazes de produzir compostos indólicos, são destacadas 16 bactérias que produziram também sideróforos e tiveram capacidade de solubilizar tri-fosfato de cálcio. Demais isolados indicaram a eficiência da promoção do crescimento vegetal associada a mecanismos exclusivos de promoção do crescimento para alguns grupos de isolados, com 60 isolados que além de compostos indólicos produziram apenas sideróforos e oito que foram somente capazes de solubilizar tri-fosfato de cálcio e produzir compostos indólicos em quantidades variáveis (Figura 13).

O isolamento de bactérias apresentando mais de um mecanismo de promoção do crescimento de plantas representam resultados positivos pelo

favorecimento da interação destes isolados em atuarem de diferentes formas com as plantas nas condições de campo, estando diretamente ligados à eficiência na promoção do crescimento vegetal pelo suprimento nutricional e necessidades específicas das culturas. A maioria dos isolados que apresentaram esta característica foi proveniente do milheto.

O efeito da inoculação de estirpes pode ser influenciado pela competitividade entre elas, assim, a combinação de diferentes mecanismos de promoção de crescimento em uma mesma estirpe pode beneficiar o desenvolvimento de produtos inoculantes mais efetivos a partir da inoculação destes isolados (TRABELSI & MHAMDI, 2013),

As bactérias que apresentam apenas um mecanismo de promoção do crescimento indicam a possibilidade de atuação da comunidade bacteriana com um mecanismo individual para favorecer o crescimento de plantas em campo. Observa-se no presente trabalho que todos os isolados apresentaram capacidade de produzir compostos indólicos, porém, uma diversidade de isolados foi considerada mais eficiente quanto à capacidade de produzir sideróforos ou solubilizar fosfato. Estes resultados corroboram com os de Felestrino et al. (2017) que ao isolarem e caracterizarem bactérias promotoras de crescimento identificaram uma diversidade de grupos de isolados que se destacaram quanto aos mesmos mecanismos de promoção avaliados nesse estudo.

Embora menor diversidade de grupos tenha sido isolada do milheto, sem a ocorrência de gêneros de bactérias exclusivos, Esta cultura representou a maior associação de bactérias com potencial para os mecanismos de promoção do crescimento “in vitro”.

Entre os 16 isolados que apresentaram mais de um mecanismo de promoção do crescimento, 11 foram provenientes do milheto pertencentes a *Pantoea* sp., *Kosakonia* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Rhizobium* sp. e *Enterobacter* sp, nos quais determinados mecanismos se destacaram em relação a outros, ou ainda o potencial em eficiência de promoção foi estimado em algumas bactérias pela combinação de mais de um mecanismo avaliado.

Os isolados do sorgo cultivado com e sem adubação nitrogenada (experimento II), apresentaram cinco bactérias mais eficientes quanto ao potencial para promoção do crescimento vegetal, em relação a todos os mecanismos de promoção do crescimento avaliados in vitro. Entre estes cinco mais efetivos foram identificados apenas isolados de *Rhizobium* sp., porém, a maior diversidade de grupos de bactérias foi obtida desta cultura.

A abundância de bactérias capazes de fixar nitrogênio pode ser determinada pela análise de transcrição do gene *nif*H (SHARMA & SINGH, 2017). A comunidade bacteriana mais diversa do sorgo (experimento II) apresentou menor amplificação do gene *nif*H quando utilizados os primers universais (POLY et al., 2001) para amplificação deste fragmento, o que pode indicar uma maior diversidade de genes *nif*H entre estes isolados, sendo atribuída a estes a capacidade de fixação biológica de nitrogênio como principal contribuição para promover o crescimento de plantas.

Sharma & Singh (2017) ressaltam que a abundância de comunidades diazotróficas pode ser influenciada pelas condições ambientais de cultivo. O sorgo e o milheto foram cultivados nas mesmas condições, mas a associação dos isolados diazotróficos se diferenciou entre as culturas favorecendo a maior diversidade de bactérias diazotróficas no sorgo e a maior eficiência no potencial de promoção do crescimento pelos diferentes mecanismos analisados entre os isolados dos milheto.

5.4 EFICIÊNCIA NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL

5.4.1 Ensaio I- Eficiência dos isolados do sorgo (experimento I)

O primeiro ensaio foi conduzido com o cultivo de sorgo em vasos a pleno sol, para avaliar a eficiência de inoculação de isolados selecionados, quanto à influência no crescimento do sorgo, analisando o acúmulo de nutrientes e relacionando a capacidade dos isolados em promover o crescimento vegetal. Foi observado o efeito significativo dos tratamentos em relação a massa da parte aérea seca (MPAS), massa da raiz seca (MRS), massa total seca (MTS), Teor de N e N total, além da relação entre carbono e nitrogênio (Tabela 15).

Os valores médios de MPAS variaram entre 1,89 e 4,43g por planta com a inoculação dos isolados S30 e S13 respectivamente, os tratamentos controle não diferiram entre si e apenas cinco tratamentos inoculados com os isolados avaliados foram inferiores aos grupos controle. Não foi observada diferença significativa quanto a MRS, MTS, Rel C/N entre os tratamentos inoculados e os grupos controle. Em relação ao teor de N os valores apresentados variam de 10,32 mg/g para o isolado S04 a 34,97 mg/g para o tratamento controle com 100% de N adicionado.

Os resultados em relação ao teor de N apresentaram valores entre 10,32 mg/g correspondendo ao isolado S04 pertencente ao gênero *Kosakonia* a 34,97 mg/g para o tratamento controle com 100% de N adicionado. Os isolados S11, S27 e S30 correspondendo a *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp. e *Klebsiella* sp., respectivamente se destacaram por apresentarem valores considerados iguais ao tratamento controle inoculado com 50% de N que produziu 22,85 mg/g e ainda superiores a estirpe de referência Ab-V5 com 15,53 mg/g.

Os resultados mais expressivos quanto as diferenças significativas entre os tratamentos avaliados foram observados em relação ao N total acumulado, apresentando valores entre 23,01 mg/planta para o isolado S29 inoculado pertencente a *Enterobacter* sp. e 142,13 mg/planta obtido do tratamento controle com 100% N inoculado que foi superior a todos os grupos avaliados, bem como equivalente ao dobro do valor obtido pelo grupo controle de 50% N que produziu 76,41 mg/planta.

Tabela 15. Eficiência na promoção do crescimento vegetal de bactérias associativas isoladas do sorgo cultivado com e sem restrição hídrica e adubação orgânica (experimento I) inoculadas em sorgo cultivado em condições de casa de vegetação.

Tratamento	MPAS	MRS	MTS	Teor N (mg/g)	N total (mg/planta)	Rel C/N
S01	4,38^{a}	5,36^{a}	9,74^{a}	13,23^{c}	53,75^{b}	40,33^{a}
S02	2,59^{b}	3,94^{a}	6,54^{a}	18,65^{c}	35,87^{c}	27,87^{a}
S03	4,21^{a}	6,45^{a}	10,7^{a}	14,09^{c}	59,83^{b}	40,11^{a}
S04	4,25^{a}	5,71^{a}	9,96^{a}	10,32^{c}	42,36^{c}	48,04^{a}
S05	3,17^{a}	4,38^{a}	7,55^{a}	19,49^{c}	55,69^{b}	28,65^{a}
S06	3,26^{a}	4,79^{a}	8,06^{a}	17,37^{c}	54,02^{b}	27,75^{a}
S07	3,16^{a}	5,69^{a}	8,85^{a}	15,64^{c}	43,56^{c}	36,80^{a}
S08	4,25^{a}	4,63^{a}	8,88^{a}	15,92^{c}	66,64^{b}	32,56^{a}
S11	2,72^{b}	3,69^{a}	6,41^{a}	19,71^{b}	52,32^{b}	25,96^{a}
S12	4,24^{a}	6,30^{a}	10,5^{a}	12,33^{c}	53,18^{b}	42,29^{a}
S13	4,43^{a}	4,36^{a}	8,80^{a}	14,46^{c}	65,03^{b}	33,43^{a}
S15	2,51^{b}	4,28^{a}	6,80^{a}	15,64^{c}	36,16^{c}	33,28^{a}
S16	3,67^{a}	4,53^{a}	8,21^{a}	16,29^{c}	53,33^{b}	30,96^{a}
S18	3,89^{a}	5,07^{a}	8,97^{a}	15,83^{c}	56,13^{b}	30,17^{a}
S19	3,82^{a}	5,89^{a}	9,72^{a}	16,22^{c}	60,98^{b}	30,30^{a}
S20	3,48^{a}	4,27^{a}	7,75^{a}	14,66^{c}	47,65^{c}	33,58^{a}
S21	4,24^{a}	4,52^{a}	8,77^{a}	15,40^{c}	65,18^{b}	32,42^{a}
S22	2,76^{b}	6,01^{a}	8,78^{a}	17,69^{c}	40,35^{c}	29,60^{a}
S23	3,59^{a}	6,20^{a}	9,80^{a}	16,75^{c}	47,84^{c}	39,36^{a}
S24	3,56^{a}	4,60^{a}	8,17^{a}	17,73^{c}	61,44^{b}	29,87^{a}
S25	2,84^{b}	6,34^{a}	9,19^{a}	16,30^{c}	44,08^{c}	28,62^{a}
S27	2,02^{b}	2,60^{a}	4,63^{a}	22,74^{b}	44,13^{c}	20,16^{a}
S28	3,27^{a}	5,16^{a}	8,44^{a}	13,88^{c}	41,65^{c}	35,42^{a}
S29	1,98^{b}	4,33^{a}	6,31^{a}	13,94^{c}	23,01^{c}	37,48^{a}
S30	1,89^{b}	3,99^{a}	5,88^{a}	20,76^{b}	37,71^{c}	22,66^{a}
S31	3,54^{a}	4,25^{a}	7,79^{a}	16,02^{c}	53,02^{b}	30,56^{a}
S33	3,64^{a}	6,13^{a}	9,78^{a}	13,14^{c}	45,58^{c}	36,51^{a}
S35	3,90^{a}	4,41^{a}	8,31^{a}	15,54^{c}	53,11^{b}	34,06^{a}
Controles						
100N	4,37^{a}	4,10^{a}	8,48^{a}	34,97^{a}	142,13^{a}	13,74^{a}
50N	3,5^{a}	4,00^{a}	7,54^{a}	22,85^{b}	76,41^{b}	21,79^{a}
Test. Abs	3,15^{a}	3,45^{a}	6,61^{a}	13,64^{c}	40,15^{c}	37,72^{a}
Ab-V5	3,43^{a}	6,05^{a}	9,49^{a}	15,53^{c}	51,39^{b}	30,55^{a}

Letras minúsculas compara entre isolados, letras iguais não diferem pelo teste de Skott-Knott a 10% ($p<0,1$). MPAS: massa seca da parte aérea, MRS: massa seca da raiz, MTS: massa total seca, N total: nitrogênio total da parte aérea, Teor N: teor de nitrogênio.

As bactérias inoculadas consideradas mais promissoras correspondem a 14 isolados que apresentaram similaridade a *Kosakonia* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Rhizobium* sp., e *Burkholderia* sp. Os tratamentos correspondem a inoculação dos isolados S01, S03, S05, S06, S08, S11, S12, S13, S16, S18, S19,

S21, S31 e S35 estes exibiram resultados considerados iguais a estirpe de referência Ab-V5 que produziu 51,39 mg/planta e foram superiores ao controle inoculado com 50% de N.

O N total acumulado pode ser considerado a variável mais efetiva para caracterizar os isolados quanto à promoção do crescimento vegetal entre os tratamentos, pelo maior número de isolados destacados e a diferenciação entre os grupos controle. Porém, avaliando-se a relação dos isolados entre as diferentes variáveis observadas, destaca-se o isolado S11 que apresentou melhor resultado quanto a eficiência da inoculação quando comparado com a estirpe de referência, por apresentar valor superior a este tratamento em relação ao teor de N e igual em relação ao N total acumulado.

O isolado S11 pertencente ao gênero *Enterobacter* foi proveniente do isolamento do sorgo cultivado com adição de adubação orgânica com esterco caprino em uma lâmina de irrigação de 100% da demanda hídrica necessária, em meio semissólido Nfb. O gênero *Enterobacter* é descrito entre os diversos grupos que abrangem bactérias diazotróficas isoladas a gramíneas (MOREIRA et al., 2010).

Embora as estirpes avaliadas não representem eficiência de inoculação superior ao tratamento nitrogenado 100% em nenhuma das variáveis analisadas, a maioria dos isolados foi equivalente ao controle 50% N em relação ao N total, outras ainda superiores à estirpe de referência quanto ao teor de N, o que representa um suprimento nutricional que pode ser potencialmente aplicado quando associado a outras estratégias de inoculação como o aumento da concentração de células viáveis inoculadas, coinoculação com diferentes estirpes, ou mesmo para suprir parcialmente a demanda de N fertilizante (TRABELSI & MHAMDI, 2013).

5.4.2 Ensaio II- Eficiência dos isolados do sorgo (experimento II)

O segundo ensaio foi conduzido nas mesmas condições do experimento anterior sendo neste avaliado o cultivo de sorgo em vasos a pleno sol com a inoculação dos isolados do sorgo no experimento II, para analisar a eficiência de inoculação de 33 isolados selecionados para cultura, avaliando a influência no rendimento e relacionando a capacidade dos isolados em promover o crescimento vegetal. Os resultados estão apresentados na tabela 16 e figura 14.

Ao avaliar a influência da inoculação em relação ao rendimento do sorgo no segundo ensaio realizado, observa-se que entre as variáveis analisadas não houve diferença significativa em relação ao C/N. A análise da MPAS apresentou valores entre 0,72 g/planta para testemunha absoluta e 3,70 g/planta do tratamento inoculado com isolado 463, grande parte dos isolados se destacaram em relação a produção de MPAS por serem considerados iguais a estirpe de referência Ab-V5 que produziu 2,70 g/planta e ao tratamento inoculado com 100% de N que apresentou 2,63 g/planta , sendo ainda este grande número de isolados superiores ao tratamento inoculado com 50% de N.

Analisando os resultados obtidos para MRS observa-se valores entre 0,81 g/planta e 4,02 g/planta dos tratamentos inoculados com os isolados 454 e 492 respectivamente. Ao comparar com os grupos controle foi observado efeito semelhante aos resultados obtidos da MPAS com grande parte dos tratamentos apresentando valores de MRS iguais a estirpe Ab-V5 (3,57g/planta) usada como referência e o tratamento nitrogenado 100%N (2,47 g/planta). Nenhum tratamento foi considerado inferior aos controles.

Em relação ao teor de N os valores estiveram entre 0,61% para o tratamento inoculado com o isolado 468 e 2,48% para o controle de 100% de N inoculado. Os isolados inoculados considerados mais eficientes em relação a esta variável apresentaram valores estatisticamente iguais aos tratamentos nitrogenados e superiores a estirpe de referência que apresentou 1,41 % sendo este valor igual a todos os demais tratamentos analisados.

Tabela 16. Eficiência na promoção do crescimento vegetal de bactérias associativas isoladas do sorgo cultivado com e sem adubação nitrogenada (experimento II), inoculadas em sorgo cultivado em condições de casa de vegetação.

Tratamento	MPAS	MRS	Teor N (%)	Ntotal	Real c/n
445	1,66^{b}	1,88^{b}	1,49^{b}	21,87^{c}	39,48^{a}
446	2,84^{a}	3,86^{a}	1,73^{a}	48,35^{a}	26,84^{a}
448	2,62^{a}	2,80^{a}	1,54^{a}	37,73^{b}	30,81^{a}
449	1,92^{b}	1,56^{b}	1,96^{a}	33,74^{b}	25,03^{a}
450	1,88^{b}	1,94^{b}	1,26^{b}	22,39^{c}	41,88^{a}
452	3,17^{a}	3,0^{a}	1,67^{a}	44,93^{a}	36,84^{a}
453	1,66^{b}	1,73^{b}	1,56^{a}	23,72^{c}	38,15^{a}
454	0,97^{b}	0,81^{b}	1,92^{a}	21,04^{c}	24,08^{a}
457	1,54^{b}	1,61^{b}	2,12^{a}	32,28^{b}	21,61^{a}
459	2,76^{a}	2,10^{b}	1,35^{b}	32,43^{b}	42,29^{a}
462	1,09^{b}	1,86^{b}	1,42^{b}	15,45^{d}	33,20^{a}
463	3,70^{a}	2,54^{a}	1,00^{b}	36,57^{b}	47,37^{a}
464	2,54^{a}	2,26^{b}	1,78^{a}	41,43^{b}	26,93^{a}
465	2,98^{a}	3,92^{a}	1,15^{b}	34,64^{b}	41,05^{a}
468	2,21^{a}	3,13^{a}	0,61^{b}	12,39^{d}	78,84^{a}
470	2,36^{a}	3,09^{a}	1,66^{a}	31,57^{b}	34,12^{a}
472	2,23^{a}	2,13^{b}	1,14^{b}	22,60^{c}	46,98^{a}
473	2,46^{a}	2,00^{b}	1,40^{b}	25,61^{b}	52,74^{a}
476	2,08^{a}	2,83^{a}	1,72^{a}	31,24^{b}	31,28^{a}
477	3,27^{a}	3,73^{a}	1,02^{b}	34,00^{b}	51,47^{a}
479	1,79^{b}	2,26^{b}	1,63^{a}	26,98^{b}	30,01^{a}
480	2,76^{a}	2,75^{a}	1,07^{b}	24,76^{b}	60,46^{a}
481	1,79^{b}	2,03^{b}	1,86^{a}	33,76^{b}	35,10^{a}
483	2,68^{a}	3,46^{a}	1,22^{b}	29,50^{b}	49,74^{a}
485	2,57^{a}	3,10^{a}	1,36^{b}	31,00^{b}	39,74^{a}
486	0,80^{b}	1,13^{b}	1,58^{a}	11,31^{d}	34,44^{a}
487	3,09^{a}	2,04^{b}	1,86^{a}	55,92^{a}	25,28^{a}
488	2,36^{a}	2,90^{a}	1,06^{b}	25,28^{b}	45,68^{a}
489	1,92^{b}	2,13^{b}	1,62^{a}	29,74^{c}	31,89^{a}
492	2,64^{a}	4,02^{a}	1,06^{b}	27,73^{c}	49,45^{a}
493	2,59^{a}	2,73^{a}	1,07^{b}	26,73^{b}	43,38^{a}
494	1,28^{b}	2,29^{b}	2,41^{a}	30,83^{b}	42,78^{a}
495	3,31^{a}	3,07^{a}	1,52^{a}	48,73^{a}	31,21^{a}
			Controles		
50% N	1,01^{b}	1,99^{b}	2,17^{a}	22,57^{c}	24,03^{a}
100% N	2,63^{a}	2,47^{a}	2,48^{a}	63,01^{a}	19,78^{a}
Ab-V5	2,70^{a}	3,57^{a}	1,41^{b}	37,19^{b}	38,20^{a}
T.abs	0,72^{b}	1,50^{b}	1,32^{b}	7,13^{d}	47,54^{a}

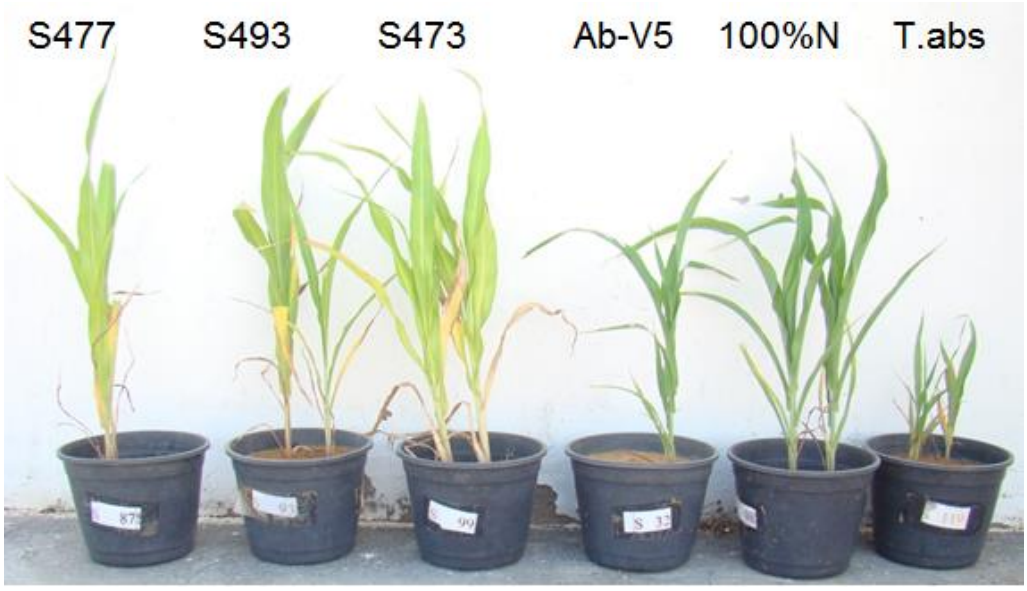
Letras minúsculas compara entre isolados, letras iguais não diferem pelo teste de Skott-Knott a 10% ($p<0,05$). MPAS: massa seca da parte aérea, MRS: massa seca da raiz, MTS: massa total seca, N total: nitrogênio total da parte aérea, Teor N: teor de nitrogênio.

Assim como no primeiro ensaio de inoculação de isolados do sorgo, os resultados que mais se destacaram em relação às variáveis avaliadas foram em relação ao N total acumulado entre os tratamentos. Os valores estiveram entre 7,13 mg/planta obtido do controle não inoculado testemunha absoluta e 63,01 mg/planta do tratamento inoculado com 100% de N. São destacados os tratamento inoculados com os isolados 446, 452, 487 e 495 que foram superiores a estirpe de referência e considerados iguais ao inoculado com 100%N o que representa um suprimento nutricional de nitrogênio eficiente por ser equivalente a adição do fertilizante nitrogenado, estes isolados destacados também demonstraram eficiência já descrita para a MPAS e MRS e teor de N.

Ainda em relação ao N total acumulado um grande número de isolados também demonstrou eficiência já descrita para a MPAS e MRS e teor de N, e foram eficientes tanto quanto a estirpe de referência que apresentou 37,19 mg/planta.

A nutrição vegetal é altamente dependente da disponibilidade de N_2, sendo atribuída a bactérias diazotróficas a capacidade em facilitar a nutrição nitrogenada das plantas a partir da fixação biológica de nitrogênio fornecendo parte do suprimento de N demandado pela cultura (MOREIRA et al., 2010; BOUFFAUD et al., 2016).

Figura 14. Avaliação da eficiência de promoção do crescimento do sorgo. Da esquerda para direita: Tratamentos inoculados com os isolados 477, 493, Ab-V5, 100%N e testemunha absoluta. Foto: Jéssica Fernanda da Silva.



5.4.3 Ensaio III- Eficiência dos isolados do milheto (experimento II)

O terceiro ensaio foi conduzido nas mesmas condições dos experimentos anteriores avaliando o cultivo de milheto em vasos a pleno sol com a inoculação dos isolados do milheto do experimento II, para analisar a eficiência de inoculação de 33 isolados selecionados para cultura, avaliando a influência relacionada a capacidade dos isolados em promover o crescimento vegetal (Tabela 17, Figura 15).

Os resultados obtidos quanto ao efeito de inoculação do milheto pelos isolados não apresentaram diferença significativa tanto em relação ao C/N quanto ao teor de N. Porém, os valores da MPAS variaram de 1,82 a 10,43 g/planta entre os tratamentos inoculados com as bactérias 159 e 163 respectivamente. Os isolados que mais se destacaram foram considerados iguais aos tratamentos nitrogenados 50% de N e 100% de N e inoculado com a estirpe de referência que não diferiram entre si.

Em relação a MRS o menor valor obtido foi de 1,65 g/planta do tratamento inoculado com a estirpe de referência Ab-V5 e o maior valor de 6,20 g/planta do isolado 143. Grande parte dos isolados se destacou quanto à eficiência de inoculação pela grande produção de MRS sendo estes superiores a todos os tratamentos controle.

Assim, como nos demais ensaios de eficiência de inoculação realizados no presente trabalho, os resultados do N total acumulado destacaram os isolados mais promissores quanto ao efeito de inoculação. Os valores obtidos estiveram entre 51,46 mg/planta do tratamento testemunha absoluta e 230,20 mg/planta do inoculado com o isolado 163. Os isolados 122, 131, 139, 142, 160, 162 e 164 foram os mais eficientes sendo considerados iguais ao efeito dos tratamentos controle 100% N, 50% N e Ab-V5 que não diferiram entre si.

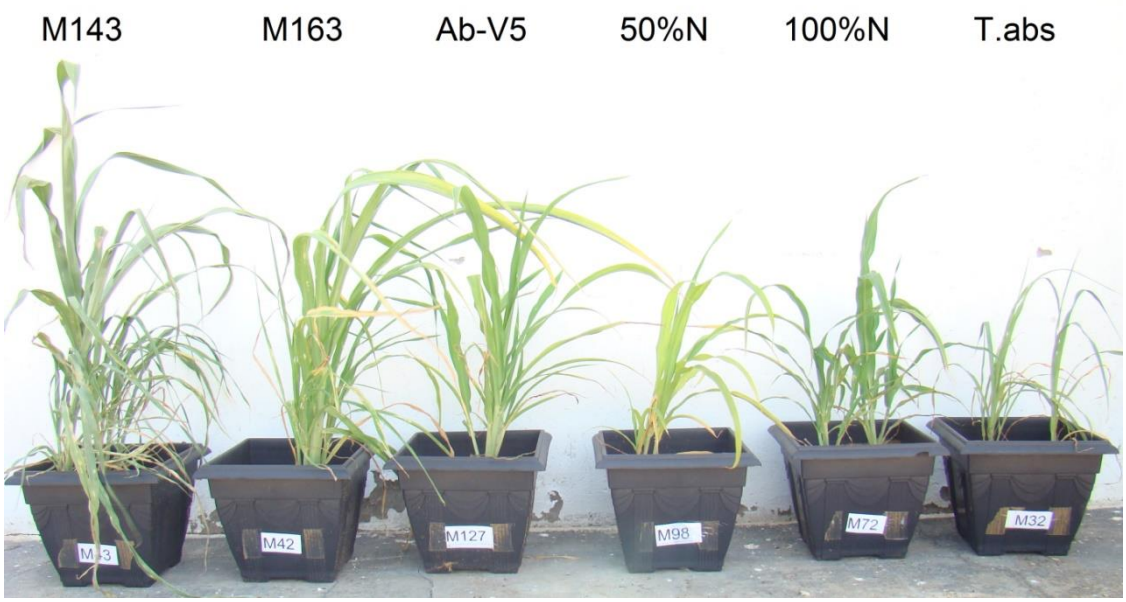
Estes isolados foram oriundos das plantas cultivadas com ou sem adição de nitrogênio. Como os isolados inoculados que apresentaram maiores valores de N total acumulado nos tratamentos inoculados. O isolado 163 demonstrou o maior valor obtido, sendo proveniente do isolamento na superfície da raiz do milheto cultivado com adição de nitrogênio, seguido do isolado 160 oriundo do isolamento endofítico no colmo cultivado sem adição de N.

Tabela 17. Eficiência na promoção do crescimento vegetal de bactérias associativas isoladas do milheto cultivado com e sem adubação nitrogenada (experimento II) inoculadas em milheto cultivado em condições de casa de vegetação.

Tratamento	MPAS	MRS	Teor N (%)	N total	Rel c/n
M122	5,84^{a}	5,71^{a}	2,41^{a}	145,27^{a}	18,74^{a}
M123	3,71^{b}	4,22^{a}	2,38^{a}	85,23^{b}	18,69^{a}
M126	3,85^{b}	5,15^{a}	2,05^{a}	79,90^{b}	22,09^{a}
M127	2,32^{b}	3,67^{b}	2,29^{a}	48,65^{b}	22,30^{a}
M128	5,62^{a}	5,01^{a}	1,89^{a}	107,77^{b}	22,89^{a}
M129	2,65^{b}	2,72^{b}	2,18^{a}	54,36^{b}	23,77^{a}
M130	2,69^{b}	3,22^{b}	2,21^{a}	44,51^{b}	23,14^{a}
M131	6,42^{a}	5,03^{a}	2,04^{a}	128,84^{a}	20,72^{a}
M133	3,12^{b}	4,26^{a}	2,73^{a}	84,62^{b}	25,53^{a}
M134	3,13^{b}	3,04^{b}	2,20^{a}	68,75^{b}	26,80^{a}
M135	3,71^{b}	2,85^{b}	1,95^{a}	70,37^{b}	23,71^{a}
M136	3,21^{b}	4,38^{a}	2,09^{a}	81,04^{b}	21,65^{a}
M138	5,33^{a}	3,91^{a}	2,00a	106,27^{b}	22,92^{a}
M139	5,66^{a}	4,41^{a}	2,47^{a}	147,31^{a}	19,90^{a}
M140	3,84^{b}	4,00a	2,06^{a}	86,55^{b}	23,80^{a}
M141	3,81^{b}	4,05^{a}	2,03^{a}	77,05^{b}	23,02^{a}
M142	5,70^{a}	4,92^{a}	2,56^{a}	155,86^{a}	16,88^{a}
M143	5,63^{a}	6,20^{a}	2,09^{a}	106,40^{b}	21,37^{a}
M144	4,33^{b}	2,30^{b}	2,19^{a}	97,03^{b}	23,04^{a}
M146	4,16^{b}	5,53^{a}	1,71^{a}	77,12^{b}	30,47^{a}
M150	4,89^{a}	5,93^{a}	2,18^{a}	109,46^{b}	19,74^{a}
M151	5,63^{a}	5,45^{a}	2,32^{a}	139,49^{a}	20,11^{a}
M152	3,61^{b}	2,64^{b}	1,82^{a}	63,61^{b}	24,39^{a}
M154	5,03^{a}	5,26^{a}	2,24^{a}	114,38^{b}	23,40^{a}
M155	3,75^{b}	3,09^{b}	2,20^{a}	87,55^{b}	21,09^{a}
M156	5,13^{a}	4,86^{a}	1,82^{a}	89,50^{b}	26,73^{a}
M158	3,92^{b}	3,31^{b}	2,39^{a}	94,09^{b}	17,79^{a}
M159	1,82^{b}	3,00^{b}	1,89^{a}	32,27^{b}	25,28^{a}
M160	6,22^{a}	5,38^{a}	2,95^{a}	192,44^{a}	14,53^{a}
M161	2,87^{b}	3,21^{b}	2,05^{a}	54,79^{b}	21,84^{a}
M162	6,63^{a}	6,09^{a}	2,72^{a}	178,14^{a}	16,23^{a}
M163	10,48^{a}	5,93^{a}	1,99^{a}	230,20^{a}	23,57^{a}
M164	5,78^{a}	5,30^{a}	2,19^{a}	126,77^{a}	20,41^{a}
Controles					
50%	5,11^{a}	1,80^{b}	2,87^{a}	119,84^{a}	16,93^{a}
100%	4,97^{a}	2,87^{b}	3,20^{a}	142,98^{a}	14,31^{a}
Ab-V5	4,85^{a}	1,65^{b}	2,36^{a}	113,96^{a}	19,14^{a}
T.abs	3,00^{b}	2,59^{b}	1,62^{a}	51,46^{b}	27,17^{a}

Letras minúsculas compara entre isolados, letras iguais não diferem pelo teste de Skott-Knott a 10% ($p<0,05$). MPAS: massa seca da parte aérea, MRS: massa seca da raiz, MTS: massa total seca, N total: nitrogênio total da parte aérea, Teor N: teor de nitrogênio.

Figura 15. Avaliação da eficiência de promoção do crescimento do milheto. Tratamentos inoculados com os isolados M143, M163, Ab-V5, 50%N, 100%N e testemunha absoluta. Foto: Jéssica Fernanda da Silva.



Os isolados destacados apresentaram rendimento elevado em todas as variáveis avaliadas. Entre os já identificados são observados como pertencentes a *Pantoea* sp. (M122), *Pseudomonas* sp.(131), *Burkholderia* sp.(139) e *Rhizobium* sp.(142).

Os melhores resultados observados nos tratamentos inoculados mais promissores podem estar relacionados à capacidade desses micro-organismos em atuarem na promoção do crescimento vegetal, tanto pela FBN quanto por demais mecanismos que favorecem o desenvolvimento da cultura (SUGAWARA et al, 2015; SHAO et al, 2015; BABALOLA, 2010; OLIVEIRA et al., 2015). Podendo estimar a eficiência de novos grupos de bactérias, pelo potencial em contribuir no suprimento nutricional das plantas, além dos resultados superiores a estirpes de referência que já são efetivas na inoculação.

Os isolados abrangem bactérias com efeito positivo de inoculação nos ensaios de eficiência “in vivo” no sorgo e no milheto. Avaliando as bactérias associativas que mais se destacaram na inoculação do sorgo no primeiro ensaio e correlacionando com os diferentes mecanismos de promoção do crescimento analisados, destaca-se entre os isolados mais eficazes para o crescimento do sorgo inoculado, alguns pertencentes a *Kosakonia* sp., *Klebisiella* sp. *Rhizobium* sp. e

Burkholderia sp. que apresentaram valores iguais ao tratamento da estirpe controle e foram superiores ao controle com 50% de N, todos estes isolados S01, S03, S05, S06, S08, S12, S13, S16, S18, S19, S21, S31, S35 demonstraram capacidade de produção de compostos indólicos e os isolados S1, S03, S08, S21 produziram também sideróforos.

O isolado S11 *Enterobacter* sp pode ser considerado o mais eficiente entre os isolados avaliados no primeiro ensaio quanto à promoção do crescimento vegetal, pois além do seu potencial diazotrófico confirmado, apresentou capacidade para produzir compostos indólicos em valores considerados iguais a estirpe de referência Ab-V5 que é considerada uma bactéria eficiente pela boa produção de hormônios vegetais, tendo ainda este mesmo isolado S11 sido superior a mesma estirpe controle quanto ao teor de N e igual em relação ao N total acumulado observado no ensaio de eficiência ‘in vivo”.

Cabe ressaltar que, avaliando os três experimentos em relação às variáveis que apresentaram diferenças significativas, 56 isolados foram considerados iguais a estirpe Ab V5 na produção de massa da parte aérea seca, 67 foram iguais a estirpe de referência na produção de raízes secas, 20 isolados foram superiores a Ab V5 em relação ao teor de N e quatro isolados foram superiores a mesma estirpe de referência em relação ao nitrogênio total acumulado. A estirpe de referência foi selecionada, pois apresenta eficiência agronômica nas culturas do milho, trigo e arroz (HUNGRIA et al., 2010), sendo oficialmente recomendada pelo MAPA para estas culturas. Além destas, este isolado já foi testado e apresentou elevada eficiência agronômica em forrageiras como o capim brachiaria (*Brachiaria* sp.) (HUNGRIA et al., 2016). Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que os isolados de sorgo e milheto obtidos apresentam potencial para ter melhor desempenho que a estirpe Ab V5 em condições de campo.

Liu et al. (2016) relata diversos trabalhos com ensaios de promoção do crescimento vegetal dos quais a maior eficiência de inoculação foi atribuída a isolados pertencentes a *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp., e comparou esses relatos com seus resultados destacando o gênero *Enterobacter* sp. como superior em eficiência na promoção do crescimento aos demais grupos identificados corroborando com o presente trabalho.

Em relação às bactérias inoculadas no segundo ensaio são destacados os isolados do sorgo 446, 452, 487 e 495 que além da produção de compostos indólicos tiveram a capacidade de produzir sideróforos. O que pode ter favorecido o bom rendimento da MPAS e MRS e teor de N. Os isolados identificados 452 e 495 são pertencentes a *Rhizobium* sp. e *Kosakonia* sp. respectivamente.

Dentre os isolados do milheto foram destacados 122, 131, 139, 142, 160, 162 e 164 como os mais eficientes no terceiro ensaio in vivo avaliando o rendimento da MPAS e MRS e teor de N. Além da boa produção de compostos indólicos por estes isolados já citados com destaque ao isolado 164 proveniente da superfície da raiz do milheto cultivado com adição de nitrogênio que produziu compostos indólicos em quantidades superiores a estirpe de referência.

É ressaltado ainda que entre os isolados mais promissores inoculados ao milheto todos produziram sideróforos em quantidades superiores a estirpe de referência como observados nos isolados M122 *Pantoea* sp. , 139 *Burkholderia* sp. e 142 *Rhizobium* sp. que foram isolados tanto da superfície da raiz (M122) como de forma endofítica na raiz (M139) e no colmo (M142) e todos cultivados com adição de N.

Os diversos mecanismos diretos e indiretos das bactérias promotoras de crescimento vegetal influenciam o crescimento da raiz e das plantas em maior ou menor proporção a depender da associação dos micro-organismos com diferentes plantas (GUPTA et al., 2013; SOUSSI et al., 2015).

Apesar dos isolados do sorgo apresentaram resultados relevantes em relação a eficiência de inoculação como observado pelo efeito dos isolados nos tratamento que foram considerados iguais ao controle nitrogenado 100%N suprindo completamente a demanda nutricional da planta.

As bactérias caracterizadas como promotoras de crescimento demonstraram melhor associação a cultura do milheto em comparação com sorgo, em relação ao maior número de isolados eficientes. Entre os 37 isolados do milheto todos produziram compostos indólicos e sideróforos e 11 solubilizaram Tri-fosfato de cálcio, porém, embora todos os 42 isolados do sorgo também tenham produzido compostos indólicos apenas 29 apresentaram capacidade de produzir sideróforos e

8 de solubilizar fosfato. O que pode ter contribuído diretamente para a maior eficiência de inoculação de isolados do milheto no ensaio de promoção do crescimento vegetal “in vivo” suprindo a necessidade nutricional das plantas de forma equivalente aos tratamentos nitrogenado ou superiores a estirpe de referência.

CONCLUSÕES

Uma diversidade de bactérias potencialmente promotoras de crescimento vegetal foi obtida em associação com o sorgo e o milheto em todas as condições de cultivo das culturas em campo.

Os isolados foram provenientes de plantas cultivadas nas diferentes condições de irrigação e adubação, sendo destacados alguns mais eficientes em associação com plantas submetidas ao déficit hídrico ou ausência de adubação nitrogenada.

Maior número de grupos taxonômicos foram obtidos do sorgo em relação ao milheto; incluindo diversidade de grupos relatados pela associação com diferentes gramíneas.

Do total de 124 isolados a partir dos dois experimentos, 87,90% foram confirmados quanto ao potencial de fixação de N por meio da formação da película microaerofílica e amplificação do gene *nif*H;

As bactérias isoladas do sorgo e milheto apresentaram capacidade de produção de compostos indólicos, Sideróforos e solubilização de tri-fosfato de cálcio, de forma individual ou combinada entre os isolados, destacando-se as estirpes provenientes do milheto que apresentaram melhores resultados quanto a esses mecanismos.

Entre os isolados avaliados quanto a inoculação “in vivo” alguns apresentaram resultados positivos em relação ao teor de N e N acumulado pelas plantas, suprindo o equivalente aos valores obtidos pelos tratamentos com 50% de N e 100% de N ou ainda sendo superiores a estes controles e a estirpe de referência Ab-V5.

Os isolados do milheto demonstraram melhor eficiência de inoculação, com maior número de isolados apresentando diferentes mecanismos de promoção do crescimento.

.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALLA, M.H.; EL-SAYED, E. A.; RASMEY, A. M. Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil in Egypt **Journal of Biology and Earth Sciences**, v 3, p. 82-93, 2013.

ANGUS, A. A.; AGAPAKIS, C. M.; FONG, S.; YERRAPRAGADA, S. ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; YANG, P.; SONG, N.; KANO, S.; CABALLERO-MELLADO, J.; FARIA, S. M.; DAKORA, F.D.; WEINSTOCK, G.; HIRSCH, A. M. Plant-associated symbiotic burkholderia species lack hallmark strategies required in Mammalian pathogenesis. **PLoS One**, v 9, p. 1–12, 2014.

ANTUNES, G.R. Diversidade e eficiência na promoção do crescimento vegetal por bactérias isoladas de plantas forrageiras do Semiárido. Dissertação de mestrado. Petrolina-PE, Universidade Federal do Vale do São Francisco. Programa de Pós-graduação em Ciência animal. 93fls, 2016.

AIZAWA,T.; VIJARNSORN, P.; MUTSUYASU, N.; SUNAIRI, M. *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acidneutralizing bacterium isolated from torpedo grass (Panicum repens) growing in highly acidic swamps Tomoko. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v 61, p. 1645–1650, 2011.

ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L.; EL-DEIR, A. C. A.; LIMA, A. L. A, SOUTO, A.; BEZERRA, B.M. Caatinga Revisited: Ecology and conservation of an important seasonal dry forest. **Scientific World Journal**, v 2012, p.1-18, 2012.

ASERSE, A. A.; RÄSÄNEN, L. A.; ASEFFA, F.; HAILEMARIAM, A.; LINDSTRÖM, K. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. **Applied Microbiology Biotechnology**, v 97**,** p.10117–10134, 2013.

AUSTIN A. T.; BUSTAMANTE, M. M. C.; NARDOTO, G. B.; MITRE, S. K.; PÉREZ, T.; OMETTO, J. P. H. B. ASCARRUNZ, N. L.; FORTI, M. C.; LONGO, K.; GAVITO, M. E.; ENRICH-PRAST, A.; MARTINELLI, L. A. Latin America's Nitrogen Challenge. **Science**, v 340, p.340, 2013.

AYYAZ, K.; ZAHEER, A.; RASUL, G.; MIRZA, M. S. Isolation and identification by 16S rRNA sequence analysis of plant growth-promoting azospirilla from the rhizosphere of wheat. **Brazilian Journal of Microbiology**,v 47, p. 542–550, 2016.

BABALOLA, O.O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, v 32, p. 1559-1570, 2010.

BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BOLOTA, E.; BALDANI, J.L.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkhorderia brasiliensissp*. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v 69, p. 116, 1997.

BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; VIDEIRA, S.S.; BODDEY, L.H.; BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v 384, p. 413-431, 2014.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v 16, p. 729-770,1998.

BASS, A.M.; BIRD, M. I.; KAY, G.; MUIRHEAD, B. Soil properties, greenhouse gas emissions and crop yield under compost, biochar and co-composted biochar in two tropical agronomic systems. **Science of the Total Environment**, v 550, p. 459-470, 2016.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S.P. Sideróforos: “Uma resposta dos microorganismos”.**Quimica Nova**, v 25, p. 1155-1164, 2002.

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.

BERGAMASCHI, C.; ROESCH,L. F. W.; QUADROS, P. D.; CAMARGO, F. A. O.Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**, v 37, p. 727-733, 2007.

BOECHAT, L.; GIOVANELLA, P.; AMORIM, M. B.; SÁ, E. L. S.;CAMARGO, F. A. O. Metal-resistant rhizobacteria isolates improve Mucuna deeringiana phytoextraction capacity in multi-metal contaminated soils from a gold mining area Cácio. **Environmental Science and Pollution Research**, DOI 10.1007/s11356-016-8103-1, 2016.

BOHLOOL, B. B.; LADHA, J. K.; GARRITY, D. P.; GEORGE T. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. **Plant and Soil**, Manila, Philippines,v141, p.1-11, 1992.

BOUFFAUD, M.L.; RENOUD, S.; LOCCOZ, Y. M.; MULLER, D. Is plant evolutionary history impacting recruitment of diazotrophs and *nif*H expression in the rhizosphere? **Scientific Reports**, p. 1-9, 2016.

BRADYA,C.; CLEENWERCK, I.; VENTER, S.; COUTINHO, T.; VOS, P. D. Taxonomic evaluation of the genus Enterobacter based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify E. nimipressuralis and E. amnigenus into Lelliottia gen. nov. as Lelliottia nimipressuralis comb. nov. and Lelliottia amnigena comb. nov., respectively, E. gergoviae and E. pyrinus into Pluralibacter gen. nov. as Pluralibacter gergoviae comb. nov. and Pluralibacter pyrinus comb. nov., respectively, E. cowanii, E. radicincitans, E. oryzae and E. arachidis into Kosakonia gen. nov. as Kosakonia cowanii comb. nov., Kosakonia radicincitans comb. nov., Kosakonia oryzae comb. nov. and Kosakonia arachidis comb. nov., respectively, and E. turicensis, E. helveticus and E. pulveris into Cronobacter as Cronobacter zurichensis

nom. nov., Cronobacter helveticus comb. nov. and Cronobacter pulveris comb. nov., respectively, and emended description of the genera Enterobacter and Cronobacter. **Systematic and Applied Microbiology**, v36, p. 309–319,2013.

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.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Subsídios para a elaboração do plano de ação para a prevenção e controle do desmatamento na Caatinga / Ministério do Meio Ambiente. -Brasília.128 p., 2011.

BRISSE, S.; PASSET, V.; GRIMONT, P.A.D. Description of Klebsiella quasipneumoniae sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae subsp. nov. and Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae subsp. nov., and demonstration that Klebsiella singaporensis is a junior heterotypic synonym of Klebsiella variicola. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v 64, p. 3146–3152, 2014.

CARDINALE, M.; BRUSETTI, L.; QUATRINI, P.; BORIN, S.; PUGLIA, AM.; RIZZI, A.; ZANARDINI, E.; SORLINI, C.; CORSELLI, C.; DAFFONCHIO, D. Comparison of different primer sets for the Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) of Complex Bacterial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v 70, p. 6147–6156, 2004.

CARVALHO, T. L. G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R. M.; FERREIRA, P. C.; HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bactéria. **Journal of Experimental Botany**,v 65, p. 5631–5642, 2014.

CHANWAY, C.P.; ANAND, R.; YANG, H. Nitrogen fixation outside and inside plant tissues. In: Ohyama, Takuji (Ed.), **Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation**, p. 3-23, 2014.

CHEN, Y.; CHAO, Y.; LI, Yaying.; LIN, Q.; BAI, J.; TANG, Lu.; WANG, S.; YING, R.; QIU,R. Survival Strategies of the Plant-Associated Bacterium *Enterobacter* sp. Strain EG16 under Cadmium Stress. **Applied and Environmental Microbiology** ,v 82, p. 1734-44, 2016(a).

CHEN, J.; MOINARD, M.; XU, J.; WANG, S.; FOULONGNE-ORIOL, M.; ZHAO, R.; HYDE, K, D.; CALLAC, P. Genetic Analyses of the Internal Transcribed Spacer Sequences Suggest Introgression and Duplication in the Medicinal Mushroom Agaricus subrufescens.**Plos One**, v 11, p. 1-15, 2016(b).

CIAMPITTI, I. A.; PRASAD, P. V. V. Historical Synthesis-Analysis of Changes in Grain Nitrogen Dynamics in Sorghum. **Frontiers in Plant Science**, v 7, p. 1-11, 2016.

CIESIELSKI, D. S.; BUŁKOWSKA, K.; DABROWSKA, D.; KACZMARCZYK, D.; KOWAL, P.; MOZEJKO, J. Ribosomal Intergenic Spacer Analysis as a Tool for Monitoring Methanogenic Archaea Changes in an Anaerobic. **Current Microbiology**, v.67, p. 240–248, 2013.

CLAVIJO, C.; CHIPANA, V.; CENTENO, J.; ZÚÑIGA, D.; GUILLÉN, C. Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* “Olivo” en Tacna Perú. **Ecología Aplicada**, v 11, p. 89-102, 2012.

COELHO, M. R. R.; VOS, M.; CARNEIRO, N. P.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, E.; SELDIN, L. Diversity of *nif*H 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. 15–22, 2008.

COLLINO, D. J.; SALVAGIOTTI, F.; PERTICARI, A.; PICCINETTI, C.; OVANDO, G.; URQUIAGA, S.; RACCA, R.W. Biological nitrogen fixation in soybean in Argentina: relationships with crop, soil, and meteorological factors. **Plant Soil**, v 392, p.239–252, 2015.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; MENNA, P. BANGEL, E. V; HUNGRIA, M. Multilocus Sequence Analysis (MLSA) of *bradyrhizobium* strains: Revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bactéria. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 698-710, 2012.

DÖBEREINER J.; Ruschel A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, v 1, p. 261–272, 1958.

DÖBEREINER J. *Azotobacter paspali* sp. nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, p. 357-365, 1966.

DOBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and fixing sites. **International Symposium on Nitrogen Fixation**, v 2, p. 518-538, 1976.

DOBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N2 fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v 44, p. 310–313, 1992.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. EMBRAPA – SPI, EMBRAPA-CNPAB, 60p., 1995.

DOBEREINER, Joana. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.1, p.1-2, 1997.

DOTY, S. L.; SHER, A. W.; FLECK, N. D.; KHORASANI, M.; BUMGARNER, R.E.; KHAN, Z.; KO, A. W. K.; KIM, S.; LUCA, T.H.D. Variable Nitrogen Fixation in Wild Populus**. Plos One**, v 11, p. 1-22, 2016.

EMBRAPA, Manual de Métodos de Análise de Solo. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, v 2, 212 p.,1997.

EMBRAPA. A cultura do Milheto. **Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas MG, 2008.

ESTRADA DE LOS SANTOS,P.; BUSTILLOS-CRISTALES,R.; CABALLERO MELLADO,J. Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide. Environmental and geographic distribuition. **Applied. Environmental Microbiology**, v 67,p.2790-2798, 2001.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman and Hall, p.1-42, 1992.

FAO Global Perspectives Unit 2015 (http://www.fao.org/nr/water/cropinfo_sorghum.html)

FAKRUDDIN, M.D & MANNAN, K. S.B. Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. **Ceylon Journal of Science**, v 42, p. 19-33, 2013.

FELESTRINO, E. B.; SANTIAGO, I.F.; FREITAS, L.S.; ROSA, L.H.; RIBEIRO, S.P.; MOREIRA, L.M. Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Langsdorffia hypogaea-Rhizosphere-Host Biological Interface: A Neglected Model of Bacterial Prospection. **Frontiers in** Microbiology, v8, p. 1-15, 2017.

FERNANDES-JÚNIOR, P.I.; PEREIRA, G. M. D.; PERIN, L.; SILVA, L. M.; BARAÚNA, A. C.; ALVES, F. M.; PASSOS, S. R.; ZILLI, J.E. Diazotrophic bacteria isolated from wild rice *Oryza glumaepatula* (Poaceae) in the Brazilian Amazon. **Revista de Biología Tropical**, v, 61, p. 991-999, 2013.

FERNANDES-JÚNIOR, P.I.; AIDAR, S.T.; MORGANTE, C.V.; GAVA, C.A.T.; ZILLI, J.E.; SOUZA, L.S.B.; MARINHO, R.C.N.; NÓBREGA, R.S.A.; BRASIL, M.S.; SEIDO, S.L.; MARTINS, L.M.V. The resurrection plant Tripogon spicatus (Poaceae) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v 39, p.993-1002, 2015.

FERRANDO, L & SCAVINO, A. F. Strong shift in the diazotrophic endophytic bacterial community inhabiting rice (Oryza sativa) plants after flooding. **FEMS Microbiology Ecology**, v91, p.1-12, 2015.

FISHER, M. M.; TRIPLETT, E. W. Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p. 4630–4636, 1999.

FROEHLICH, D.M. & FEHR, W. R. Agronomic performance of soybeans with differing levels of iron deficiency chlorosis on calcareous soil. **Crop Science**, v. 21, p. 438–441, 1981.

GUPTA, G.; PANWAR, J.; JHA, P. N. Natural occurrence of Pseudomonas aeruginosa, a dominant cultivable diazotrophic endophytic bacterium colonizing Pennisetum glaucum (L.) R. Br. **Applied Soil** Ecology, v 64, p. 252–261,2013.

HADIFAR, S.; MOGHIM, S.; FAZELI, H.; SAFAEI, H. G.; HAVAEI, S. A.; FARID, F.; ESFAHANI, B.N. Molecular typing of Iranian mycobacteria isolates by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis of 360bp *rpoB* gene **Advanced Biomedical Research,** 4: 152, 2015.

HAHN, L.; SÁ, E. L. S.; FILHO, B. D. O.; MACHADO, R.G.; DAMASCENO, R. G.; GIONGO, A. Rhizobial Inoculation, Alone or Coinoculated with *Azospirillum brasilense*, Promotes Growth of Wetland Rice. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v40, p. 1-15, 2016.

HAIYAMBO, D. H.; CHIMWAMUROMBE, P. M.; REINHOLD-HUREK, B. Isolation and Screening of Rhizosphere Bacteria from Grasses in East Kavango Region of Namibia for Plant Growth Promoting Characteristics. **Current Microbiology**, v71 p.566–571, 2015.

HATFIELD, J. L.; PRUEGER, J.H. Temperature extremes: Effect on plant growth and development.**Weatherand Climate Extremes**,v 10, p 4–10, 2015.

HUNGRIA, M. & ARAUJO, R. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 542p.,1994.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A. Importância do sistema de semeadura na população microbiana do solo. **Comunicado Técnico/Embrapa-Soja**, Londrina, Paraná, v 56, p.1-9, 1997.

HUNGRIA, M.; SOUZA E. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v 331, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA,M. Inoculação com Azospirillum brasilense: inovação em rendimento a baixo custo. Documentos / Embrapa Soja Londrina. 36p., 2011.

IIJIMA, M.; AWALA,S. K.; WATANABE, Y.; KAWATO,Y.; FUJIOKA,Y.; YAMANE, K.; WADA,K. C. Mixed cropping has the potential to enhance flood tolerance of drought-adapted grain crops. **Journal of Plant Physiology,** v 192, p.21-25, 2016.

JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant Soil**, v 356, p. 1–3, 2012.

JHA, P & KUMAR, A. Characterization of Novel Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium Achromobacter xylosoxidans from Wheat Plant. **Microbial Ecology**, v58 p.179-188, 2009

JI, S.H.; GURURANIB, M.; CHUNA, S. Isolation and characterization of plant growth promoting endophyticdiazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, v 169, p. 83– 98, 2014.

JONES, D. L.; HINSINGER, P. The rhizosphere: complex by design. **Plant and Soil**, v 312, p.1-6, 2008.

KÄMPFER, P. MCINROY, J.A.; DOIJAD, S.; CHAKRABORTYC, T.; GLAESER, S.P. Kosakonia pseudosacchari sp. nov., an endophyte of Zea mays. Systematic and **Applied Microbiology**, v 39, p. 1–7 , 2016.

KAVAMURA, V.N.; SANTOS, S.N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; ÁVILA, L.A.; VISCONT, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v 168, p. 183–191, 2013.

KHAMNA, S.; YOKOTA, A.; PEBERDY, J.F.; LUMYONG, S. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. **EurAsian Journal of BioSciences**, v 4, p. 23-32, 2010.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; AHEMAD, M.; OVES, M.; WANI, P.A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. **Arch Agron Soil Sci**, v 56, p. 73-98, 2010.

KIPE-NOLT, J. A.; AVALAKKI, U. K.; DART, P. J. Root exudation of sorghum and utilization of exudates by nitrogen-fixing bactéria. **Soil Biology & Biochemistry**, v 17,p. 859-863,1985.

KUMAR, V.; KAYASTH, M.; CHAUDHARY,V.; GERA, R. Diversity of diazotrophs in arid and semi-arid regions of Haryana and evaluation of their plant growth promoting potential on Bt-cotton and pearl millet. **Annals of Microbiology,** v 64, p.1301–1313, 2014.

LEE, K.E.; RADHAKRISHNAN, R.; KANG, S.M.; YOU, Y.H.; JOO, G.J.; LEE, I.J.; KO, J.H.; KIM, J.H. Enterococcus faecium LKE12 Cell-Free Extract Accelerates Host Plant Growth via Gibberellin and Indole-3-Acetic Acid Secretion. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v 25, p.1467-1475, 2015.

LI,X.; ZHANG,D.; CHEN, F.; MA, J.; DONG, Y.; ZHANG, L. Klebsiella singaporensis sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v 54, pg. 2131–2136, 2004.

LIU, X.; LI, X.; LI,Y.; LI, R.; XI, Z. Plant growth promotion properties of bacterial strains isolated from the rhizosphere of the Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) adapted to salt-alkaline soils and their effect on wheat growth. **Canadian Journal of Microbiology***,* p.1-29, 2016*.*

MACKAY, R.L.; RICHARDSON, A. E.; CONDRON, L.M.; TURNER, B.L.; HAYGARTH, P.M. Recovering Phosphorus from Soil: A Root Solution?. **Environmental Science & Technology**, v 46, p.1977-1978, 2012.

MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 250-258, 2010.

MANO, Y.; NEMOTO, K. The Pathway of Auxin Biosynthesis in Plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, pg. 2853–2872, 2012.

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**, v65, pg. 1057-1067, 2015.

MAROPOLA, M. K. A.; RAMOND, J.; TRINDADE, M. Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in Sorghum bicolor (L. Moench). **Journal of Microbiological Methods**, v 112 , p.104–117, 2015.

MCARTHUR, J. V.;KOVACIC, D. A.; SMITH, M. H. Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradiente. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v 85, p. 9621-9624, 1988.

MENG, X.; BERTANI,I.; ABBRUSCATO, P.; PIFFANELLI, P.; LICASTRO, D.; WANG, C.; VENTURIA, V. Draft Genome Sequence of Rice Endophyte-Associated Isolate *Kosakonia oryzae* KO348. **Genome Announcements**, v3, doi:10.1128/genomeA.00594-15, 2015.

MONTEIRO, J. M.; SOUZA, J. S.N.; NETO, E. M.F. L.; SCOPEL, K.; TRINDADE, E. F. Does total tannin content explain the use value of spontaneous medicinal plants from the Brazilian semi-arid region? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 24, p.116-123, 2014.

MONTEIRO, E.R.; MANGOLIN, C. A.; NEVES, A. F.; ORASMO, G. R.; SILVA, J. G. M.; MACHADO, M.F. P. S. Genetic diversity and structure of populations in Pilosocereus gounellei (F.A.C.Weber ex K.Schum.) (Cactaceae) in the Caatinga biome as revealed by heterologous microsatellite primers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v 58, p. 7-12, 2015.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NOBREGA, R.S. A.; CARVALHO,F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, p. 74-99, 2010.
NASCIMENTO, C. E.S.; TABARELLI, M.; SILVA, C. A. D.; LEAL, I. R.; TAVARES, W. S.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C.The introduced tree Prosopis juliflora is a serious threat to native species of the Brazilian Caatinga vegetation . **Science of the Total Environment**, v 481, p.108–113, 2014.

NASH, D.M.; HAYGARTH, P. M.; TURNER, B. L.CONDRON,L.M.; MCDOWELL, R.W.; RICHARDSON, A.E.; WATKINS, M.; HEAVEN, M.W. Using organic phosphorus to sustain pasture productivity: A perspective. **Geoderma**, v 221–222, p.11–19, 2014.

NAVEED, M.; QURESHI, M. A.; ZAHIR, Z. A.; HUSSAIN, M.B.; SESSITSCH, A.; MITTER, B. L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **Annals of Microbiology**, v 65, p.1381–1389, 2015.

NUNES, A. T.; LUCENA, R.F.P.; SANTOS, M. V. F.; ALBUQUERQUE, U. P. Local knowledge about fodder plants in the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, p. 11-12, 2015.

OLIVEIRA, C. Alves. Estimativas de fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar por δ 15N. Dissertação de mestrado, Campinas SP, INSTITUTO AGRONÔMICO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL, 80fls, 2012.

OLIVEIRA, S. M.; TOLEDO, A.J.; OLIVEIRA, J. C. A.; DIDONET, C. C. G. M.; NAVES, P.L. F.Produção de Ácido Indol-3-Acético (Aia) por bactérias da Família Rhizobiaceae Isoladas de nódulos das raízes de plantas de arroz sequeiro**. 55° CBQ Congresso Brasileiro de química**, 2015.

OUYANG, L.; PEI, H.; XU, Z. Low nitrogen stress stimulating the indole-3-acetic acid biosynthesis of Serratia sp. ZM is vital for the survival of the bacterium and its plant growth-promoting characteristic. **Archives Microbiology**. DOI 10.1007/s00203-016-1312-7, 2016.

PANDAY, D.; Schumann, P.; DAS, S. K. Rhizobium pusense sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (Cicer arietinum L.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v 61, p. 2632–2639, 2011.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.

PRAKAMHANG, J.; MINAMISAWA, K.; TEAMTAISONG, K.; BOONKERD, N.; TEAUMROONG, N. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (Oryza sativa L.). **Applied Soil Ecology**,v 42, p.141–149, 2009.

PISA, G.; MAGNANI,G.S.; WEBER,H.; SOUZA,E.M.; FAORO,H.; MONTEIRO, R.A.; DAROS,E.; BAURA, V.; BESPALHOK,J.P.; PEDROSA, F.O.; CRUZ, L.M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v 44, p.1215-1221, 2011.

POLY, F. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nif*H genes in communities of nitrogen fixers in soil.**Research in Microbiology**, v152, p.95-103, 2001.

PURI, A.; PADDA, K. P.; CHANWAY, C. P. Can a diazotrophic endophyte originally isolated from lodgepole pine colonize an agricultural crop (corn) and promote its growth? **Soil Biology & Biochemistry**,v 89, p. 210 - 216, 2015.

QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A. M. Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semi-árido Brasileiro. **Ministério da Ciência e Tecnologia.Brasília**, 2005.

RAMEGOWDA,V.; SENTHIL-KUMAR, M.The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. **Journal of Plant Physiology**, v176, p.47–54, 2015.

RAMESH, A.; SHARMA, S. K.; SHARMA, M. P.; YADAV, N.; JOSHI, O.P. Plant Growth-Promoting Traits in Enterobacter cloacae subsp. dissolvens MDSR9 Isolated from Soybean Rhizosphere and its Impact on Growth and Nutrition of Soybean and Wheat Upon Inoculation. **Agricultural Research**, v3, p. 53-66, 2014.

RAMOND, J.; TSHABUSE, F.; BOPDA, C. W.; COWAN, D. A.; TUFFIN, M. I. Evidence of variability in the structure and recruitment of rhizospheric and endophytic bacterial communities associated with arable sweet sorghum (Sorghum bicolor (L) Moench). **Plant Soil**, 2013.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E.The Natural History of Nitrogen Fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v 21, p.541–554. 2004.

REIS JUNIOR, FB.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Identificação de *Azospirillum amazonense* associadas à *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitohormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v 28, p.103-113, 2004

REIS, V. M.; TEIXEIRA K.R.S. Fixação Biológica de Nitrogênio- O Estado da arte Cap 6 In, AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. Processos biológicos no sistema solo-planta-Ferramentas para uma agricultura sustentável. **Embrapa informação tecnológica**, 2005.

REIS, V.M. Uso de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio como Inoculante para aplicação em gramíneas. **Embrapa Agrobiologia:** documento 232, 2007.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA J. R.; V. A. & VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopal**. v 12, p. 16-16, 1986.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **Federation of European Microbiological Societies**, v 278, p.1-9, 2007.

SALAMONE, I. E.G.; FUNES, J. M.; SALVOA, L. P. D.; ESCOBAR-ORTEGA, J.S.F. D.A.; FERRANDO,L.; SCAVINO, A.F. Inoculation of paddy rice with Azospirillum brasilense and Pseudomonas fluorescens: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. **Applied Soil Ecology**, v 61, p.196-204, 2012.

SANTOS, M. V. F.; LIRA, M. A.; DUBEUX JUNIOR, J. C. B.; GUIM, A.; MELLO, A. C. L.; CUNHA, M. V. Potential of Caatinga forage plants in ruminant feeding. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p. 204-215**,** 2010.

SANTOS, J.C.; LEAL, I.R.; ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; FERNANDES, G.W.; TABARELLI, M. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**,v 4, p.276–286. 2011.

SARATHAMBAL, C.; ILAMURUGU, K.; BALACHANDAR, D.; CHINNADURAI, C.; YOGITA, G. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic isolates from the rhizosphere of semi-arid tropical grasses of India. **Applied Soil Ecology**,v 87, p.1-10, 2015.

SAWANA, A.; ADEOLU, RADHEY, M.; GUPTA, S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus Burkholderia: proposal for division of this genus into the emended genus Burkholderia containing pathogenic organisms and a new genus Paraburkholderia gen.nov.harboring environmental species. **Frontiers in Genetics Evolutionary and Genomic Microbiology**,v 5, p.1-22, 2014.

SARWAR & KREMER, Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v 20, p. 282-285, 1994.

SASHIDHAR, B.; PODILE, A.R. Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. **Journal of Applied Microbiology**, v 109, p.1-12, 2010.

SCHALK, I.J.; HANNAUER, M.; BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. **Environmental Microbiology**, v 13, p. 2844-2854, 2011.

SHAO, J.; LI, S.; ZHANG, N.; CUI, X.; ZHOU, X.; ZHANG, G.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. **Microbial Cell Factories**, v 4, p.14-130, 2015.

SHARMA, S; B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M.H.; GOBI, T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, p. 2-14, 2013.

SHARMA, S.; KULKARNI, J.; JHA, B. Halotolerant Rhizobacteria Promote Growth and Enhance Salinity Tolerance in Peanut. **Frontiers in Microbiology**, v 7, n. 1600, 2016.

SHARMA, S & SINGH, D.K. Temporal Variations in Diazotrophic Communities and nifH Transcripts Level Across the Agricultural and Fallow Land at Jaipur, Rajasthan, India. **Indian Journal of Microbiology**, v 57, p. 92–99, 2017.

SHIVHARE, R.; LATA, C. Selection of suitable reference genes for assessing gene expression in pearl millet under different abiotic stresses and their Combinations .**Scientific Reports**, p.1-12, 2016.

SHRIVASTAVA, P.; KUMAR, R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v 22, p. 123-131, 2014.

SILVA, M.C.P.; FIGUEIREDO, A.F.; ANDREOTE, F.D.; CARDOSO, E.J.B.N. Plant growth promoting bacteria in Brachiaria brizantha. **World Journal Microbiology and Biotechnolgy**, v 29, p. 163-171, 2013.(a)

SILVA, M.C. P.; SCHLOTER-HAI, B.; SCHLOTER, M.; ELSAS, J.D.V.; SALLES, J.F. Temporal Dynamics of Abundance and Composition of Nitrogen-Fixing Communities across Agricultural Soils. **Plos one**, v8, pg.1-15, 2013.(b)

SILVA, J. G. S.; PAULA, L. A.M.; ESMERALDO, G. G.; MONTE, F. C. D. Impactos da seca nas unidades produtivas familiares assentadas. **RDE - Revista de Desenvolvimento Econômico**, v 30, p. 35-45, 2014.

SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: **Instituto Agronômico**, 2007.

SIMPSON, R. J.; OBERSON, A.; CULVENOR, R. A.; RYAN, M. H.; VENEKLAAS, E.J.; LAMBERS, H. & LYNCH, J.P.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; SMITH, F. A.; SMITH, S.E.; HARVEY, P. R.; RICHARDSON, A. E. Strategies and agronomic interventions to improve the phosphorus-use efficiency of farming systems. **Plant Soil**, v 349, p.89-120, 2011.

SOUSSI, A.; FERJANI, R.; MARASCO, R.; GUESMI, A.; CHERIF, H.; ROLLI, E.; MAPELLI, F.; OUZARI, H. I.; DAFFONCHIO, D.; CHERIF, A. Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential. **Plant Soil**, p.1-14, 2015.

SCHWYN, B & NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v160, p. 45-56, 1987.

SUGAWARA, S.; MASHIGUCHI, K.; TANAKA, K.; HISHIYAMA, S.; SAKAI, T.; HANADA, K.; KINOSHITATSUJIMURA, K.; YU, H.; DAI, X.; TAKEBAYASHI, Y.; TAKEDA-KAMIYA, N.; KAKIMOTO, T.; KAWAIDE, H.; NATSUME, M.; ESTELLE, M.; ZHAO, Y.; HAYASHI, K. I.; KAMIYA, Y.; KASAHARA, H. Distinct Characteristics of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in Plants. **Plant Cell Physiol**, p.1-14, 2015.

SUTKA, M. R.; MANZURA, M. E.; VITALI, V. A.; MICHELETTO, S.; AMODEO, G.Evidence for the involvement of hydraulic root or shoot adjustments as mechanisms underlying water deficit tolerance in two Sorghum bicolor genotypes. **Journal of Plant Physiology**, v 192, p. 13–20, 2016.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A. & PEREIRA, R.M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v 12, p. 15-22, 1982.

STUTTER, M.I.; SHAND, C. A.; GEORGE, T.S.; BLACKWELL, M. S. A.; BOL, R.;TARDIN,F.D.; RODRIGUES,J.A.S. Cultivo de Sorgo. **Embrapa Milho e Sorgo Sistemas de Produção**, v 4. 2008.

SZKOP, M.; BIELAWSKI, W. A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Antonie van Leeuwenhoek**, v 103, p. 683–69, 2013.

TARDIN, F. D.; RODRIGUES, J. A. S. Cultivares. **Cultivo do sorgo**.4. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008.

TRABELSI, D.; MHAMDI, R. Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. **BioMed Research International**, v 2013, p.1-11, 2013.

ULLAH, A.; MUSHTAQ, H.; ALI, H.; MUNIS, M. F. H.; JAVED, M.T.; CHAUDHARY, H. J. Diazotrophs-assisted phytoremediation of heavy metals: a novel approach. **Environmental Science and Pollution Research**, V 22, p. 2505-2514, 2015.

VADEZ, V.; HASH, T.; BIDINGER, F. R.; KHOLOVA, J. Phenotyping pearl millet for adaptation to drought. **Frontiers in Physioly**, v 3, nº 386, p.1-12, 2012.

VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; PERGALIS, P.; KEFALOGIANNI, I.; CHATZIPAVLIDIS, I.; KATINAKIS, P. The Genetic Diversity of Culturable Nitrogen-Fixing Bacteria in the Rhizosphere of Wheat. **Microbial Ecology**, v 61, p. 277–285, 2011.

VIDEIRA, S.S.; ARAUJO, J.L.S; BALDANI, V.L.D. Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. **Seropédica Embrapa Agrobiologia**, v1, 74 pgs, 2007.

WANG, W.; QIU,Z.; TAN, H.; CAO, L. Siderophore production by actinobacteria **Biometals**,v 27, p. 623–631, 2014.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study.**Journal of Bacteriology**, v 173, p. 697-703, 1991.

YADAV, R, S.; SEHGAL, D.; VADEZ,V. Using genetic mapping and genomics approaches in understanding and improving drought tolerance in pearl millet. **Journal of Experimental Botany**, v 62, nº 2, p. 397–408, 2010.

YAN, N.; MARSCHNER, P.; CAO, W.; ZUO, C.; QINA,W. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. **International Soiland Water Conservation Research**, v3, p. 316–323, 2015.

YOON, S. H., HA, S. M., KWON, S., LIM, J., KIM, Y., SEO, H.;CHUN, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, 2017.

ZHANG, X.; GAO, Ju-Sheng.; CAO, Y.; SHEIRDIL, R. A.; WANG, X.; ZHANG, L. Rhizobium oryzicola sp. nov., potential plantgrowth-promoting endophytic bacteria isolated from rice roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary**

Microbiology, v 65, p. 2931–2936, 2015.

ZHAO, F.; QIN, Y.; ZHENG, X.; ZHAO, H.; CHAI, D.; LI, W.; PU, M.; ZUO, X.; QIAN, W.; NI, P.; ZHANG, Y.; MEI, H.; HE, S. Biogeography and Adaptive evolution of *Streptomyces* Strains from saline environments. **Scientific Reports**, p.1-9, 2016.