

**OCORRÊNCIA DE BATERIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS A RAÍZES E  
COLMOS DE CULTIVARES DE SORGO**

**Dissertação de Mestrado**

**Clarissa Bergamaschi**

**Porto Alegre  
2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS A RAÍZES E  
COLMOS DE CULTIVARES DE SORGO**

CLARISSA BERGAMASCHI

Bióloga (PUCRS)

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Mestre  
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Área de concentração: Microbiologia  
Agrícola

Porto Alegre (RS), Brasil

Fevereiro de 2006

## Folha de Homologação

Dedico aos meus pais, Homero e Ivanilde,  
meus maiores exemplos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Flávio Camargo pela orientação, confiança e ensinamentos.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos professores Fátima Bento, Pedro Selbach e Enilson Sá por todo auxílio e colaboração.

A todos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Ao colega Luiz Fernando Roesch por todos ensinamentos, orientação, dedicação e paciência.

À Patrícia Quadros pela colaboração constante no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e do Departamento de Solos, em especial: Rodrigo Jackes, Kelly Silva, Daniele da Conceição, Alessandro Padilha, Aline Teixeira, Analu Mantovani, Leandro Bortolon, Maurizio Quadro, Regilene Souza e Márcio Frizzo e ao Sr. Valdir pela amizade, companheirismo e colaboração em diversas etapas do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus amigos pela amizade e incentivo, em especial à Cíntia Poletto, Juliana Torres, Viviane Bogdanov, Karina Aronovich e Clarissa Shostack.

Ao Diego Cognato, meu colega de profissão, meu amor, agradeço pelo carinho, paciência e todo auxílio prestado.

À minha querida irmã Cecília e ao Rodrigo que, mesmo estando tão longe, sempre estiveram presentes e, através de mensagens tão carinhosas, sempre me apoiaram e incentivaram.

À minha mãe Ivanilde, minha amiga, companheira, que compartilhou todos os momentos de tensão.

Ao meu pai Homero, meu maior mestre, por todos os ensinamentos, carinho e dedicação e pelo seu incondicional incentivo à pesquisa.

# OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS A RAÍZES E COLMOS DE CULTIVARES DE SORGO<sup>1</sup>

Autora: Clarissa Bergamaschi

Orientador: Prof. Flávio A. de Oliveira Camargo

## Resumo

Os danos ao ambiente, bem como os custos econômicos relacionados à adubação nitrogenada têm estimulado a busca por alternativas que possam diminuir a utilização deste fertilizante sem que haja diminuição na produtividade. Uma das possibilidades é a utilização de bactérias diazotróficas que podem se associar a plantas de sorgo para fixar nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) e/ou produzir substâncias promotoras de crescimento de plantas (PCPs). Outra possibilidade é a seleção de genótipos eficientes na associação com bactérias diazotróficas, já que a eficiência na associação depende de características específicas das plantas. Deste modo, o presente estudo objetivou avaliar a ocorrência e a localização de bactérias diazotróficas associadas ao sorgo, selecionar cultivares eficientes na associação com bactérias diazotróficas, bem como identificar os isolados mais eficientes em fixar nitrogênio e produzir PCPs. A atividade experimental foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa foram utilizados 14 cultivares de sorgo forrageiro em vasos e, na segunda, seis cultivares de sorgo granífero em campo. A seleção dos cultivares de sorgo foi baseada na eficiência de absorção de nitrogênio, através da quantificação de matéria seca e do teor de nitrogênio total da parte aérea das plantas. Para o isolamento das bactérias diazotróficas foi utilizado meio de enriquecimento semi-sólido. Após, quantificou-se a produção de PCPs e os níveis de N<sub>2</sub> fixados pelos isolados, a fim de selecionar os mais eficientes. A matéria seca e o teor de N no tecido dos cultivares avaliados foram influenciados pela adubação nitrogenada. A presença de bactérias diazotróficas foi constatada em todos os cultivares de sorgo avaliados. Através da análise de similaridade, verificou-se que, em ambos experimentos, foram formados quatro grupos de isolados, sendo que três se agruparam com 100% de similaridade com as estirpes padrões *Burkholderia tropica* Ppe8 (ATCC BAA-831), *Herbaspirillum seropedicae* Z67 (ATCC 35892) e *Azospirillum. brasilense* Sp7 (ATCC 29145). A distribuição das bactérias isoladas em ambos experimentos foi influenciada pelo genótipo da planta. Além do genótipo, a localização das bactérias isoladas das plantas de sorgo granífero foi influenciada pela adubação nitrogenada, sendo que as raízes foram o sítio preferencial de colonização das bactérias nestes cultivares. Todos os isolados foram aptos em fixar nitrogênio e produzir ácido indol-acético *in vitro*.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Agrícola, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (71 p.) Fevereiro, 2006.

## OCCURRENCE OF DIAZOTROPHS BACTERIAS ASSOCIATED WITH ROOTS AND STEMS OF SORGHUM CULTIVARS<sup>2</sup>

Author: Clarissa Bergamaschi

Adviser: Flávio A. de Oliveira Camargo

### Abstract

Environmental problems and economic cost related to the use of nitrogen fertilisers in agriculture have been stimulating the study of alternatives in order to reduce the use of this fertiliser without decreasing crop productivity. One of the possibilities is the use of diazotrophic bacteria that can associate to sorghum plants to fix atmospheric nitrogen (N<sub>2</sub>) and produce plant growth promoters (PGPs). Other possibility is the selection of genotypes efficiently associated with diazotrophic bacteria, since the efficiency can vary according to the plant genotype. The present study aimed to evaluate the occurrence and the distribution of diazotrophic bacteria associated with sorghum plants, to select efficient sorghum cultivars in the association with diazotrophic bacteria, as well as to identify isolates more efficient to fix nitrogen and produce PGPs. Two experiments were carried out. In the first experiment, 14 forage sorghum cultivars were cropped in vases and, on the second, six grain sorghum cultivars were cropped in the field. The selection of sorghum cultivars was based in the efficiency of nitrogen absorption, through the quantification of the mass dry weight and of the total nitrogen content into the aerial part of the plants, and the efficiency of association with diazotrophic bacteria. Semi-solid enrichment medium was used for the isolation of the diazotrophic bacteria. The isolates were evaluated by the production of PGPs and by the atmospheric nitrogen fixation, in order to select the most efficient isolate. Yield of mass dry weight and of total nitrogen content were affected for the synthetic nitrogen addition. The presence of diazotrophic bacteria was verified in all cultivars of sorghum evaluated. Through the similarity analysis, it was verified that, in both experiments, four isolated groups were formed, and three grouped with 100% of similarity with the culture collection strains of *B. tropica* Ppe8 (ATCC BAA-831), *H. seropedicae* Z67 (ATCC 35892) and *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145). The distribution of the isolated bacteria in both experiments was affected by the genotype of the plant. Besides the genotype, the distribution of the diazotrophic bacteria into the grain sorghum plants was affected by the synthetic nitrogen, and the roots were the preferential site for bacterial colonization. All the isolates were able to fix atmospheric nitrogen and to produce PGPs *in vitro*.

---

<sup>2</sup>Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (71 p.) February, 2006.



## SUMÁRIO

	Páginas
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>04</b>
2.1 Ocorrência de bactérias diazotróficas.....	04
2.2 Importância das bactérias diazotróficas para as gramíneas.....	09
2.3 Fixação biológica do nitrogênio em plantas de sorgo.....	10
2.4 Produção de promotores de crescimento de plantas .....	11
2.5 Efeito do genótipo das plantas sobre a população de bactérias diazotróficas .....	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1 Seleção de cultivares de sorgo forrageiro.....	15
3.2 Seleção de cultivares de sorgo granífero.....	17
3.3 Quantificação da matéria seca e determinação do conteúdo do nitrogênio total dos tecidos das plantas.....	19
3.4 Isolamento das bactérias diazotróficas.....	19
3.5 Seleção de bactérias diazotróficas.....	20
3.5.1 Quantificação do nitrogênio fixado pelos isolados.....	21
3.5.2 Quantificação de ácido indol-acético.....	22
3.6 Determinação do índice de diversidade.....	22
3.7 Análises estatísticas.....	23
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
4.1 Seleção de cultivares de sorgo forrageiro.....	24
4.1.1 Efeito da adubação nitrogenada sobre os cultivares de sorgo forrageiro.....	24
4.1.2 Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas aos cultivares de sorgo forrageiro.....	27
4.1.3 Efeito de genótipos de sorgo forrageiro sobre a diversidade das bactérias diazotróficas.....	31
4.2 Seleção de cultivares de sorgo granífero.....	34

4.2.1 Efeito da adubação nitrogenada sobre os cultivares de sorgo granífero.....	35
4.2.2 Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas aos cultivares de sorgo granífero.....	37
4.2.3 Efeito de genótipos de sorgo granífero sobre a diversidade de bactérias diazotróficas.....	40
4.2.4 Relação entre adubação nitrogenada e distribuição de bactérias diazotróficas em cultivares de sorgo granífero.....	42
4.3 Seleção de bactérias diazotróficas.....	45
4.3.1 Quantificação do nitrogênio fixado pelas bactérias diazotróficas....	45
4.3.2 Produção ácido índole-acético.....	50
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
<b>7. APÊNDICES.....</b>	<b>65</b>
7.1 Apêndice 1: Condições meteorológicas no período experimental e comparação ao clima regional.....	65
7.2 Apêndice 2: Meios de cultura e soluções utilizadas.....	67
<b>8. VITA.....</b>	<b>71</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Cultivar, tipo e ciclo de desenvolvimento dos cultivares de sorgo forrageiro avaliados no experimento em vasos.....	17
Tabela 2. Cultivar, tipo e ciclo de desenvolvimento dos cultivares de sorgo granífero avaliadas no experimento em campo.....	18
Tabela 3. Matéria seca da parte aérea dos cultivares de sorgo forrageiro avaliados aos 53 dias após a emergência.....	25
Tabela 4. Nitrogênio total no tecido da parte aérea das plantas de sorgo forrageiro avaliadas aos 53 dias após a emergência.....	26
Tabela 5. Índice de diversidade entre comunidades isoladas dos cultivares de sorgo forrageiro do tratamento sem nitrogênio.....	33
Tabela 6. Matéria seca na parte aérea dos cultivares de sorgo granífero aos 67 dias após a emergência.....	35
Tabela 7. Nitrogênio total na parte aérea das plantas de sorgo granífero avaliados aos 67 dias após a emergência.....	36
Tabela 8. Índice de diversidade de bactérias diazotróficas totais isoladas de plantas de sorgo granífero, com e sem adubação nitrogenada.....	41
Tabela 9. N total fixado e produção de AIA das bactérias isoladas das raízes dos cultivares de sorgo forrageiro.....	48
Tabela 10. N total fixado e produção de AIA das bactérias isoladas dos cultivares de sorgo granífero.....	54

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Fenograma de similaridade entre as bactérias isoladas dos cultivares de sorgo forrageiro.....	29
Figura 2. Bactérias diazotróficas presentes nos diferentes cultivares de sorgo forrageiro.....	32
Figura 3. Fenograma de similaridade entre as bactérias isoladas dos cultivares de sorgo granífero.....	38
Figura 4. Bactérias diazotróficas presentes nos diferentes cultivares de sorgo granífero.....	40
Figura 5. Bactérias diazotróficas presentes nos cultivares de sorgo granífero, com e sem adubação nitrogenada.....	45

## RELAÇÃO DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS

$\text{c mol}_c \text{ L}^{-1}$	centimol de carga por litro
g	grama
$\text{g kg}^{-1}$	grama por kilograma
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
ha	hectare
h	hora
$\text{kg ha}^{-1}$	kilograma por hectare
L	litro
m	metro
mm	milímetro
mg	miligrama
$\text{mg L}^{-1}$	miligrama por litro
mL	mililitro
$\text{mol L}^{-1}$	mol por litro
$\mu\text{g mg}^{-1}$	micrograma por miligrama
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrômetro
$\mu\text{g mL}^{-1}$	micrograma por mililitro
nm	nanômetro
%	percentagem

## 1. INTRODUÇÃO

O sorgo é o quinto cereal mais importante do mundo em termos de alimentação animal e humana, sendo precedido pelo trigo, arroz, milho e cevada. Esta gramínea é, entre as espécies alimentares, uma das mais versáteis e mais eficiente, tanto do ponto de vista fotossintético, como na adaptabilidade que possui em crescer em climas com baixa precipitação pluvial.

O sorgo é uma planta do tipo C<sub>4</sub>, que se caracteriza por possuir uma alta taxa fotossintética, baixa perda de CO<sub>2</sub> na luz (fotorrespiração) e baixo consumo de água por unidade de matéria seca produzida (Ferri, 1985). Esta planta se adapta a condições de deficiência hídrica, desfavoráveis à grande parte dos outros cereais. A maioria dos materiais genéticos de sorgo necessita temperaturas superiores a 21°C para um adequado crescimento e desenvolvimento.

Todo sorgo produzido no Brasil é consumido na alimentação animal, sendo que o maior uso de grãos destina-se à avicultura e suinocultura. Bovinos, eqüinos e pequenos animais são também consumidores de rações à base de grãos de sorgo, mas em menor quantidade. A silagem de sorgo e o pastejo são igualmente utilizados para rebanhos de gado de corte e leiteiro.

No estado do Rio Grande do Sul, no ano agrícola de 2004/05, a área total cultivada com a cultura do sorgo foi de 21,7 mil hectares (2,75% da área nacional). A produção total de grãos foi de 27,8 mil toneladas, com um rendimento médio de 1,3 t ha<sup>-1</sup>. Naquela safra, o Rio Grande do Sul contribuiu com 1,77% da produção nacional de grãos (CONAB, 2006).

No atual sistema de cultivo de sorgo são utilizados até 60 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio em solos com baixo teor de matéria orgânica (CFSRS, 2004), sendo então necessários cerca de 133 kg ha<sup>-1</sup> de uréia. Considerando um preço aproximado de 580 reais a tonelada de uréia, esta adubação representa um gasto de cerca de 170 reais por hectare. Com base nestes valores, estima-se que, em 2004/05, foram gastos em torno de 2,9 mil toneladas de uréia para a cultura do sorgo, já que a área cultivada no Estado foi de 21,7 mil hectares. Portanto, os custos com a adubação nitrogenada nesta última safra, no Rio Grande do Sul, foram de aproximadamente 1,7 milhões de reais.

Além do alto custo, a adubação nitrogenada pode provocar danos ao ambiente, pela poluição de aquíferos e o uso de recursos energéticos não renováveis, com sérias implicações à sustentabilidade do agroecossistema.

Uma das possibilidades para diminuir o consumo de fertilizantes nitrogenados para a cultura de sorgo é a utilização dos recursos biológicos do solo e do potencial genético das plantas. No solo, destaca-se a presença de bactérias diazotróficas, que podem associar-se à cultura do sorgo para fixar nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) e/ou produzir substâncias promotoras de crescimento de plantas (PCPs), otimizando o processo da fixação biológica do nitrogênio (FBN) e que, com isto, diminui os custos com adubação nitrogenada e possibilita o desenvolvimento de uma agricultura menos agressiva ao ambiente.

Desde o relato de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas à cana-de-açúcar por Döbereiner e seus colaboradores, foi demonstrado que tais bactérias possuem um grande potencial em aumentar a biomassa de gramíneas através da redução do N<sub>2</sub> a amônia (NH<sub>3</sub>) e da excreção de PCPs. Contudo, esse potencial depende da interação das bactérias com o genótipo da planta, dos fatores abióticos do meio e da competitividade com os demais microrganismos do local. Portanto, o resultado da interação bactéria-gramínea, em termos de potencialidade agrônômica como fixadoras de N<sub>2</sub> ou como produtores de PCPs, é dependente desse grau de associação.

Para o desenvolvimento de práticas agronomicamente viáveis ao aproveitamento desses microrganismos na cultura de sorgo, torna-se necessário avaliar diferentes genótipos de sorgo, em relação à resposta à adubação nitrogenada e à associação com bactérias diazotróficas específicas. Deste modo, o presente estudo objetivou avaliar a ocorrência e a distribuição de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo, atualmente utilizados no Estado do Rio Grande do Sul, selecionar cultivares mais eficientes na associação com bactérias diazotróficas, assim como identificar isolados mais eficientes em fixar nitrogênio e produzir PCPs.



## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A maioria dos solos brasileiros é considerada de baixa fertilidade natural (Döbereiner, 1997) e, devido a esta deficiência, aplicações de fertilizantes nitrogenados são essenciais para o aumento e manutenção da produção. Porém, a adubação nitrogenada, além de constituir uns dos mais altos custos na agricultura, pode trazer conseqüências indesejadas ao ambiente.

De acordo com diversos pesquisadores citados por Kennedy et al. (2004), a uréia é a forma de fertilizante mais utilizada pelos agricultores. Porém, menos de 50% do fertilizante aplicado é utilizado pelas plantas. Esta baixa eficiência na utilização da uréia pelas plantas é devida, principalmente, à volatilização de  $\text{NH}_3$ , à desnitrificação e também a perdas por lixiviação. A volatilização e a desnitrificação poluem a atmosfera através da emissão de gases, que provocam o aumento do efeito estufa, tais como  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$  e  $\text{NH}_3$ . Além disso, a lixiviação de  $\text{NO}_3$  causa poluição no lençol freático (Kennedy et al., 2004).

Uma das possibilidades para diminuir os custos com a adubação nitrogenada e minimizar os danos ao ambiente é a utilização de bactérias diazotróficas como fonte alternativa de N, através da fixação biológica do nitrogênio (FBN). Esta fonte alternativa de N pode suplementar ou, até mesmo, substituir a utilização de fertilizantes nitrogenados.

### **2.1. Ocorrência de bactérias diazotróficas**

As bactérias diazotróficas são microrganismos capazes de realizar a conversão enzimática do  $\text{N}_2$  a formas acessíveis aos demais eucariotos ( $\text{NH}_3$ , etc.). Segundo Evans & Burris (1992), as bactérias diazotróficas podem ser

classificadas em três grupos: bactérias de vida livre, que fixam o nitrogênio para o seu próprio uso; bactérias associativas, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose; bactérias simbióticas, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e o microsimbionte e, em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

Segundo Baldani et al. (1997), as bactérias diazotróficas associativas são divididas em dois sub-grupos: bactérias endofíticas facultativas e bactérias endofíticas obrigatórias. Os microrganismos endofíticos facultativos são aqueles que podem colonizar tanto a rizosfera como o interior de raízes, enquanto o segundo grupo compreende aqueles que colonizam o interior de raízes e também a parte aérea de plantas não leguminosas.

A capacidade das bactérias endofíticas em colonizar o interior das plantas representa uma vantagem em relação às bactérias de vida livre no que diz respeito à utilização de substratos. Possivelmente, com fontes de carbono mais prontamente disponíveis, os problemas de competição com demais bactérias da rizosfera podem ser reduzidos. Além disso, como estes microrganismos geralmente se encontram no interior de raízes que estão abaixo do solo ou dentro de tecidos densos de plantas, como, por exemplo, vasos do xilema, eles estão provavelmente crescendo em um ambiente com baixas concentrações de oxigênio, que é necessário para a expressão da enzima nitrogenase, enzima que converte  $N_2$  em amônia (Olivares et al., 1997).

A reação de fixação do nitrogênio caracteriza-se pela redução no nitrogênio atmosférico à amônia. Portanto, para que a reação ocorra, é necessário que haja um transporte de elétrons, mediado por moléculas aptas a realizá-lo. A enzima nitrogenase é formada por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibidênio-Ferro-proteína (Mo-Fe-proteína), ambas capazes de transportar elétrons. Durante a reação de redução no nitrogênio atmosférico, a nitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de elétrons, a ferridoxina. A reação de redução ocorre da seguinte maneira: a ferridoxina, na sua

forma reduzida, transfere um elétron para a unidade Fe-proteína da nitrogenase. Esta, uma vez reduzida, doa o elétron recebido para a Mo-Fe-proteína. A Mo-Fe-proteína acumula os elétrons e, após oito transferências, esta unidade terá acumulado oito elétrons e, então fará a redução do nitrogênio atmosférico em amônia. A amônia, em contato com o substrato aquoso do citoplasma das bactérias é convertida rapidamente em íons amônio. O amônio inibe a fixação do nitrogênio, não podendo com isso acumular-se no interior célula bacteriana. Assim, logo depois de ser formado, o íon é transportado para fora da célula. Para as células vegetais o amônio também é prejudicial e, uma vez que este íon atinge o citoplasma das células vegetais, este é assimilado sob a forma de glutamina, através das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase. A glutamina então é utilizada pelas plantas como substrato para síntese de demais aminoácidos (Cardoso et al., 1992).

As bactérias diazotróficas associativas utilizam os exudatos radiculares, secreções e lisados provenientes da planta, como fonte de carbono para fixação de  $N_2$ , sendo que os números populacionais destes microrganismos podem variar de acordo com as condições do ambiente (Bakker et al., 1987; Chanway & Holl, 1994). Além da fixação biológica do nitrogênio (FBN), alguns desses microrganismos também possuem a capacidade de promover o crescimento vegetal, através da solubilização de fosfatos minerais ou outros minerais do solo, produzindo ou alterando a concentração de hormônios vegetais, como o ácido indol-acético, ácido giberélico, citocininas e etileno (Cattelan, 1999).

As principais bactérias diazotróficas capazes de se associar com plantas de sorgo são de ocorrência ampla e variada no ambiente e na planta. Dentre as bactérias que já foram isoladas de plantas de sorgo, destacam-se as bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (Chiarini et al., 1998; Baldani et al., 1986; Bashan et al., 2004).

O gênero *Azospirillum* compreende, atualmente, sete espécies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. dobereineriae* e *A. largomobile*. As bactérias pertencentes a este gênero são

endofíticas facultativas e colonizam tanto o interior, quanto a superfície das raízes de numerosas plantas hospedeiras, tais como milho, trigo, arroz, sorgo e aveia (Bashan et al., 2004).

As bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* são Gram negativas, possuem movimentos em espiral, medem de 0,8 a 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, 2 a 4  $\mu\text{m}$  de comprimento, e possuem grânulos intracelulares de poli-hidroxibutirato. São aeróbias típicas, quando supridas com fonte de nitrogênio combinado e microaerofílicas quando crescem em ambientes livres de  $\text{N}_2$ , ou seja, quando necessitam realizar a FBN. Em meio semi-sólido formam uma película delgada em forma de véu, abaixo da superfície do meio, onde a concentração de oxigênio permite a fixação do nitrogênio para iniciar seu crescimento. À medida que as bactérias vão utilizando o oxigênio do meio de cultura, movimentam-se em direção à superfície, para que a taxa de difusão do oxigênio esteja em equilíbrio com a taxa de respiração das bactérias, promovendo com isso um ambiente microaerófilo (Dobereiner et al., 1995).

Algumas espécies do gênero *Azospirillum* possuem mecanismos específicos de interação com as raízes das plantas hospedeiras e são aptas em colonizar o interior das mesmas, enquanto outras apenas colonizam a camada de mucilagem ou células do córtex das raízes que estão danificadas. Já foi demonstrado, através de desinfestações superficiais das raízes, que algumas espécies deste gênero colonizam o interior de raízes de trigo (Steenhoudt & Vandereyden, 2000).

Sob certas condições ambientais (inclusive de solo) o gênero *Azospirillum* pode influenciar positivamente o crescimento da planta, o teor de nitrogênio e o rendimento de matéria seca da cultura. Este efeito estimulatório exercido por este gênero tem sido atribuído a diversos mecanismos, tais como a FBN e a produção de auxinas. Tem sido observado que, através da inoculação com *Azospirillum*, ocorre alteração morfológica na raiz, como o aumento das raízes laterais e de pêlos radiculares. Estes fatores são atribuídos à produção de auxinas pelas bactérias (Steenhoudt & Vandereyden, 2000).

Outro grupo de bactérias diazotróficas associativas de grande importância pertence ao gênero *Herbaspirillum*. Este gênero já foi isolado de plantas cana-de-açúcar, arroz, milho, sorgo e outros cereais (Kennedy et al., 2004). Ao contrário do gênero *Azospirillum*, que compreende bactérias endofíticas facultativas, bactérias do gênero *Herbaspirillum* são endofíticas obrigatórias e que, por esta razão, apresentam uma distribuição ecológica mais restrita em relação ao gênero *Azospirillum*.

As bactérias do gênero *Herbaspirillum* são Gram negativas, em formato de bastonetes curvos, com 0,6 a 0,7  $\mu\text{m}$  de comprimento e 3 a 5  $\mu\text{m}$  de espessura, móveis e fixadoras de nitrogênio em condições de microaerofilia. Este gênero compreende, atualmente, oito espécies: *H. seropedicae* (Baldani et al., 1986), *H. rubrisubalbicans* (Baldani et al., 1996), *H. frisingense* (Kirchhof et al., 2001), *H. lusitanum* (Valverde et al., 2003), *H. autotrophicum*, *H. huttiense*, *H. putei* (Ding & Yokota, 2004) e *H. chlorophenolicum* (Im et al., 2004). Dentre estas espécies, *H. frisingens*, *H. lusitanum*, *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* são as capazes de fixar  $\text{N}_2$ .

A espécie *H. seropedicae* foi, originalmente, isolada no Brasil a partir de raízes lavadas e desinfestadas superficialmente de plantas de milho, sorgo e arroz por Baldani et al. (1986). Porém, não foram isoladas em solos não cultivados (Baldani et al., 1992).

O gênero *Burkholderia* ocorre naturalmente na rizosfera do sorgo (Chiarini et al., 1997), do milho, em raízes, folhas e colmos de arroz (Baldani, 1996) ou saprofiticamente no solo (Sonthayanon et al., 2002). Esta bactéria Gram negativa tem como principal fonte de carbono o manitol e apresenta crescimento ótimo em meio de cultura semi-sólido com pH entre 4,5 e 5,0.

*Burkholderia* compreende, atualmente, 29 espécies, sendo que muitas pertencem à espécie *B. vietnamiensis*, *B. kururiensis*, *B. tuberum* e *B. phynatum*, que são capazes de fixar  $\text{N}_2$  (Estrada-de los Santos et al., 2001). *B. cepacia* tem sido objeto de grande interesse, devido à sua ampla distribuição em ambientes naturais. É reconhecida por suas habilidades em promover o crescimento de

plantas de milho, em aumentar a produção das culturas e por suprimir muitos patógenos de plantas, assim como degradar diversos pesticidas (Bevivino et al., 1998; Chiarini et al., 1998). Similarmente, *B. vietnamiensis* tem atraído interesse devido à sua habilidade em promover o crescimento de plantas de arroz e por aumentar o rendimento de grãos (Estrada-de los Santos et al., 2001).

## **2.2. Importância das bactérias diazotróficas para as gramíneas**

As bactérias associativas podem contribuir para o aumento do rendimento de diversas culturas, inclusive o sorgo. Sobral (2003) considerou que a promoção do crescimento vegetal por estas bactérias pode ser resultado tanto de ações indiretas quanto diretas. Em relação às ações indiretas, foram citados o controle biológico por competição por nutrientes, a produção de sideróforos, a antibiose e a indução de resistência sistêmica no hospedeiro. Como ações diretas estão a disponibilização de nutrientes às plantas, a FBN e a produção de promotores de crescimento das plantas (PCPs).

O aumento do rendimento de cereais devido à incorporação de nitrogênio atmosférico via FBN já foi comprovado (Döbereiner et al., 1993). Estudos recentes têm evidenciado a FBN em algumas das principais culturas de interesse agrônomo. Através de técnicas, como a diluição do isótopo  $^{15}\text{N}$  e abundância natural de  $^{15}\text{N}$ , têm-se detectado aumento no conteúdo de N através da fixação do  $\text{N}_2$ , demonstrado pela presença do isótopo em baixas concentrações no interior do tecido das plantas (James, 2000).

A habilidade das bactérias diazotróficas em produzir PCPs é considerada como um fator de grande importância para a fertilidade do solo. A maioria dos diazotróficos associados a gramíneas pode sintetizar e excretar PCPs, que são compostos orgânicos que influenciam os processos fisiológicos das plantas em baixas concentrações. Entre os principais PCPs sintetizados pelas bactérias diazotróficas destacam-se as auxinas, que são hormônios responsáveis pelo aumento da área de absorção radicular e pelo desenvolvimento da planta pelo alongamento e proliferação das raízes secundárias. Entre as bactérias

diazotróficas produtoras de PCPs destacam-se *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* e *Azotobacter* spp. (Asghar, 2002).

### 2.3. Fixação biológica do nitrogênio em plantas de sorgo

O uso de bactérias diazotróficas concomitante a fertilizantes nitrogenados pode ser promissor para cultivos de gramíneas. Estudos têm demonstrado que as bactérias diazotróficas associativas podem contribuir com, pelo menos, 20 a 40% da quantidade de N requerida por diversos cereais através da FBN (Döbereiner, 1997).

Pesquisas realizadas demonstraram que a inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de sorgo promove respostas significativas. Tilak et al. (1981) comprovaram que a inoculação das bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense* e *Azotobacter chroococcum* em sementes de milho e sorgo aumentam a produção de grãos. O aumento na produção devido à inoculação de duas espécies de bactérias foi de 16,1% para o milho e de 6,2% para o sorgo, em relação ao tratamento que não recebeu inoculação. O rendimento de grãos foi maior no experimento em que, junto com os microrganismos, foram adicionados 40 kg N ha<sup>-1</sup>.

Stein et al. (1997) inocularam o gênero *Azoarcus* em plantas de sorgo para avaliar a contribuição da FBN da bactéria na planta. Após 28 dias de inoculação *in vitro*, foi utilizado o isótopo <sup>15</sup>N para mensurar o nitrogênio total das plantas. Os resultados indicaram que *Azoarcus* foi apto em colonizar a superfície da raiz e o interior dos tecidos do sorgo. Neste estudo foi observada uma considerável atividade de fixação de nitrogênio, estimada em 10,7% do N na parte aérea e 2% do N na raiz. Olivares & James (1997) comprovaram que *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* são aptos em colonizar os vasos de xilema em folhas de sorgo. Após cinco dias de inoculação, folhas infectadas apresentaram densa colonização de *H. rubrisubalbicans*. Em contraste, *H. seropedicae* só foi localizada nas folhas após 14 dias de inoculação.

Roncato-Maccari et al. (2003) também demonstraram a eficiência do gênero *Herbaspirillum* em colonizar o sorgo. Bactérias foram inoculadas na superfície esterilizada de tecidos de dois cultivares de sorgo: LR15 e IM40. No cultivar LR15 a população de *H. seropedicae* na raiz foi de  $3,3 \times 10^8$  bactérias e no cultivar IM40 ela foi de  $1,3 \times 10^8$  bactérias. Já, na parte aérea, o tamanho da população foi menor, sendo que no cultivar LR15 foi de  $4,8 \times 10^5$  bactérias e no cultivar IM40 ela foi de  $4,3 \times 10^5$  bactérias. Sarig et al. (1988) relataram que plantas de sorgo inoculadas com *Azospirillum* tiveram uma melhor adaptação em ambientes com déficit hídrico, comparadas a outras gramíneas. Esta vantagem se deve ao tamanho acentuado das folhas e à alta quantidade de água encontrada nas plantas de sorgo.

#### **2.4. Produção de promotores de crescimento de plantas**

A maioria das bactérias diazotróficas associadas a gramíneas pode produzir fitormônios, chamados comumente de promotores de crescimento das plantas (PCPs). Estes compostos orgânicos são responsáveis pelo aumento da área de absorção radicular e pelo desenvolvimento da planta. Entre as bactérias produtoras de PCPs destacam-se *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Xantomonas*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Serratia* (Asghar et al., 2002, Bástian et al., 1998; Khalid et al., 2003).

Estudos já demonstraram que a inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas aumentou o crescimento e produção de diversas culturas (Khalid et al., 2003). Estudos também demonstram que a habilidade de algumas bactérias em produzir PCPs pode ser altamente específica a certas espécies de plantas, ou até mesmo de cultivares (Nowak, 1998).

Chiarini et al. (1997) testaram a estirpe PHP7 de *Burkholderia cepacia* quanto à habilidade de colonizar raízes e de promover crescimento de plantas de sorgo. Foram realizados testes com a cultura pura da bactéria, com a presença da estirpe BB23/TD4 de *Enterobacter* sp. e com a estirpe A23/T3C de *Pseudomonas*



*fluorescens*. Para avaliar a persistência das três estirpes na rizosfera as populações de bactérias foram estimadas após 60 dias de crescimento das plantas. Neste trabalho pôde-se concluir que todas as estirpes foram aptas em colonizar a raiz do sorgo e, além disso, as plantas inoculadas apresentaram maior rendimento de matéria seca, comparadas a plantas não inoculadas.

Diversos estudos verificaram que a bactéria *Azospirillum* estimula o desenvolvimento das plantas através da produção de PCPs. Dentre os PCPs produzidos, o ácido indol-acético (AIA) e o ácido giberélico podem ser os principais fatores (Bashan et al., 2004). Gadagi et al. (2004) consideraram que a inoculação com *Azospirillum* pode promover significantes mudanças em vários parâmetros de crescimento da planta, incluindo o aumento de biomassa da planta, absorção de nutrientes, teor de N nos tecidos, altura da planta, tamanho da folha e comprimento e área da raiz de diversas gramíneas. Porém, alguns fatores que afetam o tamanho da população, tais como as características do solo, interações entre as comunidades bacterianas do local, o estágio de crescimento da planta e também do tamanho do inoculo, podem influenciar indiretamente a produção de PCPs.

Em outro trabalho testando a eficiência de *Azospirillum*, El-Khawas & Adachi (1999) verificaram que *A. brasilense* produziu grandes quantidades de AIA em meios de cultura suplementados com triptofano, o precursor do AIA. A adição do filtrado esterilizado do sobrenadante do meio de cultura em raízes de arroz fez aumentar a área da raiz, os pêlos radiculares e o rendimento de matéria seca comparada com raízes que não foram suplementadas com o sobrenadante.

## **2.5. Efeito do genótipo das plantas sobre a população de bactérias diazotróficas**

De um modo geral, tem-se observado que as bactérias diazotróficas associadas a gramíneas conseguem se ajustar a um ambiente específico, heterogêneo e variável como a rizosfera. Este ajuste é dependente da habilidade competitiva dos microrganismos na rizosfera, do tipo e número dos demais

organismos presentes no local, bem como a qualidade e quantidade de exudatos liberados pelas raízes e resíduos vegetais disponíveis que servirão como fonte de carbono e energia para as bactérias diazotróficas. Além disso, fatores abióticos do meio também influenciam na sobrevivência e atividade dos microrganismos tais como, temperatura, pH, umidade e concentração de oxigênio do local (Kipe-Nolt et al., 1985).

Estudos demonstraram que o genótipo da planta pode influenciar o tamanho e a composição da comunidade microbiana através dos exudatos liberados pelas raízes, que exerce um papel chave no estímulo seletivo dos microrganismos (Grayston et al., 1997). A atividade metabólica dos microrganismos presentes na rizosfera é mantida em alto nível devido à contínua liberação dos exudatos radiculares. Por outro lado, os microrganismos estimulam a quantidade e influenciam a composição destes exudatos (Chiarini et al., 1997). Lemanceau et al. (1995) também demonstraram que populações de *Pseudomonas* de diferentes espécies de plantas e de solos não cultivados diferiram na habilidade de utilizar diferentes compostos orgânicos, sugerindo que as plantas selecionam populações específicas de *Pseudomonas*. Também tem sido observado que diferentes cultivares de uma mesma espécie de plantas podem selecionar populações específicas de bactérias. Em outro estudo, Boddey et al. (1991) verificaram que uma mesma bactéria pode ter diferentes graus de atividades da nitrogenase, quando inoculada em diferentes genótipos de sorgo, demonstrando que há uma estreita associação entre planta e bactéria.

Fatores abióticos do meio, como clima e solo, também podem ser relevantes na associação entre as plantas e bactérias diazotróficas. O resultado da interação diazotrófico-gramínea, em termos de potencialidade agrônômica, como fixadores de nitrogênio atmosférico ou como promotores de crescimento, depende desse grau de especificidade. Reis Junior et al. (2000) consideraram que a oscilação no número de bactérias de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associadas a plantas de cana-de-açúcar, em diferentes períodos de coleta, foi devido a variações dos fatores ambientais, principalmente da chuva.

Outro fator ambiental que pode influenciar a interação diazotrófico-gramínea é a presença de nitrogênio mineral no ambiente. Sabe-se que a nitrogenase é inibida na presença de formas combinadas de N, como nitrato e amônia. Portanto, é provável que as bactérias diazotróficas não tenham um adequado rendimento em solos onde haja altos níveis de fertilizantes adicionados ao solo, como geralmente acontece em sistemas de agricultura intensiva (Dobbelaere et al., 2003). Utilizando a técnica da redução do acetileno, Kolb & Martin (1988) relataram que a adição de N mineral em vasos contendo a gramínea *Arrhenatherum elatius* fez diminuir a atividade da enzima nitrogenase das bactérias presentes. Além disso, o fertilizante também causou um significativo decréscimo no número de bactérias, no qual foi verificado através da técnica do Número Mais Provável (NMP).

Kirchhof et al. (1997) verificaram que a adubação nitrogenada causou efeito negativo sobre a população de bactérias diazotróficas presentes em *Pennisetum purpureum*, *Miscanthus sinensis*, *M. sacchariflorus* e *Spartina pectinata*. Em um outro estudo, Muthukumarasamy et al. (1999) verificaram que a adubação nitrogenada também causou efeito negativo sobre as bactérias diazotróficas *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Os autores consideraram que este não é um efeito negativo direto. Sugerem que este efeito é devido a alterações no estado fisiológico da planta causada pelo fertilizante nitrogenado e que, com isso, influencia a associação dos microrganismos com as plantas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A atividade experimental foi realizada em duas etapas: na primeira, foram semeados, em vasos, 14 cultivares de sorgo forrageiro atualmente recomendados para o cultivo no Estado do Rio Grande do Sul (FEPAGRO, 1998). O delineamento experimental foi totalmente casualizado, com três repetições e dois tratamentos: com adubação nitrogenada e sem adubação nitrogenada.

A segunda etapa foi conduzida em campo. Foram semeados seis cultivares de sorgo granífero, com e sem adubação nitrogenada. O experimento foi inteiramente casualizado e com três repetições.

As condições térmicas e pluviométricas, para ambos experimentos, assim como as normais climatológicas regionais são apresentadas no Apêndice 1.

#### 3.1. Seleção de cultivares de sorgo forrageiro

O primeiro experimento foi conduzido em vasos, ao ar livre, localizado na área experimental do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da UFRGS. O período experimental se estendeu de 17 de setembro (semeadura) a 15 de novembro de 2004 (colheita).

Os vasos foram preenchidos com solo proveniente do horizonte superficial de um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico arênico (Embrapa, 1999) que continha as seguintes características: pH (H<sub>2</sub>O) 5,0; 130 g kg<sup>-1</sup> de argila; 5 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica; 2,9 mg L<sup>-1</sup> de fósforo trocável; 19 mg L<sup>-1</sup> de potássio trocável; 0,2 cmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup> de alumínio trocável; 0,5 cmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup> de cálcio trocável; 0,3 cmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup> de magnésio trocável; 1,6 cmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup> de alumínio + hidrogênio; 2,4 cmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup> de capacidade de troca de cátions e 35% de saturação de bases. O solo foi seco

ao ar e acondicionado em vasos de plástico com 3 L de capacidade e com drenos.

A adubação foi baseada na análise química do solo e na Recomendação de Adubação e Calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CFRSRS/SC, 2004). Foram aplicados  $86,4 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$  e  $194,4 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{O}$  por vaso na forma de solução nutritiva de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , correspondendo a  $48 \text{ kg ha}^{-1}$  de fósforo e  $108 \text{ kg ha}^{-1}$  de potássio. Para o tratamento com nitrogênio, a adubação foi parcelada em três épocas. Foram aplicados 40, 76 e 76 mg de N por vaso no momento da semeadura, aos 7 e aos 21 dias após a emergência das plantas, respectivamente. O nitrogênio foi aplicado sob a forma de solução nutritiva ( $288 \text{ mg L}^{-1}$  de uréia) correspondendo a um total de  $130 \text{ kg ha}^{-1}$  de nitrogênio, o dobro da dose recomendada a fim de verificar a influência do nitrogênio sobre as bactérias diazotróficas.

Foram semeadas 10 sementes de cada cultivar (Tabela 1) por vaso e seis dias após a emergência foi realizado o desbaste, mantendo-se duas plantas por vaso. A umidade do solo foi mantida constante, por meio de pesagem diária dos vasos em 80% da capacidade de campo.

A colheita foi realizada aos 53 dias após a emergência, período em que as plantas sem adubação nitrogenada apresentaram sintomas de deficiência de nitrogênio. A matéria vegetal seca da parte aérea dos cultivares de sorgo foi pesada e analisada quanto ao teor de nitrogênio total. As raízes dos cultivares sem nitrogênio foram separadas da parte aérea, para posterior análise microbiológica.

A seleção dos cultivares de sorgo foi baseada na eficiência de absorção de nitrogênio através da quantificação do peso da matéria seca e do teor de nitrogênio total presente na parte aérea das plantas analisadas.

A eficiência de absorção de nitrogênio foi calculada pela razão entre a diferença nos teores médios de N das plantas com e sem adubação nitrogenada e a quantidade de N mineral aplicado nas que receberam este nutriente.

Tabela 1. Cultivar, instituição, tipo e ciclo de desenvolvimento dos cultivares de sorgo forrageiro avaliados no experimento em vasos.

<b>Cultivar</b>	<b>Instituição</b>	<b>Tipo</b>	<b>Ciclo (emergência ao florescimento)</b>
1 F 305	Dow Agrosiences	Híbrido simples	70-85 dias
Fepagro RS 12	Fepagro	Polinização aberta	70-85 dias
Fepagro RS 17	Fepagro	Polinização aberta	70-85 dias
Fepagro RS 18	Fepagro	Polinização aberta	70-85 dias
Fepagro 19	Fepagro	Polinização aberta	70-85 dias
Past 49 C	Fepagro	Polinização aberta	70-85 dias
Past 76	Fepagro	Polinização aberta	70-85 dias
Past 10	Fepagro	Polinização aberta	70-85 dias
BR 610	Embrapa	Híbrido simples	65-75 dias
BR 506	Embrapa	Híbrido simples	65-75 dias
Fepagro RS 11	Fepagro	Polinização aberta	70-85 dias
BRS 800	Embrapa	Híbrido simples	65-75 dias
BR 601	Embrapa	Híbrido simples	65-75 dias
855 F	Pioneer	Híbrido simples	65-75 dias

### 3.2. Seleção de cultivares de sorgo granífero

O experimento com sorgo granífero foi conduzido no campo, instalado na Estação Experimental Agronômica (EEA) da UFRGS em Eldorado do Sul, RS, em um Argissolo-Vermelho distrófico típico (Embrapa, 1999). O período experimental se estendeu de 18 de janeiro (semeadura) a 9 de abril do ano de 2005 (colheita). A análise físico-química do solo apresentou as seguintes características: pH em água de 5,2, 340 g kg<sup>-1</sup> de argila, 2,7 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica, 3,7 mg L<sup>-1</sup> de fósforo trocável, 140 mg L<sup>-1</sup> de potássio trocável, 0,3 cmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup> de alumínio trocável, 2,7 cmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup> de cálcio trocável, 1,5 cmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup> de magnésio trocável, 3,9 cmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup> de alumínio + hidrogênio, 8,4 cmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup> de capacidade de troca de cátion e 54% de saturação de bases.

A adubação foi realizada de acordo com o resultado da análise físico-química do solo e a Recomendação de Adubação e Calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CFRSRS/SC, 2004). Foram aplicados 127 kg ha<sup>-1</sup> de superfosfato triplo (41% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 12-14% Ca) e 106 kg ha<sup>-1</sup> de cloreto de potássio (60% de K<sub>2</sub>O) em toda a área. Nas parcelas que receberam adubação nitrogenada foram adicionados 90 kg ha<sup>-1</sup> de N. A adubação nitrogenada foi

fracionada em três doses equivalentes, sendo a primeira na semeadura e as demais a 30 e 60 dias após a emergência das plantas. Foram utilizadas duas doses de nitrogênio: 0 e 90 kg ha<sup>-1</sup> de N.

Foram semeados seis cultivares de sorgo granífero (Tabela 2), manualmente, em seis linhas de uma parcela de 2 m x 2 m e, 30 dias após a emergência, foi realizado o desbaste, mantendo-se uma densidade final de aproximadamente 60.000 plantas por hectare (o equivalente a seis plantas por metro de linha). O experimento foi irrigado por aspersão, em intervalos aproximados de três dias, com doses de rega variando entre 20 e 30 mm.

Tabela 2. Cultivar, tipo e ciclo de desenvolvimento dos cultivares de sorgo granífero avaliados no experimento de campo.

<b>Cultivar</b>	<b>Instituição</b>	<b>Tipo</b>	<b>Ciclo</b>
AG 2005	Agroceres	Híbrido simples	Médio
AG 1018	Agroceres	Híbrido simples	Precoce
Pioneer 8419	Pioneer	Híbrido simples	Precoce
DKB Ambar	Dekalb	Híbrido simples	Médio
DKB 57	Dekalb	Híbrido simples	Tardio
Pioneer 8118	Pioneer	Híbrido simples	Médio

Aos 90 dias após a semeadura, amostras de raízes (duas plantas por parcela) foram coletadas para posteriores análises microbiológicas. Também foram coletadas amostras da parte aérea das plantas (duas plantas por parcela) para a determinação do rendimento de matéria seca e quantificação do teor de nitrogênio total no tecido. O experimento foi delineado em um esquema do tipo fatorial 6 (cultivar) x 2 (com e sem adubação nitrogenada), inteiramente casualizado, com três repetições.

Neste experimento, a seleção dos cultivares de sorgo foi baseada na eficiência de absorção de nitrogênio, bem como pela quantificação do peso da matéria seca e do conteúdo de nitrogênio total presente na parte aérea das plantas analisadas.

A eficiência de absorção de nitrogênio foi calculada pela razão entre a diferença nos teores médios de N das plantas com e sem adubação nitrogenada e

a quantidade de N mineral aplicado nas parcelas que receberam este nutriente. O número de plantas e a quantidade de N aplicado foram transformados em valores equivalentes a um hectare.

### **3.3 Quantificação da matéria seca e determinação do conteúdo de nitrogênio total dos tecidos das plantas**

A parte aérea das plantas foi seca em estufa a 65-70°C, com circulação forçada de ar, sem lavagem do material, até atingir peso constante. Após, as amostras foram pesadas em balança com sensibilidade de 0,001g para a quantificação do peso da matéria seca. O tecido seco da parte aérea foi moído em moinho com peneira de 0,5 mm de diâmetro e 0,200g do material foi utilizado para determinação do teor de nitrogênio a partir da digestão sulfúrica, de acordo com a metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

### **3.4. Isolamento das bactérias diazotróficas**

O isolamento das bactérias diazotróficas do experimento com sorgo forrageiro foi realizado a partir de amostras das raízes dos cultivares sem nitrogênio e objetivou verificar a ocorrência das bactérias pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e à espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* nos 14 cultivares de sorgo analisados.

Com relação ao experimento com sorgo granífero, o isolamento das bactérias foi realizado a partir de amostras de raízes e colmos dos tratamentos com e sem nitrogênio. O procedimento teve como objetivo verificar a ocorrência das bactérias diazotróficas *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* nos seis cultivares de sorgo analisados, assim como verificar a influência da adubação nitrogenada sobre a presença de bactérias diazotróficas.

O isolamento das bactérias diazotróficas foi realizado segundo Döbereiner et al. (1995). As amostras do colmo foram lavadas superficialmente com água corrente e metade das amostras de raízes foi lavada em água corrente e o restante foi submetido à desinfestação superficial com solução de cloramina-T



a 1% por 5 minutos, para o isolamento de bactérias endofíticas. Foram pesados 10g de raízes e 10g de colmo de cada parcela e trituradas em 90 mL de solução salina (Apêndice 2). Em seguida, foram feitas diluições seriadas das amostras de  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ . Foi inoculada uma alíquota de 300  $\mu$ L das diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  em quatro diferentes meios semi-sólidos de enriquecimento (três frascos por diluição): JMV, NFb, JNFb e LGI-P, desenvolvidos inicialmente para o isolamento de *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, respectivamente. (Apêndice 2).

Os meios de cultura foram incubados a 28°C até a formação de película característica (aproximadamente sete dias). As películas formadas nos frascos com crescimento positivo, na maior diluição de cada um dos quatro meios, foram transferidas para um novo meio semi-sólido até que outra película fosse formada. Após a formação de película característica, parte dela foi transferida para placas, através da técnica de esgotamento, contendo meio sólido de enriquecimento para cada microrganismo a ser isolado, acrescido de 20 mg de extrato de levedura. As placas foram incubadas a 28°C até a formação de colônias isoladas. Para a purificação, as colônias formadas no meio sólido foram novamente transferidas para meios de cultura semi-sólidos e, após a formação de película, transferidas para placas de Petri contendo o meio Agar-Batata ou Agar Batata-P (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) (Baldani & Döbereiner, 1980). Uma vez isoladas as colônias, estas foram armazenadas em microtubos contendo uma mistura de leite em pó+glicerol (Apêndice 2) e congeladas a -18°C.

### **3.5. Seleção de bactérias diazotróficas**

Os isolados bacterianos obtidos em ambos experimentos foram avaliados quanto à capacidade de fixação biológica do nitrogênio e à produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas. As análises foram realizadas em laboratório, com três repetições para cada isolado bacteriano obtido.

Para a identificação do provável gênero bacteriano, uma matriz binária foi construída a partir de características morfológicas das colônias dos isolados. As colônias foram analisadas quanto à forma, bordos, coloração e textura.

Adicionalmente, foi avaliada a capacidade de produção de ácido/base dos isolados em condições de fixação de nitrogênio (Döbereiner et al., 1995). Os isolados foram comparados através do grau de similaridade estimado pelo coeficiente de Jaccard ( $S_j$ ) com as estirpes padrão *Burkholderia tropica* Ppe8 (ATCC BAA-831), *Herbaspirillum seropedicae* Z67 (ATCC 35892), *Azospirillum brasilense* Sp7 (ATCC 29145) e com as bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum amazonense* através das características morfológicas das colônias segundo Döbereiner et al. (1995). Os isolados foram agrupados pelo método UPGMA (*average linkage clustering*) e representados graficamente por um fenograma obtido pelo programa NTSYS-pc, versão 1.8 (Slice et al., 1994).

### 3.5.1. Quantificação do nitrogênio fixado pelos isolados

A quantificação do nitrogênio total fixado pelos isolados foi baseada na metodologia descrita por Fernandes et al. (2001). Uma alíquota de 70  $\mu\text{L}$  da mistura de leite+glicerol foi inoculada em um tubo contendo 5 mL de caldo nutritivo Dygs (Apêndice 2) e incubada sob agitação de 190 rpm por 24 h. Após a incubação, o número de células foi padronizado em espectrofotômetro a uma densidade ótica de 0,2 com um comprimento de onda de 600 nm. Uma vez padronizadas as amostras, uma alíquota de 600  $\mu\text{L}$  foi transferida para um meio de cultura semi-sólido (três repetições) e incubada em estufa à 28°C por 72 h. Como controle, foi utilizado o meio de cultura semi-sólido esterilizado não inoculado, para a verificação do nitrogênio proveniente do meio de cultura. Após o período de incubação, alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram tomadas para a quantificação de proteínas, segundo metodologia de Bradford (1976). Como padrão para comparação entre os isolados, foi utilizada a estirpe *Azospirillum brasilense* Sp7 (ATCC 29145). O nitrogênio total (biomassa microbiana e N excretado) foi quantificado após digestão sulfúrica e destilação com NaOH 10 mol  $\text{L}^{-1}$  (Tedesco et al., 1995).

### 3.5.2. Quantificação de ácido indol-acético

A produção de ácido indol-acético foi analisada segundo metodologia adotada por Asghar et al. (2002). Uma alíquota de 70  $\mu\text{L}$  da mistura do leite+glicerol foi inoculada em um tubo contendo 5 mL de caldo nutritivo Dygs e incubada sob agitação de 190 rpm por 24 h. Após a incubação, o número de células foi padronizado em espectrofotômetro a uma densidade de 0,3 a um comprimento de onda de 600 nm. Erlenmeyers contendo 25 mL de caldo nutritivo Dygs foram inoculados com 600  $\mu\text{L}$  das culturas. Os meios foram incubados sob agitação de 190 rpm à 30°C, por 72 h. Foi utilizado como padrão a estirpe *Azospirillum brasilense* Sp7 (ATCC 29145). Para a quantificação da produção de fitormônios, o conteúdo dos tubos foi centrifugado a 10000 rpm por 15 min. e, em seguida, 3 mL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo contendo 2 mL do reagente de Salkowski (2 mL de  $\text{FeCl}_3$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  + 98 mL de  $\text{HClO}_4$  35 %). Após 30 minutos, a intensidade da cor foi mensurada em espectrofotômetro a 550 nm. A curva padrão continha o caldo nutritivo esterilizado e quantidades conhecidas de ácido indol-acético (AIA). A quantidade de AIA produzida pelos isolados foi calculada através equação da reta ( $y = 0,0188x + 0,0003$ ) e os limites de detecção foram 1,0 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA.

Foram tomadas alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  de cada amostra para a quantificação de proteínas, segundo metodologia de Bradford (1976), descrita por Hungria & Araújo (1994).

### 3.6. Determinação do índice de diversidade

A diversidade entre gêneros dos isolados obtidos dos experimentos com sorgo forrageiro e granífero foi calculada através de índices de diversidade, segundo Pinto-Coelho (2000). O índice de Simpson foi calculado pela seguinte função:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^s (p_i)^2$$

onde D é o índice de diversidade de Simpson; S é o número de gêneros e  $p_i$  é a abundância relativa do i-ésimo gênero.

O índice de diversidade de Shannon-Weaver foi calculado utilizando-se a seguinte função:

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

onde H é o índice de Shannon-Weaver e  $p_i$  é a proporção da amostra contendo indivíduos do mesmo gênero i.

A equitabilidade foi calculada da seguinte forma:

$$E = H / \log S$$

onde H é o índice de Shannon-Weaver e S é o número de gêneros.

### **3.7. Análises estatísticas**

Os dados de rendimento de matéria seca, o teor de N total das plantas, produção de auxina e N total fixado pelos isolados foram avaliados por meio do software estatístico SISVAR versão 4.6 (Ferreira, 2003), efetuando-se a análise de variância e o teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 5%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Seleção de cultivares de sorgo forrageiro

A seleção de cultivares de sorgo forrageiro foi baseada no rendimento de matéria seca e no acúmulo de nitrogênio no tecido, em resposta à adubação nitrogenada.

#### 4.1.1 Efeito da adubação nitrogenada sobre os cultivares de sorgo forrageiro

Foram determinados o rendimento de matéria seca e o teor de nitrogênio nos tecidos das plantas com o objetivo de verificar a resposta dos cultivares de sorgo forrageiro à adubação nitrogenada.

O rendimento de matéria seca e o teor de nitrogênio total dos cultivares de sorgo aumentaram com a adubação nitrogenada (Tabelas 3 e 4). Quanto ao rendimento de matéria seca pelos cultivares de sorgo, os maiores valores foram observados nos cultivares BR 610 (8,54 g planta<sup>-1</sup>), 1 F 305 (8,49 g planta<sup>-1</sup>), BRS 800 (7,72 g planta<sup>-1</sup>) e Fepagro 19 (7,45 g planta<sup>-1</sup>), quando foram aplicados o equivalente a 130 kg ha<sup>-1</sup> de N. Os acréscimos de rendimento de matéria seca devido à adubação nitrogenada variaram de 3,32 g planta<sup>-1</sup> no cultivar 855 F a 7,62 g planta<sup>-1</sup> no cultivar BR 610.

Quanto ao nitrogênio total no tecido das plantas, observou-se que os cultivares BRS 800 (55,08 mg N planta<sup>-1</sup>), 1 F 305 (54,18 mg N planta<sup>-1</sup>), BR 610 (53,67 mg N planta<sup>-1</sup>), Fepagro 19 (52,44 mg N planta<sup>-1</sup>) e 855 F (51,62 mg N planta<sup>-1</sup>) foram os que apresentaram os maiores teores com aplicação de

nitrogênio, enquanto Fepagro RS 12 (33,57 mg N planta<sup>-1</sup>) apresentou o menor teor no mesmo tratamento (Tabela 4). Para todos os cultivares foi observado menor teor de N total no tratamento em que não foi aplicado nitrogênio, comparado ao tratamento que recebeu adubação nitrogenada.

Tabela 3. Matéria seca da parte aérea dos cultivares de sorgo forrageiro avaliados aos 53 dias após a emergência. Porto Alegre, 2004.

Cultivar	Adubação nitrogenada (kg ha <sup>-1</sup> )	
	0	130
	-----g planta <sup>-1</sup> -----	
1 F 305	1,08 A b	8,49 A a
Fepagro RS 12	0,98 A b	5,73 B a
Fepagro RS 17	0,70 A b	6,93 B a
Fepagro RS 18	0,97 A b	6,79 B a
Fepagro 19	0,83 A b	7,45 A a
Past 49 C	1,12 A b	6,97 B a
Past 76	0,66 A b	5,99 B a
Past 10	0,92 A b	6,00 B a
BR 610	0,92 A b	8,54 A a
BR 506	1,07 A b	6,47 B a
Fepagro RS 11	1,00 A b	6,05 B a
BRS 800	1,00 A b	7,72 A a
BR 601	0,82 A b	6,31 B a
855 F	1,07 A b	4,39 B a
CV (%)	19,56	11,27

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre cultivares e médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente entre tratamentos pelo Teste de Scott-Knott a 5%.

Os menores valores foram observados nos cultivares Fepagro RS 17 (4,16 mg N planta<sup>-1</sup>), Fepagro 19 (4,25 mg N planta<sup>-1</sup>), 855 F (4,32 mg N planta<sup>-1</sup>), Fepagro RS 12 (4,51 mg N planta<sup>-1</sup>), 1 F 305 (4,51 mg N planta<sup>-1</sup>), BRS 800 (4,56 mg N planta<sup>-1</sup>) e BR 601 (4,82 mg N planta<sup>-1</sup>). Os acréscimos no teor de nitrogênio total devido à aplicação de nitrogênio variaram de 29,06 mg N planta<sup>-1</sup> no cultivar Fepagro RS 12 a 50,52 mg N planta<sup>-1</sup> no cultivar BRS 800.

A eficiência relativa de absorção de nitrogênio variou entre os cultivares testados (Tabela 4). O genótipo que apresentou maior eficiência foi o BRS 800

(25,9%), demonstrando ser o mais responsivo à aplicação de nitrogênio. O cultivar Fepagro RS 12 apresentou a menor eficiência relativa de absorção de nitrogênio (14,19%), sendo o menos responsivo à adubação nitrogenada entre os genótipos testados. A variabilidade na eficiência relativa de absorção de nitrogênio pode ser atribuída a diferenças genéticas dos cultivares (Fernandes et al., 1991). Cultivando sorgo em solução nutritiva, França (1983), citado por Fernandes et al. (1991) verificou diferença entre genótipos de sorgo quanto ao rendimento de matéria seca, absorção, distribuição e utilização do nitrogênio.

Tabela 4. Nitrogênio total no tecido da parte aérea das plantas de sorgo forrageiro avaliadas aos 53 dias após a emergência. Porto Alegre, 2004.

Cultivar	Adubação nitrogenada (kg N ha <sup>-1</sup> )		Eficiência relativa de absorção de N
	0	130	
	-----mg N planta <sup>-1</sup> -----		%
1 F 305	4,51 B b	54,18 A a	25,87
Fepagro RS 12	4,51 B b	33,57 C a	14,19
Fepagro RS 17	4,16 B b	48,34 B a	22,66
Fepagro RS 18	5,40 A b	50,49 B a	23,12
Fepagro 19	4,25 B b	52,44 A a	24,71
Past 49 C	5,76 A b	50,18 B a	22,78
Past 76	5,51 A b	46,24 B a	20,88
Past 10	5,18 A b	47,08 B a	21,48
BR 610	5,27 A b	53,67 A a	24,81
BR 506	5,54 A b	46,15 B a	21,06
Fepagro RS 11	5,64 A b	47,39 B a	21,41
BRS 800	4,56 B b	55,08 A a	25,90
BR 601	4,82 B b	49,22 B a	22,76
855 F	4,32 B b	51,62 A a	24,25
CV (%)	9,91	5,86	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre cultivares e médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente entre tratamentos pelo Teste de Scott-Knott a 5%.

De modo geral, porém, entre os genótipos testados não ficou clara uma diferenciação entre híbridos e cultivares de polinização aberta quanto à sua resposta à eficiência relativa de absorção de nitrogênio. Também não houve

predomínio de genótipos de uma ou de outra instituição de origem nos grupos que se destacaram por maior ou menor eficiência de absorção de N.

Alguns autores sugerem que a baixa resposta de algumas plantas à adubação nitrogenada pode ser relacionada à associação com bactérias diazotróficas, que lhes fornecem nitrogênio através da fixação biológica. Estudando a fixação biológica em cana-de-açúcar, Boddey et al. (2003) atribuíram a ocorrência de elevadas produções sob baixa disponibilidade de N no solo à fixação biológica de N por bactérias diazotróficas. Após nove anos de pesquisa, Oliveira et al. (1995) observaram que a quantidade de N acumulado no solo sob cultivo com cana-de-açúcar foi maior que a quantidade inicial de N, também atribuindo este acréscimo de N à fixação biológica.

A baixa resposta à adubação nitrogenada do cultivar Fepagro RS 12 sugere, a princípio, uma eficiente associação com bactérias diazotróficas. A pequena resposta deste cultivar se expressa numa baixa eficiência relativa de absorção de N, que poderia ser atribuída à fixação biológica do nitrogênio. Por outro lado, as análises de tecido das plantas evidenciaram que este cultivar apresentou baixo teor de N no tratamento que não recebeu adubação nitrogenada. Na hipótese de haver uma eficiente associação com bactérias, seria esperado um alto teor de N no tecido das plantas não adubadas, uma vez que parte do suprimento de N poderia ser proveniente da FBN. Isto ocorreu com o cultivar Past 76, que também apresentou baixa resposta à adubação nitrogenada e alto teor de N no tecido das plantas do tratamento sem nitrogênio. Assim sendo, a baixa eficiência relativa de absorção de N aliada a um alto teor de N no tecido das plantas do cultivar Past 76 pode ser indicativo de uma eficiente associação com bactérias diazotróficas.

#### **4.1.2 Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas aos cultivares de sorgo forrageiro**

Foi realizado o isolamento das bactérias diazotróficas a partir das raízes dos 14 cultivares de sorgo forrageiro com o objetivo de avaliar a ocorrência e diversidade das bactérias nos cultivares analisados.



A formação de película nos meios de cultura semi-sólidos de enriquecimento, a caracterização morfológica das colônias em dois diferentes meios de cultura (de enriquecimento e enriquecido) e a quantificação do N<sub>2</sub> fixado permitiram verificar a presença de bactérias diazotróficas associadas aos 14 cultivares de sorgo forrageiro.

Foram isoladas 76 bactérias de três diferentes meios de enriquecimento: NFb, JNFb e JMV. Uma matriz binária foi elaborada a partir de características das colônias dos isolados, tais como forma, bordos, coloração, textura e mudança de pH, em dois diferentes meios de cultura. A partir destas características verificou-se a formação de dois grupos principais (Figura 1). O agrupamento localizado na parte superior do fenograma reuniu isolados com as estirpes padrão pertencentes ao grupo das betaproteobactérias, com exceção da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* que é uma alfa-proteobactéria. O grupo localizado na parte inferior uniu os isolados com estirpes padrão pertencentes ao grupo das alfa-proteobactérias. Destes dois grupos principais formaram-se subgrupos, sendo que três destes apresentaram 100% de similaridade com as estirpes padrão testadas.

Num dos subgrupos, 11 isolados apresentaram 100% de similaridade com a estirpe padrão *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145). Foi verificado que tais bactérias alcalinizaram o meio de cultura, continham colônias brancas, secas e com bordas rugosas em meio de cultura NFb sólido, e colônias branco-amareladas, secas, rugosas e de coloração rosada após uma semana de incubação em meio Batata. Estas características foram as mesmas encontradas quando se verificou a morfologia das colônias da estirpe *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145) nos meios NFb e Batata.

Outros 26 isolados agruparam-se com 100% de similaridade com a estirpe padrão *H. seropedicae* Z67 (ATCC 35892). Os isolados alcalinizaram o meio de cultura, continham colônias úmidas, com bordas lisas, coloração inicialmente branca e azul após uma semana de incubação em meio de cultura

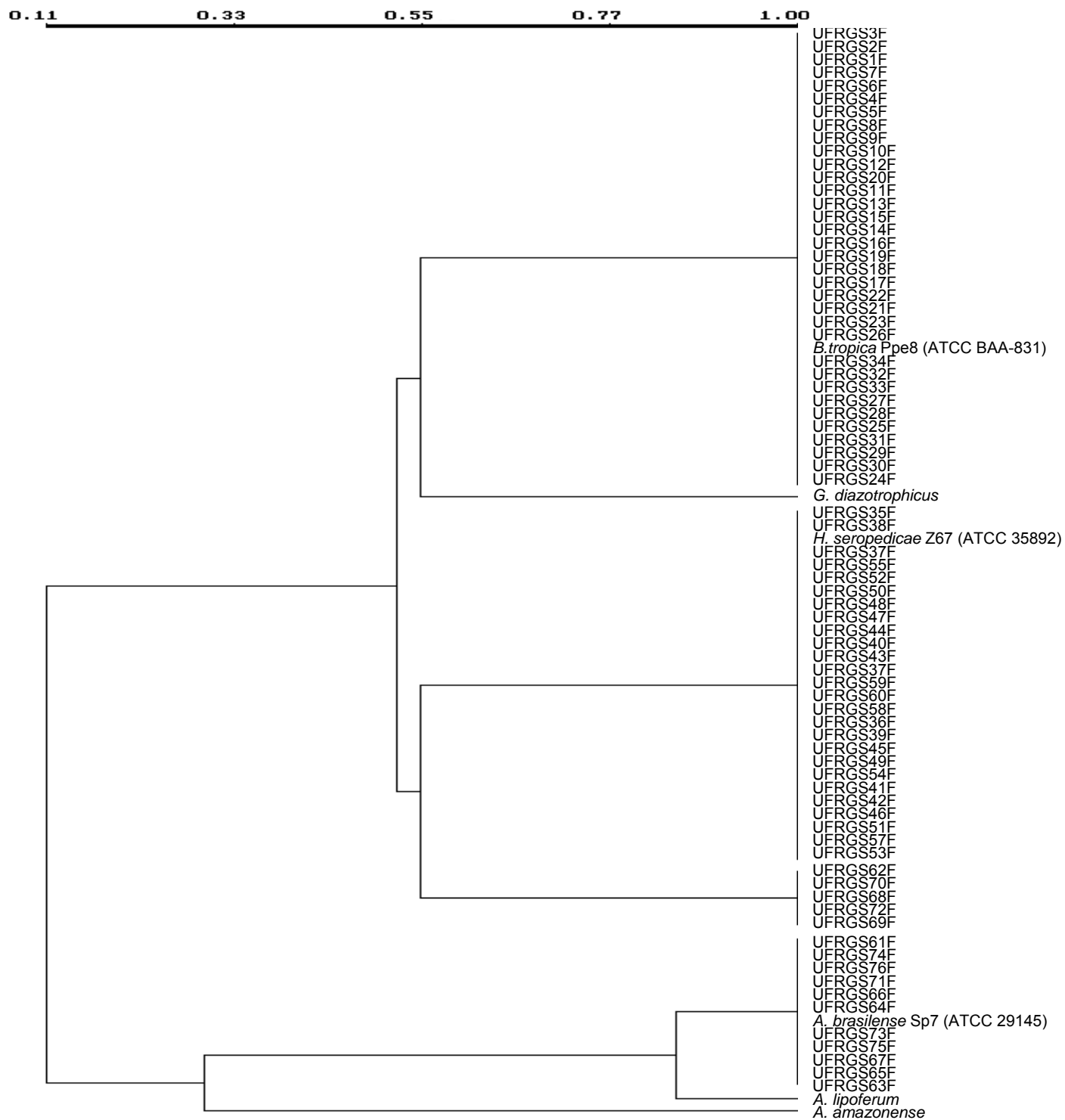


Figura 1. Fenograma de similaridade entre as bactérias isoladas dos cultivares de sorgo forrageiro. Porto Alegre, 2004.

NFb. Em meio Batata as colônias se apresentavam úmidas, com bordas lisas e coloração bege. Estas características foram as mesmas encontradas quando se verificou a morfologia das colônias da estirpe *H. seropedicae* Z67 (ATCC 3589) nos meios JNFb e Batata.

Um grupo formado por 34 isolados, que não modificou o pH do meio, continha colônias de coloração amarela com centro laranja, úmidas e lisas em meio JMV e colônias de coloração beges, úmidas e lisas em meio de cultura Batata. Estas características foram as mesmas encontradas quando se verificou a morfologia das colônias da estirpe *B. tropica* Ppe8 (ATCC BAA-831).nos meios JMV e Batata e tais isolados se agruparam com 100% de similaridade com esta estirpe padrão.

Um quarto conjunto de bactérias, isoladas a partir do meio NFb, se caracterizou por alcalinizar o meio, com colônias verdes, com bordas lisas e úmidas em meio de cultura NFb, e colônias amarelas, úmidas e com bordas lisas em meio Batata. Estes isolados apresentaram níveis de similaridade superiores a 50% à estirpe padrão *H. seropedicae* Z67 (ATCC 35892). Pode-se sugerir que tais isolados pertencem a organismos com características próprias pertencentes ao grupo das betaproteobactérias.

A falta de especificidade do meio NFb já havia sido comprovada por Magalhães & Döbereiner (1984). Os autores consideraram que, além das espécies de *Azospirillum*, que são favorecidas no meio NFb, outros microrganismos diazotróficos também podem crescer neste meio. Segundo Yanni et al. (1997), a comunidade de bactérias diazotróficas cultiváveis é extremamente variada e somente poucas bactérias já foram identificadas e caracterizadas.

Não foram isoladas bactérias do meio LGI-P (que propicia o desenvolvimento de bactérias pertencentes à espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus*), mesmo tendo ocorrido formação de película no meio semi-sólido LGI-P. A ocorrência de bactérias da espécie *G. diazotrophicus* é bastante restrita e está associada, principalmente, a plantas ricas em açúcar, tais como cana-de-açúcar, batata doce e capim Cameroon (Döbereiner et al., 1995).

O isolamento de bactérias a partir dos meios NFb, JNFb e JMV mostrou que os 14 cultivares de sorgo forrageiro testados são aptos à associação com bactérias diazotróficas e que, de acordo com a análise de similaridade, os isolados provavelmente pertencem aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. O mesmo não se verifica com relação aos cinco isolados que apresentaram níveis de similaridade superiores a 50% à estirpe padrão *H. seropedicae* Z67 (ATCC 35892). Estes resultados estão de acordo com pesquisas anteriores, que demonstraram a presença *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em plantas de sorgo (Chiarini et al., 1998; Baldani et al., 1986; Bashan et al., 2004).

#### **4.1.3 Efeito de genótipos de sorgo forrageiro sobre a diversidade das bactérias diazotróficas**

Foram calculados índices de diversidade com o objetivo de verificar se o fator genótipo influenciou a diversidade de bactérias diazotróficas que colonizaram as plantas.

Com relação à presença de bactérias diazotróficas nos 14 cultivares de sorgo forrageiro analisados, observou-se que todos os cultivares foram eficientes na associação com bactérias diazotróficas. Com exceção dos cultivares 1F 305 e Fepagro RS 11, nos quais os isolados foram provenientes de apenas um meio, JNFb e NFb respectivamente, mais de um gênero de bactérias diazotróficas foram isoladas dos cultivares de sorgo forrageiro (Figura 2).

A partir dos cultivares Fepagro RS 12, Fepagro RS 17 e BR 610 foram isoladas bactérias dos meios JMV e NFb. A partir dos cultivares Fepagro 19, Past 49 C, Past 10, BR 506 e 855 F foram isoladas bactérias dos meios JNFb e JMV, ao passo que no cultivar BRS 800 foram isoladas bactérias dos meios NFb e JNFb. Os cultivares Fepagro RS 18, Past 76 e BR 601 foram os que apresentaram os maiores índices de diversidade, de acordo os índices de Shannon-Weaver e Simpson (Tabela 5), tendo sido isoladas bactérias dos meios JMV, NFb e JNFb.

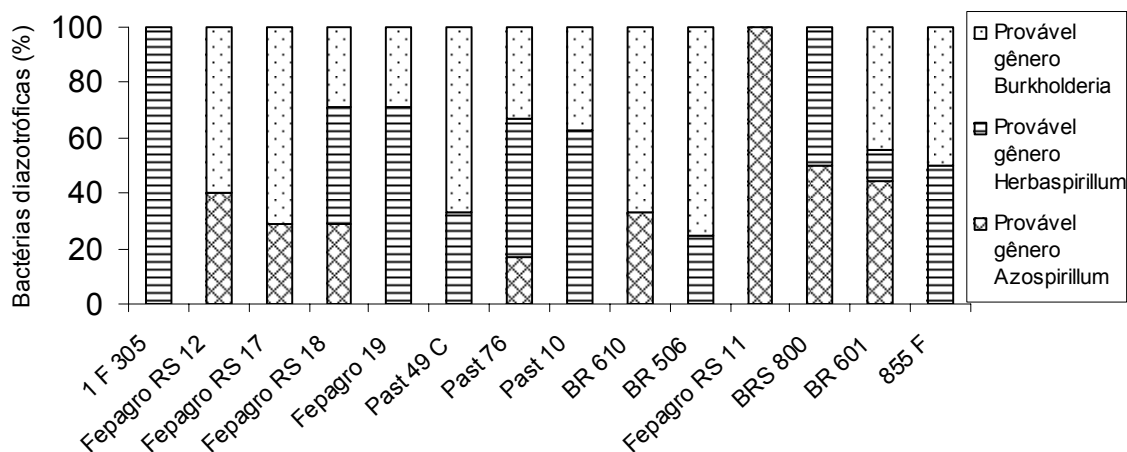


Figura 2. Bactérias diazotróficas presentes nos diferentes cultivares de sorgo forrageiro. Porto Alegre, 2004.

Através do índice de equitabilidade (Tabela 5) verificou-se a distribuição dos indivíduos entre os diferentes gêneros presentes nos cultivares de sorgo. Os cultivares 1 F 305, Fepagro RS 11, Fepagro RS 17, Fepagro RS 19 e BR 506 foram os que apresentaram as menores médias de equitabilidade, demonstrando que nestes cultivares houve predominância de um gênero sobre os demais. Observou-se que a partir do cultivar 1F 305 apenas foram isoladas bactérias do meio JNFb, evidenciando, através do índice de similaridade, que *Herbaspirillum* foi o gênero dominante neste cultivar. Já no cultivar Fepagro RS 11 todos os isolados obtidos foram provenientes do meio NFb, demonstrando que *Azospirillum* foi o gênero dominante. Nos cultivares BR 506 e Fepagro RS 17 predominaram isolados provenientes do meio JMV, sendo então *Burkholderia* o gênero predominante. Já no cultivar Fepagro RS 19 predominaram isolados provenientes do meio JNFb, sendo então *Herbaspirillum* o gênero predominante. Com relação aos demais cultivares de sorgo forrageiro, a distribuição dos gêneros foi mais homogênea, indicando que não houve dominância de um gênero sobre os demais.

Existe um consenso geral de que o genótipo da planta é um fator-chave para a fixação biológica de nitrogênio, conjuntamente com a seleção de estirpes eficientes (Reis et al., 2000). Os resultados indicam que o genótipo da planta

exerce efeitos diferenciais na colonização por estas bactérias e que tais resultados podem estar relacionados à composição química dos exudatos liberados pelas plantas, que pode variar entre genótipos (Kipe-Nolt et al., 1985).

Tabela 5. Índice de diversidade entre comunidades isoladas dos cultivares de sorgo forrageiro do tratamento sem nitrogênio. Porto Alegre, 2004.

Cultivar	Índices de diversidade				
	I	S	1-D	H	E
1 F 305	1	1	0	0	0
Fepagro RS 12	5	2	0,48	0,67	0,97
Fepagro RS 17	7	2	0,41	0,60	0,86
Fepagro RS 18	7	3	0,65	1,08	0,98
Fepagro 19	7	2	0,41	0,60	0,86
Past 49 C	3	2	0,44	0,64	0,92
Past 76	6	3	0,61	1,01	0,92
Past 10	8	2	0,46	0,66	0,95
BR 610	6	2	0,44	0,64	0,92
BR 506	4	2	0,37	0,56	0,81
Fepagro RS 11	1	1	0	0	0
BRS 800	4	2	0,5	0,69	1,00
BR 601	9	3	0,59	0,96	0,88
855 F	8	2	0,5	0,69	1,00

I: número de isolados; S: número de gêneros; 1-D: índice de diversidade de Simpson; H: Shannon-Weaver; E: Equitabilidade.

Há indícios que os cultivares Fepagro RS 18, Past 76 e BR 601 apresentaram maior diversidade de gêneros de bactérias diazotróficas, o que pode ser atribuído à liberação de exudatos com maior diversidade de compostos orgânicos. Segundo Grayston et al. (1998), a variedade de compostos orgânicos liberados pelas plantas influencia a diversidade de microrganismos presentes na rizosfera. Kipe-Nolt et al. (1985) verificaram diferenças quantitativas consistentes entre os genótipos de sorgo na exudação de compostos orgânicos solúveis, sendo que, para um mesmo genótipo, as bactérias diferiram na utilização de tais exudatos. Os mesmos autores fizeram referência a trabalhos anteriores, nos quais genótipos de sorgo diferiram quanto à associação com bactérias diazotróficas, resultando em diferentes níveis da atividade da enzima nitrogenase. Boddey et al. (1991) comprovaram que uma mesma bactéria pode ter diferentes graus de

atividade da enzima nitrogenase, quando inoculada em diferentes genótipos de sorgo. Assim sendo, a variação na diversidade de organismos isolados nos diferentes cultivares de sorgo pode ser explicada pela especificidade que ocorre entre planta e bactéria.

A alta diversidade de bactérias, aliada ao alto teor de nitrogênio nos tecidos das plantas que não receberam adubação nitrogenada e baixa resposta à adubação nitrogenada em condições de baixa fertilidade, pode ser atribuída à influência que o genótipo da planta pode apresentar sobre as bactérias diazotróficas. Sendo assim, o cultivar Past 76 mostrou-se promissor para futuros estudos, considerando sua aparente eficiência em associar-se com bactérias diazotróficas. Para este cultivar observou-se elevada diversidade de bactérias diazotróficas associadas, no qual foram isoladas bactérias de três diferentes meios de cultura: JMV, JNFb e NFb. Segundo Moreira & Siqueira (2002), citados por Nóbrega et al. (2004), a diversidade dos microrganismos envolvidos garante grande estabilidade na fixação biológica do nitrogênio e a ocorrência deste processo nos mais diferentes ambientes terrestres. Além da elevada diversidade, deve-se levar em conta que o cultivar Past 76 também demonstrou baixa resposta à adubação nitrogenada e alto teor de nitrogênio nas plantas que não receberam adubação nitrogenada (Tabela 4). Estes fatores podem ser indicativos de que houve uma eficiente associação com bactérias diazotróficas, sendo que parte do N suprido pode ter sido proveniente da FBN.

#### **4.2 Seleção de cultivares de sorgo granífero**

A seleção de cultivares de sorgo granífero foi baseada no rendimento de matéria seca e no acúmulo de nitrogênio no tecido, em resposta à adubação nitrogenada.

#### 4.2.1 Efeito da adubação nitrogenada sobre os cultivares de sorgo granífero

Com relação ao rendimento de matéria seca, foram obtidos valores superiores no tratamento em que foi aplicado nitrogênio, em comparação àquele em que não foi aplicado fertilizante nitrogenado ao solo (Tabela 6). O cultivar AG 1018 foi o único que não evidenciou aumento significativo no rendimento de matéria seca com aplicação de nitrogênio mineral. França (1983), citado por Fernandes et al. (1991), também observou diferença entre genótipos na resposta à adubação nitrogenada, a qual foi atribuída a diferenças genéticas entre os cultivares testados.

Tabela 6. Matéria seca na parte aérea dos cultivares de sorgo granífero aos 67 dias após a emergência. Eldorado do Sul, 2005.

Cultivar	Adubação nitrogenada ( kg ha <sup>-1</sup> )	
	0	90
	-----g planta <sup>-1</sup> -----	
AG 2005	36,29 A b	103,50 A a
AG 1018	45,38 A a	69,95 A a
Pioneer 8419	47,26 A b	122,91 A a
DKB Ambar	61,13 A b	110,88 A a
DKB 57	45,83 A b	80,37 A a
Pioneer 8118	40,57 A b	89,04 A a
CV (%)	15,19	17,26

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre cultivares e médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre tratamentos pelo Teste de Scott-Knott a 5%.

O teor de nitrogênio no tecido dos cultivares de sorgo foi influenciado pela adição de nitrogênio (Tabela 7). Na comparação entre cultivares, porém, verificou-se que não houve diferenças significativas, para ambos níveis de adubação nitrogenada.

Os acréscimos no nitrogênio total devido à aplicação de N variaram de 141,79 mg N planta<sup>-1</sup> no cultivar Pioneer 8118 a 1070,24 mg N planta<sup>-1</sup> no cultivar DKB Ambar.



Com relação à eficiência relativa de absorção de nitrogênio dos cultivares, observou-se que o genótipo DKB Ambar foi o que apresentou maior eficiência (35,67%). Já o genótipo AG 1018 foi o que demonstrou menor eficiência relativa de absorção de nitrogênio (18,78%) (Tabela 7).

A baixa eficiência relativa de absorção de nitrogênio do cultivar AG 1018 sugere, a princípio, que houve uma eficiente associação com bactérias diazotróficas e que esta baixa resposta ao fertilizante nitrogenado poderia ser atribuída à fixação biológica do nitrogênio. Na hipótese de haver uma eficiente associação com bactérias, seria esperado um alto conteúdo de N no tecido das plantas, uma vez que parte do suprimento de N poderia ser proveniente da FBN.

Tabela 7. Nitrogênio total na parte aérea das plantas de sorgo granífero avaliados aos 67 dias após a emergência. Eldorado do Sul, 2005.

Cultivar	Adubação nitrogenada ( kg N ha <sup>-1</sup> )		Eficiência relativa de absorção de N
	0	90	
	-----mg N planta <sup>-1</sup> -----		%
AG 2005	290,69 A b	1231,22 A a	31,34
AG 1018	509,65 A b	1073,07 A a	18,78
Pioneer 8419	411,51 A b	994,35 A a	19,42
DKB Ambar	496,54 A b	1566,78 A a	35,67
DKB 57	428,97 A b	1198,38 A a	25,65
Pioneer 8118	403,17 A b	1071,68 A a	20,03
CV (%)	12,35	13,22	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre cultivares e médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente entre tratamentos pelo Teste de Scott-Knott a 5%.

Estatisticamente, o cultivar AG 1018 não se sobressaiu dos demais genótipos testados quanto ao teor de nitrogênio no tecido, indicando que todos os cultivares de sorgo granífero responderam similarmente à adubação nitrogenada. A não significância entre os teores de nitrogênio observados nos diferentes genótipos pode ser explicada pela variabilidade de resultados encontrados, por se tratar de um experimento conduzido em campo. Por outro lado, é possível que, entre os genótipos testados, não haja variabilidade genética suficiente para que

houvesse diferenças acentuadas entre os cultivares em termos de teores de N no tecido, que permitissem destacar claramente genótipos mais promissores para futuros estudos.

#### **4.2.2 Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas aos cultivares de sorgo granífero**

Os resultados do isolamento das bactérias a partir dos cultivares de sorgo granífero mostraram a presença de bactérias diazotróficas nos seis cultivares analisados e nas duas partes amostradas (raízes e colmos).

Foram obtidos 29 isolados de três diferentes meios: NFb, JNFb e JMV. A partir das características fenotípicas das colônias, verificou-se que se formaram dois grupos principais, sendo que o grupo localizado na parte superior associou-se com estirpes padrão pertencentes ao grupo das alfa-proteobactérias e o grupo localizado na parte inferior, com exceção da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* que pertence ao grupo das alfa-proteobactérias, uniu grupos que se associaram com estirpes que pertencem ao grupo das beta-proteobactérias (Figura 3).

Formaram-se três grupos que apresentaram 100% de similaridade com as estirpes padrão utilizadas. Destes, foi observado que sete isolados alcalinizaram o meio de cultura, apresentaram colônias brancas, secas e com bordas rugosas em meio de cultura NFb sólido, e colônias branco-amareladas, secas, rugosas e de coloração rosada após uma semana de incubação em meio Batata. Com base nestas características, estes isolados se agruparam com 100% de similaridade com a estirpe padrão *A.brasilense* Sp7 (ATCC 29145). Estas características foram as mesmas encontradas quando se verificou a morfologia das colônias da estirpe *A.brasilense* Sp7 (ATCC 29145) nos meios NFb e Batata.

Foi verificado que oito isolados agruparam-se com 100% de similaridade com a estirpe padrão *H. seropedicae* Z67 (ATCC 35892). Tais isolados apresentaram as seguintes características: alcalinizaram o meio de cultura, continham colônias úmidas, com bordas lisas e inicialmente brancas e

tornando-se azuis após uma semana de incubação em meio de cultura NFb sólido, úmidas e com bordas lisas e colônias bege em meio Batata. Estas características foram as mesmas encontradas quando se verificou a morfologia das colônias da estirpe *H. seropedicae* Z67 (ATCC 35892) nos meios JNFb e Batata.

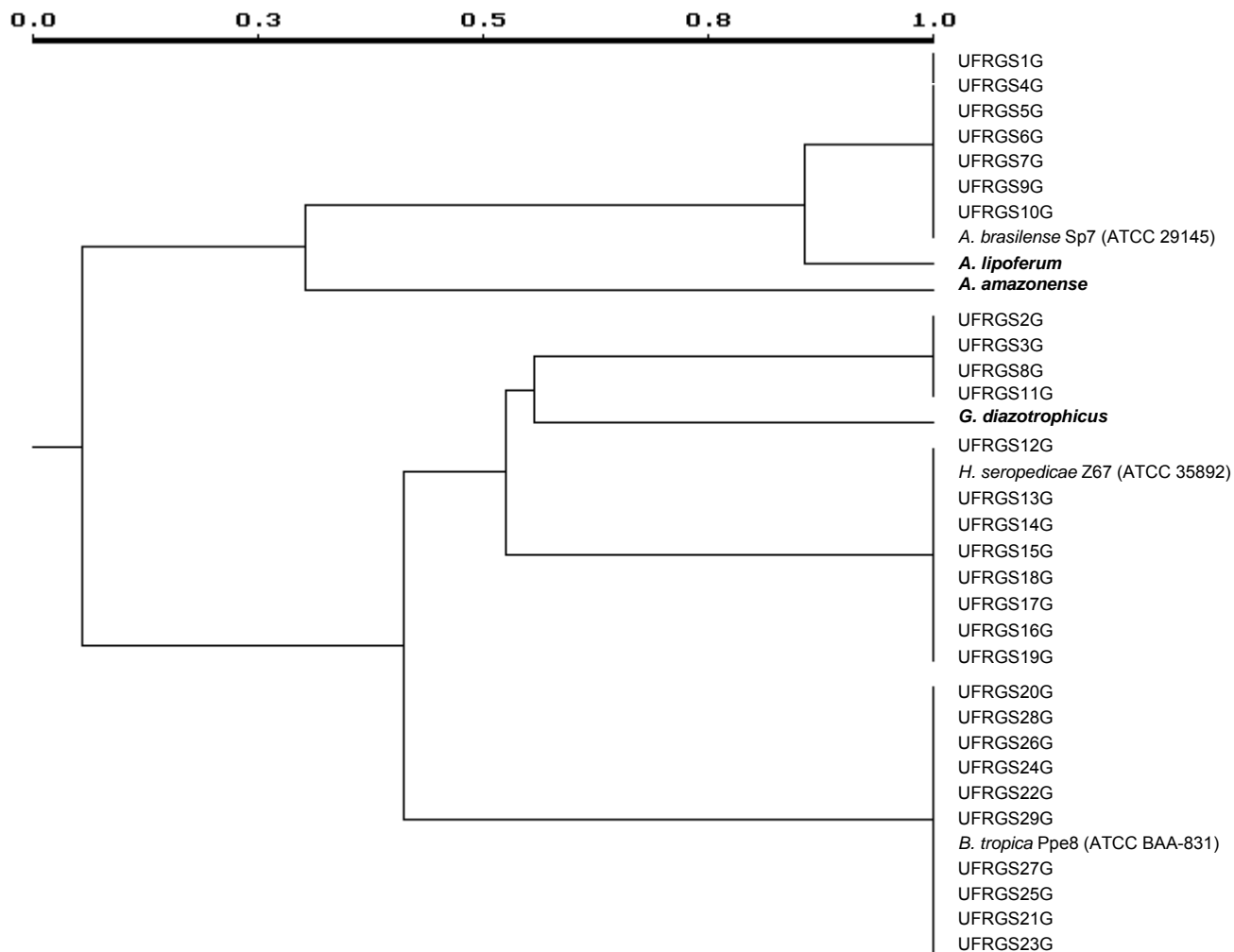


Figura 3. Fenograma de similaridade entre as bactérias isoladas dos cultivares de sorgo granífero. Eldorado do Sul, 2005.

Dez isolados, que não modificaram o pH do meio, continha colônias de coloração amarela com centro laranja, úmidas e lisas em meio JMV e colônias de coloração beges, úmidas e lisas em meio de cultura Batata agruparam-se com 100% de similaridade com a estirpe padrão *B. tropica* Ppe8 (ATCC BAA-831). Estas características foram as mesmas encontradas quando se verificou a morfologia das colônias da estirpe *B. tropica* Ppe8 (ATCC BAA-831). nos meios JMV e Batata.

Além destes três grupos formados, quatro isolados que não apresentam características semelhantes às dos isolados padrão testados formaram um quarto grupo. Estes isolados se caracterizaram por alcalinizarem o meio, apresentarem colônias verdes, com bordas lisas e úmidas em meio de cultura NFb, e colônias amarelas, úmidas e com bordas lisas em meio Batata. Estes isolados obtiveram 50% de similaridade com a estirpe padrão *H. seropedicae* Z67 (ATCC 35892). Desta forma, este grupo deve, provavelmente, pertencer a organismos com características próprias pertencentes ao grupo das betaproteobactérias.

De acordo com estes resultados, as bactérias isoladas das plantas de sorgo granífero que obtiveram 100% de similaridade com as estirpes padrão utilizadas, provavelmente, pertencem aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Os gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* foram obtidos das duas partes das plantas de sorgo analisadas (raiz e colmo). Já as bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* e as que não apresentam características semelhantes às dos isolados padrão testados, foram isoladas apenas das raízes. A presença de *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em raízes e colmo pode ser devido ao caráter endofítico obrigatório dos gêneros (James & Olivares, 1997). Já o gênero *Azospirillum* compreende predominantemente bactérias colonizadoras da rizosfera, no qual somente algumas estirpes são aptas em colonizar o interior das plantas (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Em geral, as bactérias deste gênero colonizam, principalmente, as zonas de alongação e pêlos radiculares (Broeck & Vanderleyden, 1995).

### 4.2.3 Efeito de genótipos de sorgo granífero sobre a diversidade das bactérias diazotróficas

Foram calculados índices de diversidade com o objetivo de verificar se o fator genótipo influenciaram na ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas. De acordo com os resultados obtidos no isolamento das bactérias diazotróficas, a partir dos cultivares de sorgo granífero, foi verificado que os genótipos influenciaram a ocorrência e distribuição dos isolados de ambos os tratamentos (Figura 4).

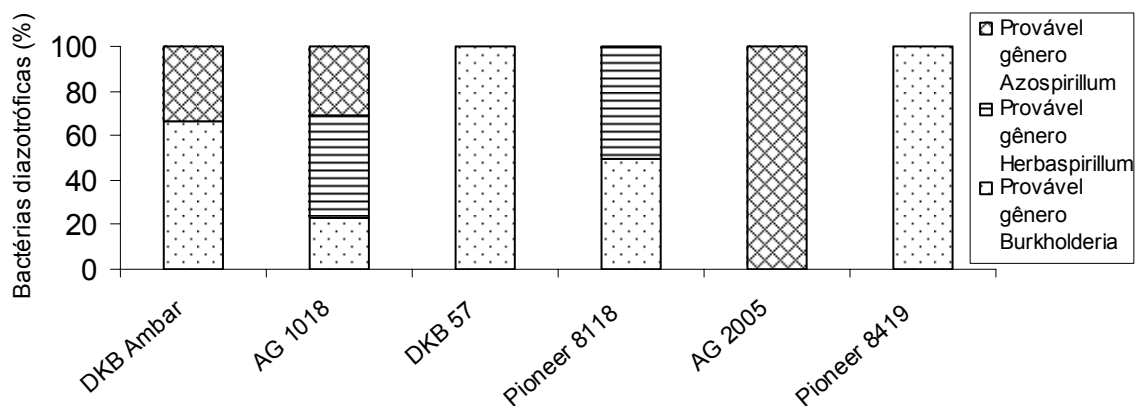


Figura 4. Bactérias diazotróficas presentes nos diferentes cultivares de sorgo granífero. Eldorado do Sul, 2005.

Com base nos índices de diversidade (Tabela 8), o cultivar AG 1018 foi o que apresentou a maior diversidade de gêneros no tratamento que recebeu adubação nitrogenada, no qual foram isoladas bactérias dos meios NFb e JMV. Já nos cultivares AG 2005, Pioneer 8419, DKB Ambar e Pioneer 8118 isolou-se apenas um gênero de cada cultivar, e a partir dos cultivares DKB 57 não foram isoladas bactérias das plantas de sorgo do tratamento com nitrogênio. O cultivar AG 1018 foi o que também apresentou a maior média de equitabilidade, o que sugere que neste cultivar a distribuição dos gêneros foi mais homogênea, ou seja, não houve dominância de um gênero sobre os demais.

Com relação às plantas de sorgo do tratamento sem nitrogênio verificou-se, através dos índices de diversidade, que os cultivares que apresentaram maior diversidade foram AG 1018, DKB Ambar e Pioneer 8118. A partir dos cultivares AG 1018 e Pioneer 8118 foram isoladas bactérias dos meios JNFb e NFb e do cultivar DKB Ambar foram isoladas bactérias dos meios JMV e NFb. Dos cultivares AG 2005 e DKB 57 foram isoladas bactérias de apenas um gênero, JMV e NFb, respectivamente. Já, a partir do cultivar Pioneer 8419 não foram isoladas bactérias das plantas do tratamento que não recebeu adubação nitrogenada. O cultivar DKB Ambar foi o que apresentou as maiores médias de equitabilidade, sugerindo, com isto, que neste cultivar a distribuição dos gêneros foi mais homogênea (Tabela 8). De modo geral, houve maior diversidade de bactérias diazotróficas no tratamento sem adubação nitrogenada (Tabela 8). No tratamento que recebeu adubação nitrogenada, os índices de diversidades tiveram valor zero em todos os genótipos, exceção feita ao cultivar AG 1018.

Tabela 8. Índice de diversidade de bactérias diazotróficas totais isoladas de plantas de sorgo granífero, com e sem adubação nitrogenada. Eldorado do Sul, 2005.

Cultivar	Índices de diversidade				
	I	S	1-D	H	E
<b>Com N (90 kg de N ha<sup>-1</sup>)</b>					
AG 2005	1	1	-	-	-
AG 1018	5	2	0,3	0,5	0,7
Pioneer 8419	2	1	-	-	-
DKB Ambar	2	1	-	-	-
DKB 57	0	-	-	-	-
Pioneer 8118	1	1	-	-	-
<b>Sem N (0 kg ha<sup>-1</sup>)</b>					
AG 2005	1	1	-	-	-
AG 1018	8	2	0,4	0,6	0,8
Pioneer 8419	0	-	-	-	-
DKB Ambar	4	2	0,5	0,7	1
DKB 57	2	1	-	-	-
Pioneer 8118	3	2	0,4	0,6	0,9

I: número de isolados; S: número de gêneros; 1-D: índice de diversidade de Simpson; H: Shannon-Weaver; E: Equitabilidade.

A parte da planta também foi um fator que influenciou na ocorrência de bactérias nos cultivares de sorgo. Em ambos os tratamentos, o maior número de isolados foi obtido a partir das raízes das plantas. No tratamento que recebeu adubação nitrogenada isolaram-se sete bactérias das raízes, ao passo que foram isoladas apenas quatro do colmo. Já com relação ao tratamento que não recebeu adubação nitrogenada, foram isoladas 17 bactérias das raízes, ao passo que no colmo não foi obtido nenhum isolado.

A maior diversidade de bactérias encontrada nas raízes pode ser atribuída ao fato do sistema radicular ser um grande dreno de compostos orgânicos produzidos na parte aérea, e que tais compostos são utilizados pelas bactérias para a sua sobrevivência, conforme observaram Reis Junior et al. (2000). Além disso, o acesso das bactérias diazotróficas à parte aérea das plantas, através dos vasos do xilema, pode ser dificultado (Reis Junior et al., 2000).

O cultivar AG 1018 foi o que apresentou menor resposta à adubação nitrogenada, em comparação aos demais cultivares testados. Por outro lado, este cultivar de sorgo granífero mostrou-se similar em relação aos demais no que diz respeito ao acúmulo de nitrogênio no tecido em condições de baixa fertilidade. Porém, considerando a elevada diversidade de bactérias diazotróficas e a baixa resposta à adubação nitrogenada, os resultados sugerem que pode ter havido uma eficiente associação com bactérias diazotróficas. Este tipo de resposta sugere que o cultivar AG 1018 pode ser promissor para futuros estudos de seleção de cultivares destinados ao cultivo em solos com baixa disponibilidade de nitrogênio.

#### **4.2.4 Relação entre adubação nitrogenada e distribuição de bactérias diazotróficas em cultivares de sorgo granífero**

O isolamento das bactérias diazotróficas foi realizado a partir dos cultivares de sorgo granífero dos dois tratamentos avaliados (com e sem

nitrogênio), com o objetivo de avaliar a diversidade das bactérias em resposta à adubação nitrogenada.

A adubação nitrogenada influenciou o rendimento de matéria seca e o teor de N nos cultivares de sorgo, assim como a ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas nos sítios avaliados das plantas. De acordo com os índices de diversidade (Tabela 8), foi observado que, em geral, houve maior diversidade de bactérias nos cultivares de sorgo do tratamento que não recebeu adubação nitrogenada. Os cultivares AG 1018, DKB Ambar e Pioneer 8118 apresentaram índices de Shannon-Weaver maiores no tratamento que não recebeu adubação, em relação ao tratamento em que foi aplicado fertilizante nitrogenado. Tais cultivares também apresentaram uma maior média de equitabilidade (Tabela 8), evidenciando, com isto, que a distribuição das bactérias diazotróficas foi mais homogênea no tratamento que não recebeu adubação nitrogenada.

Também foi observado que a diversidade de populações de bactérias diazotróficas nas raízes foi menor no tratamento que recebeu adubação nitrogenada. No tratamento com adubação nitrogenada foram isoladas bactérias de dois meios de cultura (JMV e NFb), ao passo que no tratamento que não recebeu adubação foram isoladas bactérias de três meios de cultura: JMV, JNFb e NFb.

Com relação à diversidade das bactérias no colmo das plantas de sorgo granífero, foi observado que a maior diversidade ocorreu no tratamento que recebeu adubação nitrogenada, onde foram isoladas bactérias de dois meios de cultura JMV e JNFb. No tratamento que não foi adubado foi isolada apenas uma bactéria do meio JNFb.

Segundo Kolb & Martin (1988), a adubação nitrogenada aumenta o número de bactérias heterotróficas que colonizam a rizosfera de diversas plantas, o que sugere que o decréscimo na diversidade de bactérias diazotróficas nas raízes pode ter sido causado por competição entre bactérias diazotróficas e heterotróficas. Na ausência de nitrogênio a população de bactérias diazotróficas é favorecida, uma vez que os microrganismos heterotróficos necessitam de uma



fonte nitrogenada externa para o aumento da população. O oposto ocorre quando existe uma fonte de nitrogênio disponível no solo.

Além da diminuição da diversidade, alguns autores relatam que altas doses de adubo nitrogenado também podem causar a diminuição da população de bactérias diazotróficas. Kirchof et al. (1997) observaram que a quantidade de bactérias diazotróficas era menor ou não-detectável em altos níveis de N mineral. Fuentes-Ramírez et al. (1993) também verificaram que a associação da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* com plantas de cana-de-açúcar foi severamente limitada pelas altas doses de adubo nitrogenado.

A Figura 5 representa a distribuição de bactérias diazotróficas encontradas em plantas (raízes e colmos) de sorgo granífero, com e sem aplicação de nitrogênio. Pode-se observar que a ocorrência de bactérias diazotróficas foi influenciada tanto pelo genótipo de sorgo quanto pela dose de N aplicada, ou seja, os cultivares se comportaram diferentemente quanto à distribuição e ocorrência das bactérias em relação à adubação nitrogenada.

Com exceção do cultivar AG 2005, no qual o isolamento foi o mesmo nos dois tratamentos (apenas foram isoladas bactérias do meio JMV), o isolamento das bactérias dos demais cultivares variou entre os tratamentos (Figura 5). Este efeito pode ser devido ao fato que a adubação nitrogenada pode alterar o estado fisiológico da planta e, conseqüentemente, afetar as populações das bactérias diazotróficas (Muthukumarasamy et al.,1999). Desta forma, foi possível verificar diferenças na ocorrência e distribuição de bactérias diazotróficas entre os cultivares avaliados e entre as doses de nitrogênio aplicadas, indicando que estes dois fatores podem ter influenciado na diversidade da população das bactérias associadas ao sorgo. Tais diferenças podem ser indicadas como possíveis fatores de influência nas taxas de fixação biológica do nitrogênio em plantas de sorgo.

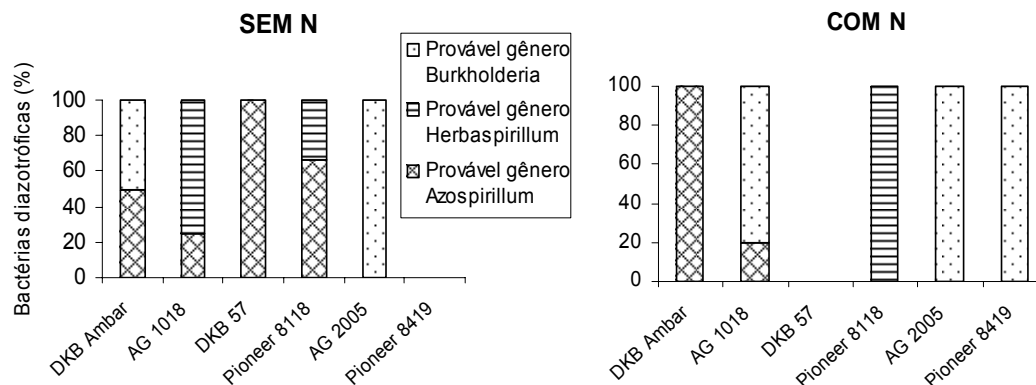


Figura 5. Bactérias diazotróficas presentes nos cultivares de sorgo granífero, com e sem adubação nitrogenada. Eldorado do Sul, 2005.

### 4.3 Seleção de bactérias diazotróficas

Um total de 76 bactérias isoladas de plantas de sorgo forrageiro e 29 bactérias isoladas de plantas de sorgo granífero foi analisado quanto à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e de produzir ácido indol-acético *in vitro*.

#### 4.3.1 Quantificação do nitrogênio fixado pelas bactérias diazotróficas

Os resultados da quantificação do nitrogênio atmosférico fixado pelas bactérias isoladas dos cultivares de sorgo forrageiro (Tabela 9) variaram de 3,78  $\mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (isolado UFRGS21F) a 229,72  $\mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (isolado UFRGS62F). As bactérias UFRGS62F (isolada do meio Nfb), UFRGS60F (isolada do meio JNfb) e UFRGS55F (isolada do meio JNfb) foram as que mais fixaram  $\text{N}_2$  *in vitro*.

Com relação à quantificação do nitrogênio fixado pelas bactérias isoladas dos cultivares de sorgo granífero (Tabela 10), os resultados variaram de 5,92  $\mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (isolado UFRGS24G) a 112,46  $\mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (isolado UFRGS7G). A bactéria UFRGS24G (isolada do meio JMV) foi isolada a partir do cultivar Pioneer 8419, enquanto que a bactéria UFRGS7G (isolada do meio Nfb) foi isolada do cultivar DKB Ambar.

A média geral de  $N_2$  fixado pelas bactérias isoladas das plantas de sorgo forrageiro foi de  $65,80 \mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . Já, a média geral do  $N_2$  fixado pelas bactérias isoladas das plantas de sorgo granífero foi de  $47,20 \mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , enquanto que a estirpe padrão *A. brasilense* Sp7 fixou  $102,47 \mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . Portanto, a estirpe padrão produziu 55,7% a mais que a média dos isolados do experimento com sorgo forrageiro e 117% a mais que a média dos isolados do experimento com sorgo granífero. A estirpe Sp7 foi originalmente isolada de *Digitaria decumbens* e é a bactéria mais utilizada em estudos de inoculação, provavelmente, devido ao seu alto potencial de fixação biológica (Baldani et al., 1999; Roesch, 2003).

Para ambos experimentos, a média de  $N_2$  fixado pelas bactérias isoladas do meio JMV foi de  $23,89 \mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . A média daquelas que foram isoladas do meio JNFb foi de  $91,35 \mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , e das bactérias isoladas do meio NFb foi de  $82,83 \mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ .

A técnica de quantificação de nitrogênio atmosférico *in vitro* permitiu verificar que todos os isolados testados, de ambos experimentos, foram aptos em fixar  $N_2$ . A utilização desta metodologia, no presente trabalho, foi eficiente para a seleção de bactérias mais eficientes em fixar  $N_2$  *in vitro*. Entre os isolados testados neste estudo, os mais promissores foram os isolados UFRGS62F, UFRGS55F e UFRGS60F, isolados de sorgo forrageiro, e UFRGS7G, isolado de sorgo granífero. O desempenho dos microrganismos foi verificado em condições axênicas (*in vitro*), sugerindo que o próximo passo a ser dado neste estudo seria a verificação do potencial dos isolados em condições não-axênicas (*in situ*).

É sabido que o estímulo que as bactérias exercem sobre as plantas e seu potencial para atuar tanto como fixadoras como de produtoras de fitormônios é influenciado por diversas variáveis, tais como o tipo de solo, nutrição, umidade, temperatura e comunidade presente no local (Kloepper et al., 1989). Diante disto, um estudo com inoculação de isolados em sorgo poderia avaliar a eficiência das bactérias em fixar  $N_2$  em condições não-axênicas. Isto permitiria verificar o

estabelecimento e a competitividade das bactérias diazotróficas em campo, uma vez que a colonização e o estabelecimento destes microrganismos associativos são influenciados de maneira diferente, dependendo das populações naturais do solo, conforme sugerem Baldani et al. (1986) e Sala et al. (2005).

Alguns autores obtiveram resultados significantes com a inoculação de bactérias isoladas da rizofera em plantas. Asghar et al. (2002) verificaram que a inoculação de sementes com bactérias previamente isoladas da rizosfera de diferentes espécies de *Brassica* aumentaram significativamente a altura das plantas (até 56%), o diâmetro do caule (até 11%), o número de ramos (até 35%), o número de síliquas por planta (até 27%), o peso de 1.000 grãos (até 34%), o rendimento de grãos (até 45%) e o teor de óleo (até 5,6%) em comparação às plantas não-inoculadas. Bertrand et al. (2001), citado por Asghar et al. (2002), isolaram 13 bactérias da rizosfera de plantas de canola (*Brassica napus*) para avaliar a atividade dos promotores de crescimento das plantas. Oito dos 13 isolados proporcionaram um aumento significativo, de 11 a 52%, no rendimento de matéria seca das plantas de canola.

Tabela 9. N total fixado e produção de ácido indol-acético das bactérias isoladas das raízes dos cultivares de sorgo forrageiro. Porto Alegre, 2004.

Isolado	Cultivar	Nitrogênio fixado	Produção de AIA
		$\mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	$\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$
<b>JMV</b>			
UFRGS1F	Fepagro RS 12	11,60 h	5,13 d
UFRGS2F	Fepagro RS 12	26,01 g	3,41 e
UFRGS3F	Fepagro RS 12	16,63 h	7,97 b
UFRGS4F	Fepagro RS 17	20,54 h	1,87 f
UFRGS5F	Fepagro RS 17	43,83 g	3,02 e
UFRGS6F	Fepagro RS 17	14,83 h	1,80 f
UFRGS7F	Fepagro RS 17	27,60 g	4,95 d
UFRGS8F	Fepagro RS 17	28,48 g	4,95 d
UFRGS9F	Fepagro RS 18	14,24 h	4,90 d
UFRGS10F	Fepagro RS 18	8,43 h	7,26 c
UFRGS11F	Fepagro 19	43,69 g	6,90 c
UFRGS12F	Fepagro 19	16,76 h	3,03 e
UFRGS13F	Past 49 C	12,68 h	3,03 e
UFRGS14F	Past 49 C	20,94 g	3,02 e
UFRGS15F	Past 76	16,85 h	6,16 c
UFRGS16F	Past 76	17,77 h	9,04 a
UFRGS17F	Past 10	39,15 g	6,50 c
UFRGS18F	Past 10	18,90 h	4,18 d
UFRGS19F	Past 10	11,20 h	0,70 f
UFRGS20F	BR 610	25,59 g	4,43 d
UFRGS21F	BR 610	3,78 h	3,02 e
UFRGS22F	BR 610	16,58 h	3,02 e
UFRGS23F	BR 610	19,40 h	4,43 d
UFRGS24F	BR 506	20,54 h	4,36 d
UFRGS25F	BR 506	32,45 g	3,61 e
UFRGS26F	BR 506	11,36 h	4,69 d
UFRGS27F	BR 601	27,03 g	1,75 f
UFRGS28F	BR 601	21,09 h	2,71 f
UFRGS29F	BR 601	35,92 g	2,86 e
UFRGS30F	BR 601	20,65 h	1,69 f
UFRGS31F	855 F	24,65 g	1,63 f
UFRGS32F	855 F	13,44 h	0,80 f
UFRGS33F	855 F	10,50 h	1,63 f
UFRGS34F	855 F	36,75 g	0,80 f
<b>JNFb</b>			
UFRGS35F	1 F 305	72,18 f	5,66 c
UFRGS36F	Fepagro RS 18	69,93 f	8,84 a
UFRGS37F	Fepagro RS 18	97,28 e	8,84 a

Tabela 9. Continuação...

UFRGS38F	Fepagro RS 18	78,28 e	8,21 b
UFRGS39F	Fepagro 19	82,73 e	3,35 e
UFRGS40F	Fepagro 19	56,07 f	3,35 e
UFRGS41F	Fepagro 19	87,92 e	5,77 c
UFRGS42F	Fepagro 19	57,79 f	4,46 d
UFRGS43F	Fepagro 19	149,13 c	4,46 d
UFRGS44F	Past 49 C	68,72 f	5,87 c
UFRGS45F	Past 76	118,59 d	7,65 c
UFRGS46F	Past 76	61,56 f	9,19 a
UFRGS47F	Past 76	168,46 c	9,30 a
UFRGS48F	Past 10	48,12 f	9,30 a
UFRGS49F	Past 10	91,74 e	5,61 c
UFRGS50F	Past 10	63,72 f	5,69 c
UFRGS51F	Past 10	80,20 e	4,77 d
UFRGS52F	Past 10	67,05 f	2,35 f
UFRGS53F	BR 506	49,02 f	7,86 b
UFRGS54F	BRS 800	83,18 e	5,24 d
UFRGS55F	BRS 800	223,39 a	6,94 c
UFRGS56F	BR 601	196,93 b	8,97 a
UFRGS57F	855 F	82,55 e	1,56 f
UFRGS58F	855 F	159,30 c	7,16 c
UFRGS59F	855 F	194,89 b	7,16 c
UFRGS60F	855 F	227,64 a	7,16 c
<b>NFb</b>			
UFRGS61F	Fepagro RS 12	67,47 f	5,99 c
UFRGS62F	Fepagro RS 12	229,72 a	3,36 e
UFRGS63F	Fepagro RS 17	66,27 f	6,52 c
UFRGS64F	Fepagro RS 17	73,37 f	8,00 b
UFRGS65F	Fepagro RS 18	55,04 f	6,27 c
UFRGS66F	Fepagro RS 18	83,97 e	1,64 f
UFRGS67F	Past 76	157,44 c	9,07 a
UFRGS68F	BR 610	158,05 c	5,85 c
UFRGS69F	BR 610	66,45 f	3,46 e
UFRGS70F	Fepagro RS 11	71,94 f	1,79 f
UFRGS71F	BRS 800	61,98 f	5,03 d
UFRGS72F	BRS 800	66,99 f	1,58 f
UFRGS73F	BR 601	63,07 f	3,39 e
UFRGS74F	BR 601	86,71 e	10,70 a
UFRGS75F	BR 601	172,67 c	6,51 c
UFRGS76F	BR 601	53,55 f	9,48 a
Sp 7	-	102,47 d	1,57 f
CV (%)		13,3	19,21

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre isolados pelo Teste de Scott-Knott a 5%.

### 4.3.2 Produção de ácido indol-acético

Com relação à produção de PCPs, verificou-se que todos os isolados de ambos experimentos apresentaram habilidade de produzir ácido indol-acético (AIA) em meio de cultura.

Os valores da quantificação de AIA das bactérias isoladas do experimento com sorgo forrageiro (Tabela 9) variaram de 0,70  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$  (isolado UFRGS19F) a 10,70  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$  (isolado UFRGS74F). Os maiores valores de produção de AIA foram obtidos pelas bactérias UFRGS74F (isolada do meio NFb), UFRGS16F (isolada do meio JMV), UFRGS36F, UFRGS37F, UFRGS46F, UFRGS47F, UFRGS48F e UFRGS56F (isoladas do meio JNFb), UFRGS67F e UFRGS76F (isoladas do meio NFb). Em contrapartida, a bactéria UFRGS19F (isolada do meio JMV) foi a que menos produziu AIA, a qual foi isolada do cultivar Past 10.

Com relação à quantificação de AIA produzidos pelas bactérias isoladas do experimento com sorgo granífero, verificou-se que os valores variaram de 1,08  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$  (isolado UFRGS27G) a 22,55  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$  (isolado UFRGS3G) (Tabela 10). A bactéria UFRGS27G (isolada do meio JMV) foi a que menos produziu AIA, a qual foi isolada do cultivar AG 1018. As bactérias UFRGS3G (isolada do meio NFb), UFRGS12G (isolada do meio JNFb) e UFRGS28G (isolada do meio JMV) foram as que mais produziram AIA.

Resultados similares de produção de AIA foram obtidos por Pedraza et al. (2004). Estudando a produção de AIA de diversas espécies de bactérias diazotróficas, os autores verificaram que a produção de AIA pelas bactérias incubadas sob agitação de 120 rpm por 72h, em caldo nutritivo, variou de 4,37 a 27,32  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$ . A menor produção de AIA encontrada pelos pesquisadores foi obtida pelo isolado pertencente à espécie *P. stutzeri*. Já, a maior produção de AIA foi obtida pelo isolado pertencente à espécie *A. brasilense*.

As bactérias isoladas do meio JMV de ambos experimentos produziram, em média, 4,24  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$ . Já, a média de produção de AIA das

bactérias isoladas do meio JNFb foi de 7,63  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$ , enquanto que a média das bactérias isoladas do meio NFb foi de 6,89  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$ .

A média geral de AIA produzidos pelos isolados do experimento com sorgo forrageiro foi de 5,03  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$ , ao passo que a média dos isolados em sorgo granífero foi de 8,43  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$ . A estirpe padrão *A. brasilense* Sp7 produziu 1,64  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$ . Portanto, a produção média de AIA das bactérias isoladas das plantas de sorgo forrageiro foi o triplo da produção da estirpe padrão. Já a produção média dos isolados de sorgo granífero foi cinco vezes maior que a produção da estirpe padrão.

Com base nos resultados obtidos em ambos experimentos verificou-se que não houve um gênero que se sobressaísse dos demais. As bactérias que foram isoladas do mesmo meio de cultura produziram diferentes quantidades de AIA. Já Radwan et al. (2004), estudando a produção de PCPs de diversas estirpes das espécies *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* isoladas de plantas de arroz, verificaram que as estirpes de *Azospirillum* produziram de três a sete vezes mais compostos indólicos que as de *Herbaspirillum*. Com base em diversos pesquisadores, Pedraza et al. (2004) consideraram que as quantidades de AIA obtidas pelos isolados dependem da espécie ou até mesmo da estirpe que está em estudo, assim como das condições em que são cultivados os organismos, tais como: presença ou ausência do precursor do AIA no meio de cultura (triptofano), oxigenação, pH e fase de crescimento em que se encontram os isolados. Além destes fatores, Lambrecht et al. (2000) consideraram que a atividade metabólica, assim como a concentração elevada do produto final (AIA) também podem influenciar nos níveis de AIA produzidos pelas bactérias.

Os resultados de produção de AIA e N fixado pelos isolados demonstram que estes dois eventos não se inter-relacionaram (Tabelas 9 e 10). Estes resultados mostram-se coerentes, pois é sabido que os dois processos são independentes, por serem codificados por genes distintos. Sevilla et al. (2001) observaram que um mutante do gene *nifH* da estirpe *G. diazotrophicus* PAL5



pôde, ainda, estimular o crescimento das plantas em um experimento em cana-de-açúcar, sugerindo que houve produção de auxinas pela bactéria mutante. Estudando a estirpe *Azospirillum* OAD-57, Gadagi et al. (2004) verificaram que houve correlação negativa entre a produção de PCPs e N fixado, já que a estirpe produziu grande quantidade de AIA e giberelinas em caldo nutritivo, porém fixou pequena quantidade de N.

Considerando que não houve correlação entre os resultados de AIA e N fixado, uma alternativa para tornar eficiente o processo de promoção de crescimento vegetal seria buscar maior entendimento a respeito da utilização de inoculantes mistos, visando à obtenção de incrementos na produção agrícola. Resultados positivos da utilização com inoculantes mistos têm sido relatados. Oliveira et al. (2002) testaram a inoculação de sete diferentes combinações de inóculos, usando cinco espécies de bactérias diazotróficas endofíticas (*G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *Burkholderia* sp.) em cana-de-açúcar. Os resultados demonstraram que todas as plantas inoculadas mostraram claras modificações morfológicas, com aumento no rendimento da matéria seca das raízes, sendo que o melhor tratamento foi com a mistura das cinco espécies, seguidas pelo tratamento com a mistura de *Herbaspirillum*. Os autores afirmam que, para que haja uma máxima produção, é necessário que as plantas sejam inoculadas com diferentes espécies de bactérias diazotróficas para promover uma alta transferência de N fixado e fitormônios. Assim sendo, a utilização de inoculantes mistos poderia ser uma alternativa para tornar mais eficiente a associação entre plantas e bactérias.

Tabela 10. N total fixado e produção de ácido indol-acético das bactérias isoladas dos cultivares de sorgo granífero. Eldorado do Sul, 2005.

Isolado	Cultivar	Nitrogênio fixado	Produção de AIA
		$\mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	$\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$
<b>NFb</b>			
UFRGS1G	DKB Ambar	81,90 c	6,60 e
UFRGS2G	DKB 57	45,97 g	15,87 c
UFRGS3G	Pioneer 8118	21,82 j	22,55 a
UFRGS4G	DKB Ambar	67,36 d	2,86 f
UFRGS5G	DKB Ambar	99,56 b	3,62 f
UFRGS6G	AG 1018	58,82 e	13,46 d
UFRGS7G	DKB Ambar	112,46 a	7,20 e
UFRGS8G	Pioneer 8118	44,94 g	6,68 e
UFRGS9G	AG 1018	59,11 e	2,76 f
UFRGS10G	AG 1018	57,87 b	2,70 f
UFRGS11G	DKB 57	52,11 f	13,34 d
<b>JNFb</b>			
UFRGS12G	Pioneer 8118	32,21 i	22,31 a
UFRGS13G	AG 1018	47,94 g	16,61 c
UFRGS14G	AG 1018	43,88 g	6,69 e
UFRGS15G	AG 1018	44,99g	4,75 f
UFRGS16G	Pioneer 8118	39,31 h	18,24 b
UFRGS17G	AG 1018	49,11 g	9,51 e
UFRGS18G	AG 1018	68,34 d	11,30 d
UFRGS19G	AG 1018	43,88 g	5,38 e
<b>JMV</b>			
UFRGS20G	AG 1018	21,82 j	1,46 f
UFRGS21G	DKB Ambar	64,19 d	2,84 f
UFRGS22G	AG 2005	24,29 j	1,54 f
UFRGS23G	AG 2005	12,97 k	3,73 f
UFRGS24G	Pioneer 8419	5,92 k	3,30 e
UFRGS25G	AG 1018	9,92 k	8,31 e
UFRGS26G	Pioneer 8419	33,34 i	6,98 e
UFRGS27G	AG 1018	54,36 f	1,08 f
UFRGS28G	AG 1018	38,62 h	20,66 a
UFRGS29G	DKB Ambar	32,06 i	2,26 f
Sp7	-	102,47 a	1,57 f
CV (%)		5,7	16,9

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre isolados pelo Teste de Scott-Knott a 5%.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- a) Há associação de bactérias diazotróficas com plantas de sorgo forrageiro e granífero utilizados no estado do Rio Grande do Sul.
- b) A distribuição de bactérias diazotróficas é influenciada pelos genótipos de sorgos forrageiro e granífero.
- c) A adubação nitrogenada influencia a ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas em raízes e colmos de sorgo forrageiro e granífero.
- d) As bactérias isoladas de plantas de sorgo forrageiro e granífero são aptas em fixar  $N_2$  e produzir ácido indol-acético *in vitro*.
- e) Existe variabilidade entre os isolados avaliados sugerindo a possibilidade de encontrar organismos novos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASGHAR, H.N. **Isolation and screening of plant growth promoting rhizobacteria for increasing field and oil contents of *Brassica* sp.** Faisalabad: University of Agriculture, 2002. 210f. Tese (Doutorado - Soil Science) - University of Agriculture, Faisalabad, 2002.
- ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.35, n.4, p.231-237, 2002.
- BAKKER, P.A.; BAKKER, H.M.; MARUGG, A.W.; WEISBECK, J.D.; SCHIPPERS, P.J. Bioassay for studying the role of siderophores in potato stimulation by *Pseudomonas* spp. in short potato rotations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, n.4, p.443-449, 1987.
- BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica do nitrogênio em gramíneas: Avanços e aplicações. In. SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Eds.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: UFLA: SBCS, 1999. p.621-667.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., sp. Nov., a root associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.36, n.1, p.86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n. 5/6, p.911-922, 1997.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.;

- DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of “*Pseudomonas*” *rubrisulbalbicans*, a mild plant pathogen as *Herbaspirillum rubrisulbalbicans* comb. nov. and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, p.802-810, 1996.
- BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. No processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** Seropédica: UFRRJ, 1996. 234f. Tese (Doutorado-Ciência do Solo) – Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1996.
- BALDANI, V.L.D.; DOBERINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.12, n.4, p. 433-439, 1980.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubricans*. **Symbiosis**, Rehovot, v.13, n.1-3, p.65-73, 1992.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole 3-acetic acid and gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.24, n.1, p.7-11, 1998.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L. E. *Azospirillum* - plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, p.521-577, 2004.
- BEVIVINO, A.; SARROCO, S.; DALMASTRINI, C.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, C.; CHIARINI, L. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.27, n.3, p.225-237, 1998.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugar cane: present knowledge and future applications. **Plant and soil**, Dordrecht, v.252, n.1, p.139-149, 2003.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and soil**, Dordrecht, v.137, n.1, p.111-117, 1991.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p. 248-254, 1976.
- BROECK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Review genetics of the *Azospirillum*-plant root association. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v.14, n.5, p.445-466, 1995.
- CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do Solo**. Campinas: SBCS, 1992. 360p.
- CATTELAN, A.J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: EMBRAPA Soja, 1999. 36p.
- CHANWAY, C.P.; HOLL, F.B. Growth of outplanted lodgepole pine seedlings one year after inoculation with growth promoting rhizobacteria. **Forest Science**, Bethesda, v.40, n.2, p.238-246, 1994.
- CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*. Root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.30, n.1, p. 81-87, 1998.
- CHIARINI, L.; NACAMULLI, C.; BEVIVINO, A.; DALMASTRINI, C.; TABACCHIONI, S. Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.23, n.3, p.183-193, 1997.
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Recomendações de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 3.ed. Passo Fundo: SBCS – Núcleo Regional Sul, 1995.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. [Informações] Disponíveis em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 20 jan. 2006.
- DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of “*Pseudomonas*” *huttiensis*, “*Pseudomonas*” *lanceolata*, “*Aquaspirillum*” *dellicatum*, “*Aquaspirillum*” *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.2223-2230, 2004.

- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v.22, n.2, p.107-149, 2003.
- DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economics contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n. 5/6, p. 771-774, 1997.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: Embrapa-SP, 1995. 60p.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; REIS, V.M. Endophytic diazotrophs: the key to BNF in non-leguminous plants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 6., 1993, Ismailia. **Abstracts**. Egypt: NATO Advanced Reserch, 1993. p.52.
- EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility Soils**, Berlin, v.28, n.4, p.377-381, 1999.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de classificação de solos**. Brasília: SPI, 1999.
- ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILIOS- CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide enviromental and geographic distribution. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v.67, n.6, 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, 1992. p.1-42.
- FEPAGRO. **Recomendações técnicas para a cultura de sorgo no Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: FEPAGRO: EMATER-RS: FECOAGRO-RS, 1998 (Boletim técnico, 5).
- FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; RODRIGUES, L.S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.12, p.1509-1517, 2001.

- FERNANDES, V.L.B.; NUNES, L.A.P.; FILHO, M.M.; SOUSA, V.L.; FERNANDES, M. B. Absorção e utilização de nitrogênio em planta de sorgo cultivado em solução nutritiva. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.22, n.1/2, p. 89-96, 1991.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR** – Sistema para análise de variância de dados balanceados): versão 4.6 [S.l.:S.n], 2003.
- FERRI, M. G. **Fisiologia Vegetal**. 2 ed. São Paulo: E.P.U., 1985. 362 p.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.154, n.2, p.145-150, 1993.
- GADAGI, R.S.; KRISHNARAJ, P.U.; KULKARNI, J.H.; AS, T. The effect of combined *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of the blanket flower *Gaillardia pulchella*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 100, p. 323-332, 2004.
- GRAYSTON, S.J.; WANG, S.; CAMPBELL, C.D.; EDWARDS, A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.30, n.3, p.369-378, 1998.
- IM, W.T.; BAE, H.S.; YOKOTA, A.; LEE, S.T. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov.; a chlorophenol-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.851-855, 2004.
- JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.65, n.2/3, p.197-209, 2000.
- JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant and Science**, Philadelphia, v.17, n.1, p.77-119, 1997.
- KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; KECSKÉS, M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil biology and Biochemistry**, Oxford, v.36, n.8, p.1229-1245, 2004.
- KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96, n.3, p.473-480, 2003.



- KIPE-NOLT, J.A.; AVALAKKI, U.K.; DART, P.J. Root exudation of sorghum and utilization of exudates by nitrogen-fixing bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.17, n.6, p.859-863, 1985.
- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, p.157-168, 2001.
- KIRCHHOF, G.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; ECKERT, B.; DÖBEREINER, J.; HARTMANN, A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.194, p. 45-55, 1997.
- KLOEPPER, J.W.; HUME, D.J.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free living bacteria inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v.7, n.2, p.39-44, 1989.
- KOLB, M.; MARTIN, P. Influence of nitrogen on the number of N<sub>2</sub>-fixing and total bacteria in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.20, n.2, p.221-225, 1988.
- LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERELEYDEN, J. Indole 3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, London, v.8, n.7, p.298-300, 2000.
- LEMANCEAU, P.; CORBERAND, T.; GARDAN, L.; LATOUR, X.; LAGUERRE, G.; BOEUFGRAS, J.; ALABOUVETE, C. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) on the diversity of soilborn populations of fluorescent pseudomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.3, p.1004-1012, 1995.
- MAGALHÃES, F.M.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.15, n.4, p.246-252, 1984.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and

*Herbaspirillum* spp. from indian sugar canes varieties. **Biology and Fertility of soil**, Berlin, v.29, n.2, p.157-164, 1999.

NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; LIMA, A.S.; Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.28, p.269-279, 2004.

NOWAK, J. Review benefits of *in vitro* "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In vitro Cellular and Developmental Biology of Plant**. Largo, v.34, n.2, p.122-130, 1998.

OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, New York, v.135, n.4, p.723-737, 1997.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.242, n.2, p.205-215, 2002.

OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Burning cane: the long term effects. **International Sugar Journal**, West Glamorgan, v.97, n.1160, p.384-387, 1995.

PEDRAZA, R.O.; RAMÍREZ-MATA, A.; XIQUI, M.L.; BACA, B.E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.233, p.15-21, 2004.

PINTO-COELHO, R.M. **Fundamentos em ecologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 252p.

RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.10, p.987-994, 2004.

- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v.19, n.3, p.227-247, 2000.
- REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, L.G. da; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.5, p.985-994, 2000.
- ROESCH, L.F.W. **Ocorrência e distribuição de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de milho**. 2003. 78f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.45, n.1, p.39-47, 2003.
- SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A.P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.29, p.345-352, 2005.
- SARIG, S.; BLUM, A.; OKON, Y. Improvement of the water status yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Agricultural Science**, New York, v.110, p.271-277, 1988.
- SEVILLA, M.; BURRIS, R.H.; GUANAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *Nif*<sup>-</sup> mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.14, n.3, p.358-366, 2001.
- SLICE, D.E.; KIM, J.; WALKER, J. **NTSYS** - Numerical taxonomy and multivariate analysis sistem: versão 1.8 [S.l.:S.n.], 1994.
- SONTHAYANON, P.; KRASAO, P.; WUTHIEKANUN, V.; PANYM, S.; TUNGPRADABKUL, S. A simple method to detect and differentiate *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* using specific flagellin gene primers. **Molecular and Cellular Probes**, Londres, v.16, n.3, p.217-222, 2002.

- SOBRAL, J.K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-plantas**. Piracicaba: ESALQ, 2003. 174f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.24, p.487-506, 2000.
- STEIN, T.; HAYEN-SCHNEG, N.; FENDRIK, I. Contribution of BNF by *Azoarcus* sp. BH72 in *Sorghum vulgare*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5/6, p.969-971, 1997.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2ed. Porto Alegre: Depto. de Solos da UFRGS, 1995. 174p.
- TILAK, K.V.B.R.; SINGH, C.S.; ROY, N.K.; SUBA RAO, N.S. *Azospirillum brasiliense* and *Azotobacter chroococcum* inoculum: effect on yield of maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.14, n.4, p.417-418, 1981.
- YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMIDE, G.; BRUIJN, F.D.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHIMIDT, T.M.; MATEOS, P.F.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Natural endophytic associations between *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.194, p.99-114, 1997.
- VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J.M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.53, p.1979-1983, 2003.

## 7. APÊNDICES

**7.1 Apêndice 1.** Condições meteorológicas no período experimental e comparação ao clima regional. Eldorado do Sul, 2004/05. (Fontes dos dados: Depart. Plantas Forrageiras e Agrometeorologia/UFRGS, 2004 e 2005, Boletim Agrometeorológico da EEA/UFRGS, não publicado; Bergamaschi et al., 2003).

I. Condições pluviométricas: totais decendiais de precipitação pluvial e evapotranspiração de referência (método de Penman).

Mês	Decêndio	Precipitação pluvial (mm)			Evapotranspiração (mm)		
		Ocorrida	Normal	Desvio	Ocorrida	Normal	Desvio
Set/04	1	59,1	33,9	25,2	20,5	27,0	-6,5
	2	105,9	53,8	52,1	18,4	27,0	-8,6
	3	41,1	38,3	2,8	19,7	29,0	-9,3
Out/04	1	1,7	31,2	-29,5	37,1	35,0	2,1
	2	87,0	41,7	45,3	35,1	38,0	-2,9
	3	17,3	44,9	-27,6	45,9	46,0	-0,1
Nov/04	1	60,7	45,3	15,4	33,1	42,0	-8,9
	2	16,7	33,2	-16,5	35,2	46,0	-10,8
	3	5,8	21,7	-15,9	43,8	48,0	-4,2
Dez/04	1	43,0	40,7	2,3	42,8	49,0	-6,2
	2	6,1	36,3	-30,2	48,3	50,0	-1,7
	3	0,0	32,6	-32,6	54,5	59,0	-4,5
Jan/05	1	10,9	34,2	-23,3	53,2	51,0	2,2
	2	16,4	39,3	-22,9	59,3	50,0	9,3
	3	2,9	37,6	-34,7	62,3	53,0	9,3
Fev/05	1	8,7	43,1	-34,4	45,3	45,0	0,3
	2	43,3	37,2	6,1	45,1	43,0	2,1
	3	21,5	30,6	-9,1	36,4	31,0	5,4
Mar/05	1	0,0	40,0	-40,0	45,3	41,0	4,3
	2	70,6	23,6	47,0	31,6	39,0	-7,4
	3	74,7	43,1	31,6	29,8	40,0	-10,2
Abr/05	1	47,4	29,1	18,3	24,5	31,0	-6,5
	2	36,9	43,1	-6,2	21,8	27,0	-5,2
	3	0,2	29,6	-29,4	22,4	26,0	-3,6

II: Condições térmicas: médias decendiais das temperaturas máximas e mínimas.

Mês	Decêndio	Temper. máxima do ar (°C)			Temper. mínima do ar (°C)		
		Ocorrida	Normal	Desvio	Ocorrida	Normal	Desvio
Set/04	1	25,4	20,7	4,7	13,1	9,7	3,4
	2	21,4	21,3	0,1	11,3	11,8	-0,5
	3	20,3	22,1	-1,8	12,1	12,7	-0,6
Out/04	1	24,1	22,6	1,5	9,2	13,4	-4,2
	2	24,4	24,0	0,4	12,4	13,5	-1,1
	3	25,2	25,3	-0,1	10,6	14,5	-3,9
Nov/04	1	25,4	25,4	0,0	13,8	15,2	-1,4
	2	24,5	27,0	-2,5	13,7	15,5	-1,8
	3	25,9	27,4	-1,5	14,0	15,4	-1,4
Dez/04	1	28,2	28,4	-0,2	18,3	17,1	1,2
	2	29,3	29,2	0,1	15,3	18,0	-2,7
	3	29,3	29,5	-0,2	15,5	18,6	-3,1
Jan/05	1	32,9	29,7	3,2	20,4	18,6	1,8
	2	31,3	30,1	1,2	17,1	19,3	-2,2
	3	32,1	30,3	1,8	16,1	19,8	-3,7
Fev/05	1	29,8	29,9	-0,1	17,8	19,3	-1,5
	2	30,0	29,7	0,3	19,6	20,0	-0,4
	3	31,6	29,2	2,4	19,5	18,7	0,8
Mar/05	1	29,3	29,5	-0,2	16,3	19,1	-2,8
	2	29,5	28,9	0,6	17,9	18,1	-0,2
	3	27,5	27,5	0,0	17,0	17,0	0,0
Abr/05	1	26,7	26,2	0,5	16,3	15,2	1,1
	2	24,6	25,0	-0,4	15,6	14,5	1,1
	3	22,4	24,4	-2,0	10,1	13,8	-3,7

## 7.2 Apêndice 2: Meios de cultura e soluções utilizadas

### Meio de cultura NFb (Döbereiner et al., 1995)

5,0 g L <sup>-1</sup>	Ácido málico
0,5 g L <sup>-1</sup>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,2 g L <sup>-1</sup>	Mg SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O
0,1 g L <sup>-1</sup>	NaCl
0,02 g L <sup>-1</sup>	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O
2 mL	Solução de micronutrientes
2 mL	Azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)
4 mL	FeEDTA (solução 1,64%)
1 mL	Solução de vitaminas
4,5 g L <sup>-1</sup>	KOH
pH	6,5 - 6,8

### Meio de cultura JNFb (Döbereiner et al., 1995)

5,0 g L <sup>-1</sup>	Ácido málico
0,6 g L <sup>-1</sup>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,8 g L <sup>-1</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,2 g L <sup>-1</sup>	Mg SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O
0,1 g L <sup>-1</sup>	NaCl
0,002 g L <sup>-1</sup>	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O
2 mL	Solução de micronutrientes
2 mL	Azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)
4 mL	FeEDTA (solução 1,64%)
1 mL	Solução de vitaminas
4,5 g L <sup>-1</sup>	KOH
pH	5,8

## Meio de cultura LGI-P (Döbereiner et al., 1995)

100 g L <sup>-1</sup>	Sacarose
0,2 g L <sup>-1</sup>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,6 g L <sup>-1</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,2 g L <sup>-1</sup>	Mg SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O
0,002 g L <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O
0,02 g L <sup>-1</sup>	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O
5 mL	Azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)
0,01 g L <sup>-1</sup>	FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O
pH	5,5

## Meio de cultura JMV (Baldani, 1996)

5,0 g L <sup>-1</sup>	Manitol
0,6 g L <sup>-1</sup>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,8 g L <sup>-1</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,2 g L <sup>-1</sup>	Mg SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O
0,1 g L <sup>-1</sup>	NaCl
0,02 g L <sup>-1</sup>	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O
2 mL	Solução de micronutrientes
2 mL	Azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)
4 mL	FeEDTA (solução 1,64%)
1 mL	Solução de vitaminas
pH	4,2 – 4,5

## Meio de cultura Batata (Baldani &amp; Döbereiner, 1980)

200 g L <sup>-1</sup>	Batata
2,5 g L <sup>-1</sup>	Ácido málico
2,5 g L <sup>-1</sup>	Sacarose
2 mL	Solução de micronutrientes
1 mL	Solução de vitaminas



pH 6,5 – 7,0

Meio de cultura Batata-P (Baldani & Döbereiner, 1980)

200 g L<sup>-1</sup> Batata

100 g L<sup>-1</sup> Sacarose

2 mL Solução de micronutrientes

1 mL Solução de vitaminas

pH 6,5 – 7,0

Solução de micronutrientes

0,04 g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>2</sub>. 5H<sub>2</sub>O

1,20 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O

1,40 g L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

1,00 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O

1,175 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O

Solução de vitaminas (Döbereiner et al., 1995)

10 mg 100 mL<sup>-1</sup> Biotina

20 mg Pirridoxol – HCl

Meio Dygs

2 g L<sup>-1</sup> Glicose

2 g L<sup>-1</sup> Ácido málico

1,5 g L<sup>-1</sup> Peptona bacteriológica

2 g L<sup>-1</sup> Extrato de levedura

0,5 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,5 g L<sup>-1</sup> Mg SO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O

1,5 g L<sup>-1</sup> Ácido glutâmico

pH 6,5 6,5

Solução para preservação de isolados a  $-18^{\circ}\text{C}$

10 g Leite em pó

10 mL Glicerol

90 mL Água

Solução salina para diluição (Döbereiner et al., 1995)

3,4 g L<sup>-1</sup>      KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,2 g L<sup>-1</sup>      MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O

0,1 g L<sup>-1</sup>      NaCl

0,02 g L<sup>-1</sup>     CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O

2 mL            Solução de micronutrientes

4 mL            FeEDTA (solução 1,64%)

4,5 g L<sup>-1</sup>      KOH

pH              7,0

Corante Coomassie-Blue (Bradford, 1976)

100 mg L<sup>-1</sup>    Coomassie

50 mL        Etanol

100 mL      Ácido fosfórico

## **8. VITA**

Clarissa Bergamaschi, filha de Homero Bergamaschi e Ivanilde Poletto Bergamaschi, nasceu no dia 24 de fevereiro de 1980 em Porto Alegre-RS.

Estudou nos colégios Santa Inês, onde completou o ensino fundamental, João Paulo I e Mauá, onde completou o ensino médio. Em 1998 ingressou na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, onde foi graduada em Ciências Biológicas em 2003.

Em 2004 iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.