

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR

Caracterização e seleção de estirpes de bactérias promotoras de
crescimento vegetal, visando à formulação de um inoculante biológico para
a cultura de sorgo

ANDRESS PACHECO PONTES

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Genética e Biologia Molecular.

Orientação: Profa. Dra. Luciane M. P. Passaglia

Co-orientação: Dra. Adriana Ambrosini

Porto Alegre, abril de 2019

Este trabalho foi realizado no Núcleo de Microbiologia Agrícola do Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo INCT da Fixação Biológica do Nitrogênio.

Eu aprendi que todos querem viver no topo da montanha, mas toda a felicidade e crescimento ocorrem quando você está escalando-a. (William Shakespeare)

Agradecimentos

À Prof. Dra. Luciane Passaglia, pela excelente orientação, apoio, ideias e paciência (interminável).

À Dra. Adriana Ambrosini pelas ideias e discussões ao longo desse trabalho.

A todos os colegas de laboratório, pela amizade, pelas conversas motivadoras, pelos momentos divertidos.

À Fepagro, pelo suporte em análises e experimentos.

A todos os amigos que de uma forma ou de outra estiveram presentes ao longo desse período conturbado.

Ao PPGBM e CNPq/INCT, pelo apoio financeiro e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao meu pai, pelos inúmeros conselhos e palavras sábias, pelo carinho de pai e pela educação que me deu, além de tudo que me proveu.

À minha mãe, pelo carinho de mãe e pelo apoio incondicional.

Ao meu parceiro de vida, Luís Henrique, pelo apoio, pelo colo e por ser o cara que mais me ajuda a me levantar quando parece que deu tudo errado.

Resumo

O sorgo (*Sorghum bicolor*) está entre os cinco cereais mais cultivados no mundo, sendo utilizado atualmente para a alimentação de animais e humanos e na produção de etanol. Com o objetivo de aumentar a produtividade das culturas sem causar danos ao meio ambiente, buscaram-se alternativas ao uso de fertilizantes químicos. Uma dessas alternativas pode ser o uso de Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (ou *Plant growth promoting bacteria*, PGPB), um grupo benéfico de micro-organismos encontrados na rizosfera, na superfície radicular ou em associação com as raízes. Neste estudo, foram isoladas e caracterizadas PGPBs associadas à cultura de sorgo com aptidão para uso na formulação de inoculantes agrícolas e seu efeito em promover o crescimento por meio de diferentes mecanismos foi testado. As linhagens bacterianas foram obtidas de amostras de solo rizosférico e raízes de plantas de sorgo coletadas em três locais de produção no Estado do Rio Grande do Sul. Os isolados foram identificados através da extração de DNA e amplificação parcial do gene 16S rRNA e avaliados por testes *in vitro* de solubilização de fosfato de cálcio, produção de sideróforos e compostos indólicos e formação de biofilme. Entre os 175 isolados bacterianos Gram negativos obtidos, a identificação revelou a ocorrência de 20 gêneros nas raízes e no solo rizosférico de sorgo, com predomínio dos gêneros *Burkholderia* e *Klebsiella*. Posteriormente, o isolamento foi direcionado para bactérias Gram positivas e um total de 123 isolados foram obtidos. Dentre todos os 298 isolados bacterianos obtidos, os três mais promissores tiveram sua identidade confirmada por sequenciamento do fragmento completo do gene 16S rRNA e foram utilizados em experimento em câmara de crescimento com plantas de sorgo. Esses isolados foram multiplicados em meio de cultura com e sem a adição de triptofano, uma vez que este composto estimula a produção de fitohormônios pela bactéria. A linhagem *Rhizobium miluonense* (VIA07) destacou-se entre as demais por ter proporcionado às plantas um maior crescimento em relação ao comprimento e peso seco da parte aérea, tanto no experimento realizado em substrato estéril (vermiculita e areia), quanto em solo, sendo que as bactérias multiplicadas na ausência de triptofano apresentaram os melhores resultados. Esse trabalho demonstrou que existem bactérias que são capazes de interagir de maneira positiva com plantas de sorgo e promoverem seu crescimento. Testes em campo poderão comprovar a eficiência desse isolado e sua utilização como inoculante para essa cultura, posteriormente.

Abstract

Sorghum (*Sorghum bicolor*) is among the five most cultivated cereals in the world, currently being used for animal and human food and for ethanol production. In order to increase the productivity of crops without causing damage to the environment, alternatives to the use of chemical fertilizers are sought. One of these alternatives may be the use of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), a beneficial group of microorganisms found in the rhizosphere, on the root surface or in association with the roots. In this study, PGPBs associated with sorghum culture with suitability for use in the formulation of agricultural inoculants were isolated and characterized, and their effect on promoting growth through different mechanisms was tested. The bacterial strains were obtained from samples of rhizospheric soil and roots of sorghum plants collected at three production sites in the State of Rio Grande do Sul. Isolates were identified through DNA extraction and partial amplification of the 16S rRNA gene and evaluated by tests in vitro calcium phosphate solubilization, production of siderophores and indolic compounds and biofilm formation. Among the 175 Gram negative bacterial isolates obtained, the identification revealed the occurrence of 20 genera in the roots and sorghum rhizospheric soil, with *Burkholderia* and *Klebsiella* genera predominating. Subsequently, the isolation was directed to Gram positive bacteria and a total of 123 isolates were obtained. Of the 298 bacterial isolates obtained, the three most promising had their identity confirmed by sequencing the complete fragment of the 16S rRNA gene and were used in a growth chamber experiment with sorghum plants. These isolates were multiplied in culture medium with and without the addition of tryptophan, since this compound stimulates the phytohormones production by the bacterium. The *Rhizobium miluonense* line (VIA07) stood out among the others because it gave the plants a greater growth in relation to the length and dry weight of the aerial part, both in the experiment carried out in sterile substrate (vermiculite and sand), as well as in soil. And the bacteria multiplied in the absence of tryptophan presented the best results. This work demonstrated that there are bacteria that are capable of interacting positively with sorghum plants and promote their growth. Field tests may prove the efficiency of this isolate and its use as an inoculant for this crop, later.

Sumário

1. Introdução Geral	8
1.1. Importância econômica do sorgo	8
1.2. Bactérias promotoras do crescimento vegetal	10
1.3. Importância do ácido indol-acético para o crescimento vegetal	13
1.4. Inoculantes à base de PGPB e a importância das formulações	14
2. Objetivos	16
3. Manuscrito em preparação	17
4. Considerações finais e perspectivas.....	49
5. Referências bibliográficas	50

1. Introdução Geral

1.1. Importância econômica do sorgo

O sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench, Figura 1) é uma gramínea originária do continente africano. Entre as espécies alimentares é uma das mais versáteis e mais eficientes, tanto do ponto de vista fotossintético, como em velocidade de maturação. Sua reconhecida versatilidade se estende desde o uso de seus grãos como alimento humano e animal (principalmente para ruminantes), matéria prima para a produção de álcool anidro, bebidas alcoólicas, colas e tintas. Além disso, há o uso de suas panículas para produção de vassoura e do colmo para a extração de açúcar (Embrapa Milho e Sorgo 2015).



Figura 1: Lavoura de sorgo. Fonte: John Deere

Em termos globais, o sorgo é a base alimentar de cerca de 500 milhões de pessoas em mais de 30 países. Somente arroz, trigo, milho e batata o superam em termos de quantidade de alimento consumido. O Rio Grande do Sul é um estado produtor e consumidor de sorgo, mas não detém a liderança na produção, como ocorrido até os anos 90. Atualmente, o Centro Oeste é a região brasileira de maior destaque na produção de sorgo, conforme demonstrado na Figura 2 (Embrapa Milho e Sorgo 2015).

REGIÃO/UF	ÁREA (Em mil ha)			PRODUTIVIDADE (Em kg/ha)			PRODUÇÃO (Em mil t)		
	Safra 15/16	Safra 16/17	VAR %	Safra 15/16	Safra 16/17	VAR. %	Safra 15/16	Safra 16/17	VAR %
	(a)	(b)	(b/a)	(c)	(d)	(d/c)	(e)	(f)	(f/e)
NORTE	25,1	17,6	(29,9)	1.687	1.902	12,7	42,3	33,5	(20,8)
TO	25,1	17,6	(29,8)	1.687	1.902	12,7	42,3	33,5	(20,8)
NORDESTE	97,1	114,2	17,6	942	1.073	13,9	91,4	122,6	34,1
PI	2,8	7,3	162,3	45	1.637	3.537,8	0,1	12,0	11.900,0
CE	0,7	0,7	-	1.346	1.915	42,3	0,9	1,3	44,4
RN	0,4	1,3	225,0	1.224	1.344	9,8	0,5	1,7	240,0
PB	0,3	1,3	332,0	800	1.200	50,0	0,2	1,6	700,0
PE	4,5	5,1	13,3	167	155	(7,2)	0,8	0,8	-
BA	88,4	98,5	11,4	1.006	1.068	6,2	88,9	105,2	18,3
CENTRO-OESTE	262,8	285,3	8,6	1.836	3.350	82,4	482,6	955,8	98,1
MT	49,0	37,6	(23,3)	1.915	2.312	20,7	93,8	86,9	(7,4)
MS	9,5	7,7	(18,9)	3.390	3.300	(2,7)	32,2	25,4	(21,1)
GO	201,0	235,0	16,9	1.700	3.500	105,9	341,7	822,5	140,7
DF	3,3	5,0	51,5	4.500	4.200	(6,7)	14,9	21,0	40,9
SUDESTE	185,0	185,6	0,3	2.102	3.021	43,7	388,8	560,7	44,2
MG	172,6	175,0	1,4	2.018	3.000	48,7	348,3	525,0	50,7
SP	12,4	10,6	(14,4)	3.266	3.368	3,1	40,5	35,7	(11,9)
SUL	9,0	9,0	-	2.929	3.000	2,4	26,4	27,0	2,3
RS	9,0	9,0	-	2.929	3.000	2,4	26,4	27,0	2,3
NORTE/NORDESTE	122,2	131,8	7,9	1.095	1.184	8,1	133,7	156,1	16,8
CENTRO-SUL	456,8	479,9	5,1	1.965	3.216	63,7	897,8	1.543,5	71,9
BRASIL	579,0	611,7	5,6	1.782	2.778	55,9	1.031,5	1.699,6	64,8

Figura 2: Dados econômicos da produção de sorgo nas diferentes regiões brasileiras. Fonte: Conab, 2017

Na comparação dos índices de produtividade, o Brasil encontra-se atrás de países como Argentina, China e Estados Unidos, porém, ainda se mantém acima da média mundial. No Brasil, a produtividade agrícola de sorgo aumentou de 2.191 kg/ha em 2006/07 para aproximadamente 3.000 kg nos últimos anos. As oscilações ou quedas dos índices de produtividade no Brasil podem estar relacionadas à existência de extensas áreas com uso de baixa tecnologia e fatores edafoclimáticos desfavoráveis (Embrapa Milho e Sorgo 2015).

O sorgo pode ser classificado, conforme suas diferentes finalidades, em quatro grupos: granífero, que possui porte mais baixo; sacarino, que possui porte mais alto e é utilizado para silagem ou produção de açúcar e etanol; forrageiro, para pastejo de gado; e vassoura, que é utilizado na produção de vassouras (Diniz 2010). Dos quatro grupos, o sorgo granífero é o que tem maior expressão econômica (Embrapa Milho e Sorgo 2015). Na última década, a área plantada com sorgo granífero tem oscilado entre 700 e 850 mil hectares. Entre 1976/77 e 2003/04, a área passou de 177 mil hectares para 898 mil hectares de cultivo. O recorde ocorreu na safra de 2003/2004, com 898 mil hectares (Conab 2014).

Um dos tipos de sorgo, o sorgo sacarino, tem ganhado espaço diante da atual crise energética e da preocupação com as emissões de gases de efeito estufa (Figueiredo *et al.* 2013). Além da cana-de-açúcar, o sorgo sacarino também pode ser empregado na

produção de etanol, representando uma ótima opção agronômica e industrial. O sorgo sacarino possui ciclo curto (quatro meses), sua produção pode ser totalmente mecanizada, os açúcares do seu colmo são diretamente fermentáveis e o bagaço pode ser utilizado como fonte de energia ou como forragem para alimentação de animais (Silva *et al.* 2012).

Atualmente, o sorgo sacarino é uma das espécies mais promissoras para o incremento da produção de etanol no Brasil. Entretanto, o caldo de sorgo sacarino possui uma composição de açúcares diferente do caldo formado a partir da cana-de-açúcar, com mais glicose e menos sacarose, e teor de amido até 0,5%, o que o torna menos apto à produção de açúcar cristal e, também, menos propenso à ação dos micro-organismos durante a fermentação. Ainda assim, possui um grande potencial para complementar a produção de etanol oriunda da cana-de-açúcar (Silva *et al.* 2012).

1.2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal

As plantas estabelecem diversas relações com os organismos do solo e o balanço dessas interações resulta no aumento ou redução de *fitness*. A interação entre os micro-organismos e as plantas é estimulada pela troca de sinais moleculares na rizosfera – região de solo aderido às raízes vegetais com importância fundamental para a captação de água e nutrientes pelos micro-organismos (Alami *et al.* 2000). As plantas liberam entre 40 e 60% do carbono fixado por fotossíntese para as raízes e para os micro-organismos associados, através de mucilagens, compostos orgânicos e células radiculares (Keiluweit *et al.* 2015).

Os exsudatos liberados pelas raízes vegetais são uma rica fonte de energia para a microbiota, o que resulta em uma maior população de micro-organismos ao redor das raízes do que em outras porções de solo (Gray e Smith 2005). As bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB – *Plant Growth Promoting Bacteria*) formam um grupo benéfico e heterogêneo de micro-organismos que podem ser encontrados na rizosfera, na superfície das raízes ou em associação com as mesmas (Souza *et al.* 2015).

Alguns mecanismos bacterianos já são bastante conhecidos pela capacidade de favorecer o crescimento vegetal ou a defesa contra patógenos (Figura 3). A solubilização de nutrientes e a produção de reguladores de crescimento vegetal (fitohormônios) estão entre os exemplos clássicos do potencial das bactérias como fertilizantes naturais. Nutrientes essenciais, como o nitrogênio e o fósforo, podem ser disponibilizados por meio da fixação biológica do nitrogênio atmosférico e da

solubilização de fosfatos, por exemplo (Estrada *et al.* 2013; Hungria *et al.* 2013; Chen *et al.* 2014). A produção de sideróforos tem sido associada à maior disponibilidade de ferro e à proteção contra patógenos (Dimkpa *et al.* 2009; Loaces *et al.* 2011). A capacidade de produzir fito-hormônios pelas PGPBs também possui uma grande importância devido à influência dessas moléculas sobre o metabolismo das plantas (Spaepen *et al.* 2007; Jaillais e Chory 2010).

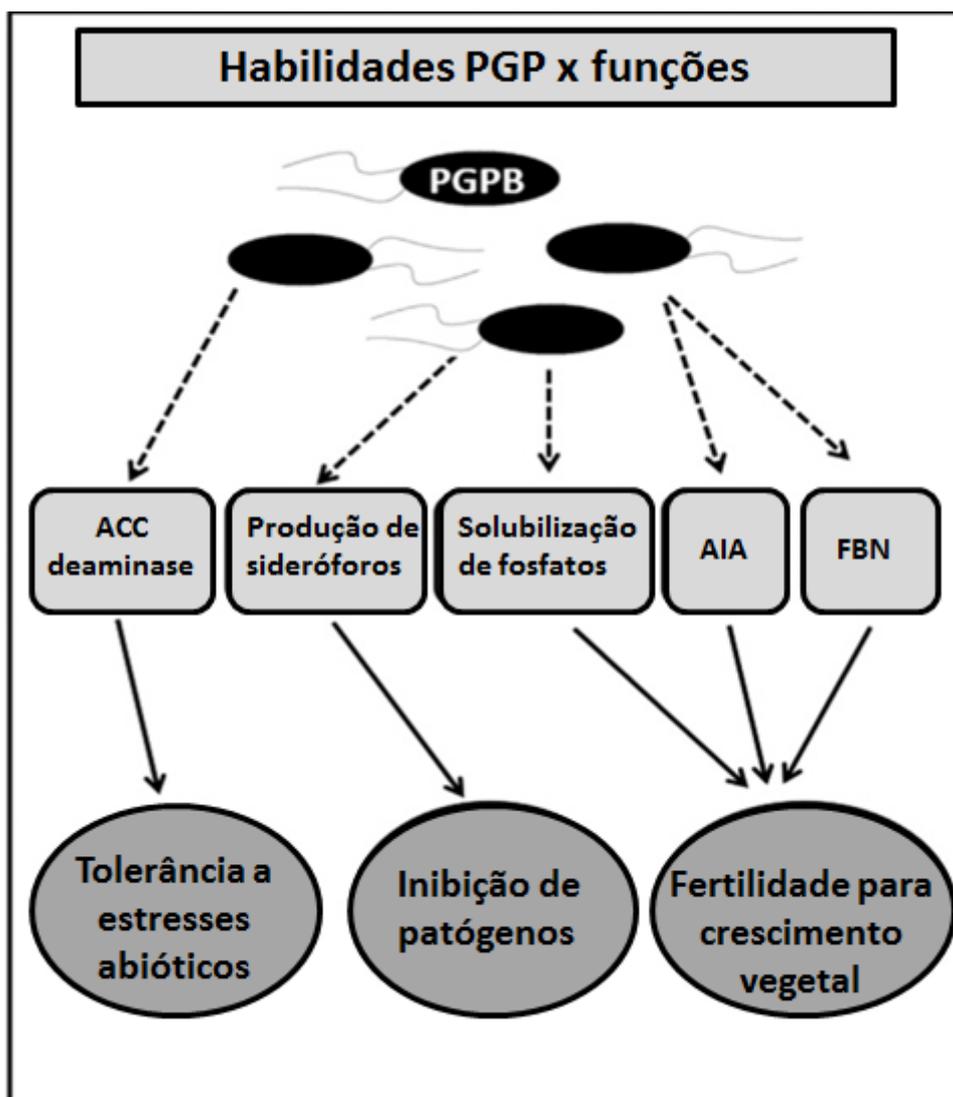


Figura 3: Habilidades das PGPB para promoção de crescimento e suas respectivas funções. Abreviaturas: PGP: *plant-growth promoting*, AIA: ácido indol-acético, FBN: fixação biológica de nitrogênio. Fonte: Souza *et al* 2015 (adaptado).

A presença de um ou mais processos benéficos tem sido considerada uma ferramenta importante na seleção de “boas” PGPB. Entretanto, os efeitos positivos são dependentes de uma complexa rede de interações biológicas e ambientais. As

características físico-químicas do solo, as diferentes variedades vegetais e as outras populações de organismos influenciam grandemente o tipo e intensidade do efeito sobre as plantas (Souza *et al.* 2015).

Acredita-se que, além de promover o crescimento das plantas, as PGPB devem ser eficientes em colonizar o solo ou a superfície das raízes, sobrevivendo e se multiplicando com eficiência frente à competição com outros componentes da microbiota. Nesse contexto, estima-se que a produção de biofilme seja um mecanismo importante para a proteção contra danos ou estresses ambientais. A sobrevivência e a capacidade de competição das bactérias inoculadas são essenciais, sobretudo, até o momento da colonização das raízes ou o adequado estabelecimento das bactérias na rizosfera (Haggag e Timmusk 2008). As bactérias que habitam a rizosfera, entre elas as PGPB, são frequentemente encontradas formando micro-colônias ou estruturas semelhantes a biofilmes nas raízes das plantas (Morris e Monier 2003, Figura 4).

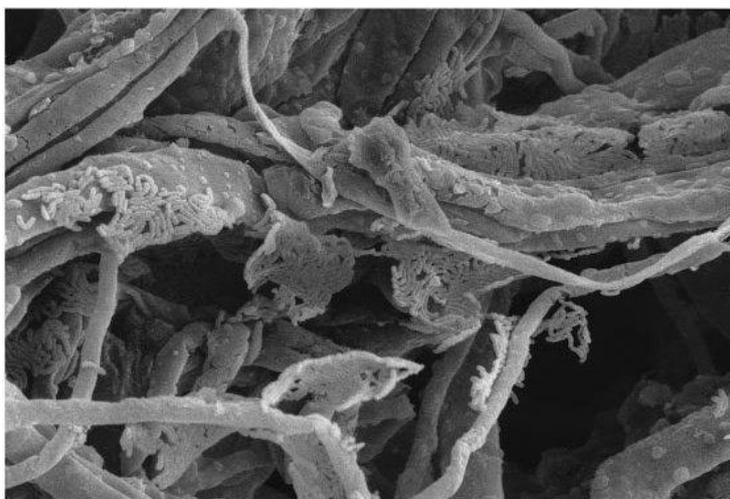


Figura 4. Colônias bacterianas formando biofilmes em raízes de plantas (Fonte: Nurmiäho-Lassila *et al.* 1997).

Os biofilmes são conjuntos de colônias microbianas concentradas em uma interface e cercadas por substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos próprios micro-organismos (Hall-Stoodley *et al.* 2004). De modo geral, os biofilmes microbianos possuem algumas funções conhecidas, sendo elas: a proteção das bactérias contra substâncias antimicrobianas e estresses ambientais, ação de mediador na disponibilidade de nutrientes e controle de substâncias tóxicas, entre outros processos (Rafique *et al.* 2015).

A composição do biofilme pode variar, mas, de modo geral, ele é composto de água, células bacterianas e uma matriz extracelular composta, principalmente, por exopolissacarídeos (EPS). Essa matriz celular pode representar até 90% da composição do biofilme, que, além de EPS, pode conter pequenas quantidades de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (Sutherland 2001). Esses polímeros são responsáveis pela imobilização das bactérias na matriz, estabilidade mecânica do biofilme, coesão com a interface onde o biofilme se localiza e funcionalidade da comunidade bacteriana envolvida (Flemming e Wingender 2010).

1.3. Importância do ácido indol-acético para o crescimento vegetal

Dentre as diferentes classes de hormônios vegetais existentes, as auxinas determinam aspectos dentre os mais básicos no crescimento das plantas (Morshed *et al.* 2006) e são conhecidas por induzirem respostas rápidas e prolongadas nas plantas (Scarcella *et al.* 2017). Atualmente, algumas auxinas podem ser produzidas sinteticamente e utilizadas para controlar o crescimento de plantas, como é o caso do ácido 2,4 diclorofenoxiacético, que age como inibidor do alongamento radicular e é utilizado como um potente herbicida (Simon e Petrásek 2011).

O ácido indol-acético é o principal exemplo de auxina natural, com diversas funções no desenvolvimento das plantas (Ludwig-Muller e Epstein, 1991; Teale *et al.* 2006). Ele não apenas é produzido por plantas, mas também por alguns micro-organismos, tais como bactérias e fungos (Reineke *et al.* 2008). Em bactérias, é produzido juntamente com outros compostos indólicos e é um regulador de crescimento bastante explorado entre as PGPB (Santner e Estelle 2009; Contesto *et al.* 2010).

Entretanto, algumas bactérias produzem auxinas com propósitos que são nocivos para as plantas, seja provocando um distúrbio no balanço hormonal destas ou pela formação de tumores e galhas nas mesmas (Jameson 2000).

O ácido indol-acético pode ser produzido em diferentes rotas metabólicas a partir do aminoácido triptofano. Este é convertido em Indol-3-acetamida (IAM) por intermédio da enzima Triptofano-2-monooxigenase e, posteriormente, convertido a ácido indol-acético por intermédio da enzima IAM-hidrolase (Figura 5). As rotas que utilizam triptofano são conhecidas como “dependentes de triptofano” (trp-dependentes) e também há rotas que não necessitam da presença de triptofano, conhecidas como “independentes de triptofano” (trp-independentes). Ambas podem ocorrer tanto em

plantas quanto em bactérias, podendo ser encontrados os dois tipos em uma mesma bactéria (Patten e Glick 2002).

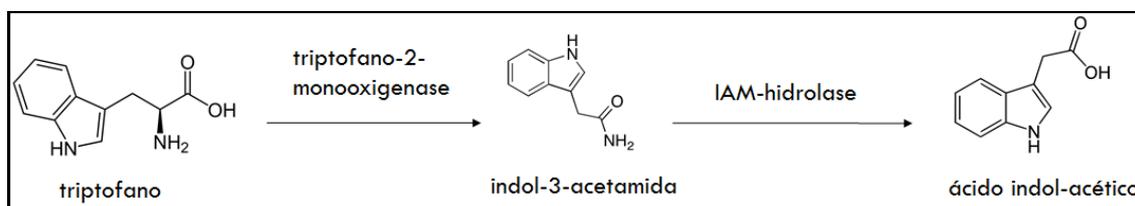


Figura 5: Rota de produção de ácido indol acético (Trp dependente).

A importância do ácido indol-acético se deve, essencialmente, ao estímulo radicular, favorecendo a proliferação de raízes adventícias para maior captação de água e nutrientes. Entretanto, as bactérias do solo são capazes de produzir diversos outros hormônios vegetais, como ácido abscísico, ácido salicílico, jasmonato, citocinina, giberelina e etileno. A complexa e intrincada regulação hormonal faz com que pequenas variações na quantidade de hormônios influenciem negativa ou positivamente o crescimento e desenvolvimento das plantas (Santner e Estelle 2009; Contesto *et al.* 2010).

O ácido indol-acético pode, ainda, agir como indutor do alongamento celular através, por exemplo, do aumento do conteúdo osmótico nas células e da diminuição da pressão sobre a parede celular. Também pode ser responsável pela inibição ou atraso da abscisão das folhas e indução do florescimento e frutificação (Zhao 2010).

1.4. Inoculantes à base de PGPB e a importância das formulações

Inoculantes microbianos – ou biofertilizantes – são produtos biológicos que contêm micro-organismos vivos. Um inoculante microbiano pode ser definido como o produto final de uma formulação contendo um transportador e um agente bacteriano ou um consórcio de micro-organismos (Bashan *et al.* 2014). Os carreadores são substratos abióticos (sólido, líquido ou gel) usados em processos laboratoriais ou industriais de preparo de formulações, as quais contêm micro-organismos encapsulados, em meio líquido, orgânico, inorgânico ou polimérico (Bashan *et al.* 2014). De forma sucinta, podemos considerar que um “bom” inoculante deverá conter não apenas os micro-organismos benéficos, mas, também, as condições apropriadas para a sobrevivência deles no produto final, o que se refere ao chamado “tempo de prateleira”. Sobretudo,

para cumprir sua finalidade, a bactéria inoculada deve estar protegida em uma formulação que favoreça sua proliferação na rizosfera (Jayaraman *et al.* 2014).

O uso de inoculantes na agricultura, além de evitar a contaminação da água pelo nitrato proveniente da adubação nitrogenada, pode contribuir para uma menor emissão de gases de efeito estufa, representando, na cultura da cana-de-açúcar, por exemplo, uma economia de pelo menos 30 kg de nitrogênio ao ano por hectare. Além dos ganhos ambientais, o uso de inoculantes torna-se adequado para sistemas de produção em que a legislação não permite o uso de agroquímicos, como em sistemas orgânicos (Bashan *et al.* 2014; MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, <http://www.agricultura.gov.br/>).

As formulações líquidas e a inoculação de sementes representam a forma habitual de produção e aplicação, uma vez que seus materiais são de baixo custo (em relação à turfa, por exemplo) e, portanto, mais acessíveis aos pequenos agricultores (Albareda *et al.* 2008). Entretanto, as taxas de sobrevivência dos micro-organismos nesse tipo de formulação são menores devido à ausência de condições protetivas, inclusive, contra contaminação durante o armazenamento, transporte e aplicação (Bashan *et al.* 2002). Recentemente, bactérias produtoras de biofilmes têm sido consideradas importantes candidatas à formulação de inoculantes para plantas (Seneviratne *et al.* 2008), uma vez que o próprio biofilme pode atuar como um carreador (Malusá *et al.* 2012).

A soja é uma das culturas que tradicionalmente mais recebe aporte de nutrientes provenientes de inoculantes agrícolas. Para esta cultura são normalmente utilizadas estirpes de *Bradyrhizobium*, que auxiliam na fixação de nitrogênio atmosférico (Conley e Christmas, 2015). Para o trigo, têm sido testados inoculantes contendo estirpes de *Paraburkholderia tropica* (Bernabeu *et al.* 2018) e, tanto para o trigo quanto para outras gramíneas cultivadas, como o milho e a cana-de-açúcar, são utilizados inoculantes contendo estirpes de *Azospirillum brasilense* (Reis *et al.* 2009; Morais *et al.* 2016; Vogel *et al.* 2013).

Com base nas informações apresentadas, sabendo que a cultura de sorgo carece de tecnologias que aumentem seu rendimento, se torna interessante estudar alternativas viáveis e que não aumentem os danos ambientais causados pelo excesso do uso de fertilizantes químicos. Os benefícios das PGPB são bem conhecidos e estabelecidos para diversas culturas agrícolas, porém pouco se sabe sobre as PGPB que se associam com a cultura do sorgo.

2. Objetivos

Objetivo geral

Caracterização e seleção de linhagens bacterianas isoladas da rizosfera e raízes de sorgo que tenham potencial para a promoção de crescimento de plantas e para a utilização na formulação de inoculantes biológicos, visando o aumento da produtividade e a redução do uso de adubação química nessa cultura.

Objetivos específicos

- Isolamento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas do solo rizosférico e raízes de sorgo cultivado em diferentes localidades do Estado do Rio Grande do Sul;
- Identificação das linhagens isoladas por meio de PCR e sequenciamento do gene 16S rRNA;
- Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, produção de sideróforos, produção de reguladores de crescimento vegetal (compostos indólicos) e formação de biofilme entre os diferentes isolados bacterianos;
- Seleção de linhagens com diferentes características benéficas para experimentos de inoculação de sorgo em câmara de crescimento;
- Determinação do ponto de maior produção de ácido indol-acético pelas bactérias selecionadas, através do acompanhamento por curvas de crescimento na presença e ausência de triptofano;
- Avaliação do efeito da produção de ácido indol-acético pelas bactérias selecionadas no crescimento de plantas de sorgo.

3. Manuscrito em preparação para ser submetido à revista *Applied Soil Ecology*

Caracterização e seleção de estirpes de bactérias promotoras de crescimento vegetal, visando à formulação de um inoculante biológico para a cultura de sorgo

Pontes¹, A., Ambrosini, A.¹, Lisboa, B.², Dalmolin, D.³, Passaglia, L.M.P¹

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 9500, Bento Gonçalves Ave., Porto Alegre, 91501-970, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Departamento de Agricultura Pesquisa e Diagnóstico, Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul, 570, Rua Gonçalves Dias, Porto Alegre, 90130-060, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 9500, Bento Gonçalves Ave., Porto Alegre, 91501-970, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Autor correspondente: E-mail: luciane.passaglia@ufrgs.br

Abstract

Sorghum (*Sorghum bicolor*) is among the five most cultivated cereals in the world. This crop is currently used for animal and human food and ethanol production. In order to increase crop productivity without causing environmental damage, alternatives to the use of chemical fertilizers are sought. One of these alternatives can be the use of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), a beneficial group of microorganisms found in the rhizosphere, root surface or in association with the roots. In this study PGPB associated with sorghum culture that have suitability for use in formulating agricultural inoculants were isolated and characterized and their effects of promoting growth through different mechanisms were tested. The strains were obtained from samples of rhizospheric soil and roots of sorghum plants collected in three production locations in the Rio Grande do Sul State. They were identified through the DNA extraction and partial amplification of the 16S rRNA gene and evaluated by *in vitro* tests for calcium phosphate solubilization, siderophores and indolic compounds production and biofilm formation. Among the 175 Gram negative bacterial strains, the identification revealed the occurrence of 20 bacterial genera in the roots and sorghum rhizospheric soil, with predominance of *Burkholderia* and *Klebsiella*. Subsequently, isolation was directed to Gram positive, and a total of 123 strains were obtained. Among the 298 isolates

obtained, the three more promising had confirmed their identity by sequencing the complete fragment of the 16S rRNA gene and were used in a growth chamber experiment with sorghum plants. These isolates were multiplied in culture medium with and without the addition of tryptophan, since this compound stimulates the production of phytohormones by the bacteria. The bacterial strain belonging to the genus *Rhizobium* (VIA07) stood out among the others because it gave the sorghum plants a greater growth in relation to the length and weight of the aerial part. This isolate was also tested in a soil substrate assay. The inoculated plants presented significant growth. Treatment without tryptophan represented the most promising results.

Palavras-chave: PGPB, sorgo, inoculante, ácido indol-acético

Introdução

O sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) é uma gramínea originária do continente africano. Entre as espécies alimentares é uma das mais versáteis e mais eficientes, tanto do ponto de vista fotossintético, como em velocidade de maturação. Sua reconhecida versatilidade se estende desde o uso de seus grãos como alimento humano e animal (principalmente para ruminantes) e do colmo como matéria prima para a produção de álcool anidro até o uso em bebidas alcoólicas, colas e tintas (Embrapa Milho e Sorgo 2015).

Com objetivo de aumentar a produtividade desta cultura, uma interessante alternativa é o uso de inoculantes microbianos, produtos biológicos que contêm micro-organismos vivos. Um inoculante microbiano pode ser definido como o produto final de uma formulação contendo um transportador e um agente bacteriano ou um consórcio de micro-organismos (Bashan *et al.* 2014). O uso de inoculantes na agricultura, além de evitar a contaminação da água pelo nitrato proveniente da adubação nitrogenada, pode contribuir para uma menor emissão de gases de efeito estufa. Além dos ganhos ambientais, o uso de inoculantes torna-se adequado para sistemas de produção em que a legislação não permite o uso de agroquímicos, como em sistemas orgânicos (Bashan *et al.* 2014; MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

As plantas estabelecem diversas relações com os organismos do solo e o balanço dessas interações resulta no aumento ou redução de *fitness*. A interação entre os micro-organismos e as plantas é estimulada pela troca de sinais moleculares na rizosfera – região de solo aderido às raízes vegetais com importância fundamental para a captação

de água e nutrientes (Alami *et al.* 2000). As bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB –*Plant Growth Promoting Bacteria*) formam um grupo benéfico e heterogêneo de micro-organismos que podem ser encontrados na rizosfera, superfície das raízes ou em associação com as mesmas (Souza *et al.* 2015).

Alguns mecanismos bacterianos já são bastante conhecidos pela capacidade de favorecer o crescimento vegetal ou a defesa contra patógenos. A solubilização de nutrientes e a produção de reguladores de crescimento vegetal (fito-hormônios) estão entre os exemplos clássicos do potencial das bactérias como fertilizantes naturais. Nutrientes essenciais, como o nitrogênio e o fósforo, podem ser disponibilizados por meio da fixação biológica do nitrogênio atmosférico e da solubilização de fosfatos, por exemplo (Estrada *et al.* 2013; Hungria *et al.* 2013; Chen *et al.* 2014). A produção de sideróforos tem sido associada à maior disponibilidade de ferro e à proteção contra patógenos (Dimkpa *et al.* 2009; Loaces *et al.* 2011). A capacidade de produzir fito-hormônios também possui grande importância e destaque devido à influência dessas moléculas sobre o metabolismo das plantas (Spaepen *et al.* 2007; Jaillais e Chory 2010).

Dentre as diferentes classes de hormônios vegetais existentes, o ácido indolacético é o principal exemplo de auxina natural, com diversas funções no desenvolvimento das plantas (Ludwig-Muller e Epstein, 1991; Teale *et al.* 2006). Em bactérias, é produzido juntamente com outros compostos indólicos e é um regulador de crescimento bastante explorado entre as PGPB (Santner e Estelle 2009; Contesto *et al.* 2010).

Acredita-se que, além de promover o crescimento das plantas, as PGPB devem ser eficientes em colonizar o solo ou a superfície das raízes, sobrevivendo e se multiplicando com eficiência frente à competição com outros componentes da microbiota. Nesse contexto, estima-se que a produção de biofilme seja um mecanismo importante para a proteção contra danos ou estresses ambientais. (Haggag e Timmusk 2008). Os biofilmes são conjuntos de colônias microbianas concentradas em uma interface e cercadas por substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos próprios micro-organismos (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Recentemente, bactérias produtoras de biofilmes têm sido consideradas importantes candidatas à formulação de inoculantes para plantas (Seneviratne *et al.* 2008), uma vez que o próprio biofilme pode atuar como um carreador (Malusá *et al.* 2012).

Com base nas informações apresentadas, sabendo que a cultura de sorgo carece de tecnologias que aumentem seu rendimento, se torna interessante estudar alternativas

viáveis e que não aumentem os danos ambientais causados pelo excesso do uso de fertilizantes químicos. Os benefícios das PGPB são bem conhecidos e estabelecidos para diversas culturas agrícolas, porém pouco se sabe sobre as PGPB que se associam com a cultura do sorgo.

Metodologia

Isolamento de bactérias Gram-negativas

Amostras de solo e raízes de sorgo foram obtidas em março de 2014 de três lavouras de sorgo localizadas nos municípios de Viamão [Via (30° 04' 52" S, 51° 01' 24" W)], Caxias do Sul [Cax (29° 10' 05" S, 51° 10' 46" W)] e Taquari [Taq (29° 47' 59" S, 51° 51' 52" W)], no estado do Rio Grande do Sul. Da parte interna de cada lavoura, evitando-se as bordas, foram coletadas aleatoriamente cinco plantas. Estas tiveram suas partes aéreas removidas e as respectivas raízes foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em gelo até a utilização. As raízes foram desinfestadas por meio de imersão em solução de hipoclorito de sódio e água destilada (1:1) por 1 minuto e álcool 70% por 1 minuto, seguido de 6 lavagens em água destilada estéril. Dez gramas de solo rizosférico e 10 g de raízes desinfestadas e cortadas em pedaços de aproximadamente 0,1 cm foram adicionadas a 90 ml de solução salina 0,85%. Após 24 horas de agitação à temperatura de 4°C, foram feitas diluições seriadas até 10^{-3} . Cem microlitros de cada diluição foram inoculados em frascos de vidro de 10 ml contendo, cada um, 6 ml de diferentes meios de cultura semissólidos sem nitrogênio: Nfb, LGI e LGI-P (Döbereiner *et al.* 1995). Este processo foi repetido após 7 dias de incubação à 30° C e, ao final de mais 7 dias de crescimento em estufa, foi feito estriamento em placas de Petri contendo os mesmos meios de cultura anteriores, desta vez sólidos. As placas foram mantidas em estufa à 28°C por 72 h e, ao final deste período, as colônias morfologicamente diferentes foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3 ml de meio de cultura KB líquido (Glickmann e Dessaux 1995). Os tubos permaneceram sob agitação por 72 h à temperatura de 28°C. Após foram armazenados em glicerol 50% à -18°C.

Isolamento e caracterização de bactérias Gram-positivas esporuladas

Para o isolamento de bactérias Gram-positivas esporuladas foram utilizadas apenas amostras de solo rizosférico provenientes das mesmas três regiões anteriormente citadas. Dez gramas deste solo foram adicionadas a 90 ml de solução salina 0,85% e foram realizadas diluições seriadas até 10^{-3} . As diluições foram incubadas à 80°C por

20 minutos para eliminação de células bacterianas vegetativas e, posteriormente, inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura sólido Tiamina-biotina sem adição de nitrogênio (TB; Seldin *et al.* 1983). Estas placas foram incubadas por 7 dias à 28°C em jarra de anaerobiose contendo disco gerador de atmosfera anaeróbica (Probac do Brasil) e esse mesmo procedimento repetido. Ao final, as colônias obtidas foram inoculadas em meio de cultura King B líquido e incubadas sob agitação por 72 h à 28°C. Após foram armazenadas em glicerol 50% à -18°C.

Identificação de isolados bacterianos em nível de gênero

Os isolados obtidos foram submetidos à extração de DNA (Ambrosini *et al.* 2012) e posterior amplificação de um fragmento de aproximadamente 450 pares de bases do gene 16S rRNA. Para a amplificação foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Felske *et al.* (1997): U968 (AACGCGAAGAACCTTAC) e L1401 (CGGTGTGTACAAGACCC). As reações de amplificação consistiram de um volume de 25 µl contendo 50 ng de DNA molde, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies), tampão de reação 10 X *Taq* DNA polimerase, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs (Life Technologies) e 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador. As reações foram submetidas a 32 ciclos: um ciclo de desnaturação inicial à 94°C por 5 min, seguidos por 30 ciclos de: desnaturação por 45 s à 94°C, anelamento por 45 s à 52°C, e extensão por 45 s à 72°C, e um ciclo final de extensão por 10 min à 72°C. Todas as reações de amplificação foram realizadas em um termociclador do tipo PCR *Express Temperature Cycling System* (Thermo Hybaid) e os fragmentos amplificados foram visualizados após eletroforese a 80 V por 1 h em gel de agarose 1%.

Os fragmentos foram submetidos ao sequenciamento pela Macrogen e as sequências analisadas nos bancos de dados GenBank (BLASTn, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e EzTaxon-e, uma extensão do EzTaxon database (Chun *et al.* 2007, <http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>).

Avaliação dos isolados bacterianos quanto à presença de características promotoras de crescimento vegetal

A produção de compostos indólicos foi avaliada conforme Asghar *et al.* (2002), onde cada isolado bacteriano foi multiplicado à 28°C em caldo King B com triptofano (Glickmann e Dessaux 1995). Após 72 horas, as culturas bacterianas foram centrifugadas em temperatura ambiente por 3 min a 12.000 rpm e 100 µl de

sobrenadante foram coletados e misturados com 100 µl de reagente de Salkowski (2 ml 0,5 M FeCl₃ + 98 ml 35% HClO₄). Após 30 min em temperatura ambiente, a mistura foi avaliada quanto à coloração e espectrofotometria com absorvância de 550 nm, utilizando-se uma curva de ácido indol-acético padrão (Sarwar e Kremer, 1994).

Para o teste da produção de sideróforos, 10 µl de cultura bacteriana multiplicada em caldo King B foram inoculados em placas contendo meio King B (diluído cinco vezes) com Cromoazurol S (Schwyn e Neilands 1987). Os isolados que formaram um halo translúcido ao redor de suas colônias foram considerados produtores de sideróforos.

O método descrito por Sylvester-Bradley *et al.* (1982) foi utilizado para a avaliação da capacidade de solubilizar fosfato de cálcio. Uma alíquota de 10 µl da cultura bacteriana crescida em caldo King B foi inoculada em meio GL (10 g de glicose, 2 g de extrato de levedura e 15 g de ágar por litro), acrescido de 50 ml de K₂HPO₄ 10% e 100 ml CaCl₂ 10%. Os isolados que se multiplicaram formando halos visíveis ao redor das colônias foram considerados positivos para solubilização de fosfato de cálcio.

Todos os experimentos descritos nesse subitem foram realizados em triplicata.

Seleção dos isolados bacterianos mais promissores e avaliação de características de promoção de crescimento vegetal adicionais

Para a avaliação quanto à formação de biofilme, doze isolados foram pré-selecionados com base nas habilidades gerais de promoção de crescimento vegetal descritas anteriormente, assim como quanto à identificação em nível de gênero (potencial não-patogênico).

Este teste foi realizado em triplicata e conforme a metodologia proposta por Stepanovic *et al.* (2007). Resumidamente, após a obtenção das curvas de crescimento de cada micro-organismo, as culturas em fase estacionária foram diluídas cem vezes em meio TSB (Sigma-Aldrich) suplementado com glicose e, então, inoculadas em microplacas de 96 poços (200 µl por poço). As placas foram cobertas com tampa de silicone e incubadas sob aerobiose por 24 a 48 h. Após o período de incubação, o conteúdo dos poços foi descartado e cada poço foi lavado com 300 µl de PBS (NaCl 137 mM + Fosfato 10 mM + KCl 2,7 mM, pH 7,2) para remoção de células não-aderentes e preservação do biofilme formado. O corante cristal violeta foi utilizado para coloração do biofilme pelo período de 15 minutos. O excesso de corante foi retirado invertendo-se a placa, que foi posteriormente enxaguada em água corrente. Após

secagem em temperatura ambiente, o corante fixado foi ressolubilizado com 150 µl de etanol 95% por poço e a placa foi mantida à temperatura ambiente por 30 minutos. A OD foi medida a 570 nm em leitor de microplacas e comparada com controles negativo (meio de cultura não-inoculado) para determinação dos resultados.

Identificação dos isolados bacterianos selecionados em nível de espécie

Os doze isolados com características mais promissoras tiveram seu DNA submetido à amplificação de um fragmento de aproximadamente 1500 pares de base do gene 16S rRNA. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: BacPaeF (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'; Stackebrandt e Liesack, 1993) e 1542R (5' AGAAAGGAGGTGATCCAGCC 3'; Edwards *et al.* 1989). As reações de amplificação consistiram de um volume de 25 µl contendo 50 ng de DNA molde, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies), tampão de reação 10 X *Taq* DNA polimerase, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs (Life Technologies), 40 mM DMSO e 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador. As reações foram submetidas a 32 ciclos: um ciclo de desnaturação inicial à 94°C por 5 min, seguidos por 30 ciclos de: desnaturação por 45 s à 94°C, anelamento por 45 s à 55°C, e extensão por 45 s à 72°C, e um ciclo final de extensão por 10 min à 72°C. Todas as reações de amplificação foram realizadas em um termociclador do tipo PCR *Express Temperature Cycling System* (Thermo Hybaid) e os fragmentos amplificados foram visualizados após eletroforese a 80 V por 1 h em gel de agarose 1%.

Os fragmentos foram submetidos ao sequenciamento e as sequências obtidas foram primeiramente montadas com auxílio do software Staden e então analisadas nos bancos de dados GenBank e EzTaxon-e.

Montagem de curva de crescimento e produção de compostos indólicos

Três isolados bacterianos foram selecionados e multiplicados em meio de cultura King B sem adição de triptofano e em meio King B com adição de triptofano (0,5 g/l). O pré-inóculo de todos os isolados selecionados foi padronizado para densidade óptica de 0,50, lida em absorbância (A) de 600 nm. A cada 6 horas foram realizadas as seguintes análises: a) leitura da densidade óptica em espectrofotômetro com A = 600 nm; b) ensaio *in vitro* de produção de compostos indólicos, com utilização de reagente de Salkowski e leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 520 nm. As leituras foram mantidas até a estabilização do crescimento (quando as culturas atingiram

a fase estacionária) e da produção de compostos indólicos dos isolados bacterianos. Com os dados obtidos, foram construídos os gráficos apresentados.

Ensaio em câmara de crescimento para avaliação do peso e comprimento de plantas inoculadas

Os três isolados selecionados foram multiplicados em meio de cultura King B (Glickmann e Dessaux 1995) sem adição de triptofano e meio de cultura King B com adição de triptofano, conforme subitem anterior, até atingirem uma densidade óptica de 0,50 em $A = 600$ nm. Para o ensaio de promoção de crescimento de plantas de sorgo foram avaliados os seguintes tratamentos: plantas não-inoculadas e mantidas com solução nutritiva diluída a 25%; plantas não-inoculadas e mantidas com solução nutritiva não diluída (100% da dose de nutrientes); plantas inoculadas com os isolados bacterianos selecionados multiplicados em meio de cultura sem triptofano; e plantas inoculadas com os isolados bacterianos multiplicados em meio de cultura com triptofano. O delineamento experimental consistiu de 12 repetições por tratamento. As unidades experimentais foram compostas de copos plásticos de 500 ml contendo vermiculita estéril e areia em uma proporção de 1:1. Antes da inoculação, as sementes de sorgo foram desinfestadas em solução de álcool 70% e hipoclorito 3% (v/v) por 3 min e, então, inoculadas com os diferentes tratamentos (200 μ l de cultura bacteriana). No início do ensaio, todas as unidades experimentais receberam 50 ml de solução nutritiva de Hoagland's (Ambrosini *et al.* 2012) diluída à 25%, exceto aquelas que receberam a solução não diluída. O ensaio foi mantido por 45 dias e, transcorrido este período, foram avaliados o comprimento e peso seco da parte aérea e raízes das plantas e teor de macro nutrientes nas folhas. As análises estatísticas foram feitas no software R versão 5.4.3 (ANOVA e teste de Tukey).

Ensaio em solo

Para este ensaio, foi selecionado o isolado que se destacou pelo desempenho como promotor de crescimento no ensaio com vermiculita e areia. Este isolado foi multiplicado em meio de cultura King B (Glickmann e Dessaux 1995) sem adição de triptofano e meio de cultura King B com adição de triptofano, até atingir a densidade óptica estabelecida a partir do resultado da curva de crescimento. Para o ensaio de promoção de crescimento de plantas de sorgo em solo foram avaliados os seguintes

tratamentos: plantas não-inoculadas e mantidas com solução nutritiva 25%; plantas não-inoculadas e mantidas com solução nutritiva 100%; plantas inoculadas com o isolado bacteriano selecionado multiplicado em meio de cultura sem triptofano; e plantas inoculadas com o isolado bacteriano multiplicado em meio de cultura com triptofano. O delineamento experimental consistiu de 7 repetições por tratamento. As unidades experimentais foram compostas de copos plásticos de 500 ml contendo solo proveniente da região de origem do isolado selecionado. Antes da inoculação, as sementes de sorgo foram desinfestadas, conforme subitem anterior. Ao início do ensaio, todas as unidades experimentais receberam 50 ml de solução nutritiva Hoagland's (Ambrosini *et al.* 2012) diluída à 25%, exceto aquelas que receberam a solução 100%. O ensaio foi mantido por 45 dias e, transcorrido este período, foram avaliados o comprimento e peso seco da parte aérea e raízes das plantas e teor de macro nutrientes nas folhas. As análises estatísticas foram feitas no software R versão 5.4.3 (ANOVA e teste de Tukey).

Resultados e Discussão

A partir do isolamento feito com base no crescimento em três meios semissólidos sem nitrogênio foi obtido um total de 175 isolados de bactérias Gram-negativas (Tabela 1). Dentre as características de promoção de crescimento avaliadas, a produção de sideróforos e de compostos indólicos se destacaram, havendo uma maior quantidade de isolados com essas características: 84% dos isolados foram capazes de produzir sideróforos e 87% dos isolados produziram uma quantidade de compostos indólicos de até 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Apenas 1% dos isolados produziram uma quantidade de compostos indólicos superior a 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$. A quantidade de isolados com estas duas características se apresentou distribuída de modo equilibrado entre as três regiões amostradas. Outros estudos que tiveram avaliações destas características também demonstraram a ocorrência de alto número de isolados bacterianos com tais habilidades (Ambrosini *et al.* 2012, Souza *et al.* 2013, Granada *et al.* 2013, Costa *et al.* 2013, Pontes *et al.* 2015).

Menos da metade dos isolados tiveram a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio. Esta baixa capacidade de isolados bacterianos em solubilizar fosfatos já foi demonstrada em diversos estudos anteriores (Beneduzi *et al.* 2008, Ambrosini *et al.* 2012, Souza *et al.* 2013, Granada *et al.* 2013, Costa *et al.* 2013, Pontes *et al.* 2015). A maior quantidade de isolados com essa característica apresentou-se distribuída entre as regiões de Viamão e Caxias do Sul.

A partir do isolamento de bactérias anaeróbicas facultativas (Gram-positivas), foram obtidos um total de 123 isolados. Estes isolados tiveram apenas sua capacidade de solubilização de fosfatos testada. Para este teste, foram utilizadas três fontes de fósforo: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Fe_3PO_4 e AlPO_4 . Apenas 32% dos isolados foram capazes de solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. As demais fontes de fósforo não foram solubilizadas por nenhum isolado. Diversos trabalhos realizados demonstram a baixa capacidade de estirpes bacterianas em solubilizar Fe_3PO_4 e AlPO_4 (Matos *et al.* 2017; Panhwar *et al.* 2009; Liu *et al.* 2014; Wang *et al.* 2012).

Tabela 1. Número de isolados obtidos e produção de sideróforos (SID), solubilização de fosfato (FOS) e produção de compostos indólicos (CI) dos isolados em cada região amostrada.

Localização	Isolados	SID	FOS	CI ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			
				0.5-15	15-30	>30	
1. Viamão	Raízes	29	24	13	27	2	0
	Solo	27	20	20	25	2	0
2. Caxias do Sul	Raízes	30	26	15	23	6	1
	Solo	29	24	20	27	1	1
3. Taquari	Raízes	30	26	4	24	3	0
	Solo	30	27	5	27	6	0
Total		175	147	77	153	20	2

Após a amplificação parcial e sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados obtidos foram identificados um total de 20 gêneros bacterianos distribuídos entre as regiões amostradas, conforme é mostrado na Figura 1. Ocorreu predominância do gênero identificado como *Burkholderia*, principalmente nas regiões de Viamão e Caxias do Sul, onde os percentuais de ocorrência deste gênero alcançaram 43% e 56%, respectivamente. O segundo gênero mais abundante foi identificado como *Klebsiella*, cuja presença se destacou nas amostras da região de Taquari (23% dos isolados pertencentes a este gênero). Costa *et al.* (2014) demonstraram em seu estudo que estes dois gêneros bacterianos são bem comuns nos solos, podendo ser encontrados principalmente no ambiente da rizosfera, mas também endofiticamente.

O gênero *Rhizobium*, tradicionalmente conhecido por seu potencial como promotor do crescimento de plantas devido à capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico, foi encontrado em pequena quantidade em todas as três regiões amostradas. A presença deste gênero pode ser explicada pelo histórico de cultivo nas áreas amostradas, que, tradicionalmente, são utilizadas para o cultivo de feijão (Lisboa, B. comunicação pessoal).

Rizóbios possuem a capacidade de persistir em um solo por muitos anos mesmo na ausência da planta hospedeira (Sanginga *et al.* 1994). Entretanto, a manutenção das populações de bactérias pertencentes a este gênero, assim como de outros gêneros associados às raízes de plantas, depende de diversos fatores, como, por exemplo, a

ocorrência de estresses ambientais, a acidez do solo e a presença de elementos tóxicos (Kahindy et al., 1997). O solo da região de Taquari, que apresentou a menor quantidade de isolados pertencentes ao gênero *Rhizobium*, possui pH muito baixo (4,9) e alta saturação por alumínio (33% da CTC efetiva), conforme consta no laudo de análise de solo (Tabela S1)

Ainda assim, dentre as regiões amostradas, Taquari foi a região que apresentou a maior diversidade de gêneros bacterianos, seguida da região de Viamão. Oitenta por cento dos gêneros identificados estavam presentes nesta região e 55% dos gêneros identificados estavam presentes na região de Viamão. A diversidade de bactérias de um solo, tanto de rizóbios quanto de outros gêneros, pode ser influenciada por diversos fatores bióticos e abióticos, entre eles o pH do solo, salinidade, práticas de manejo agrícola, uso de fertilizantes, intensidade de cultivo (Yan *et al.* 2014), presença de metais pesados (Sandaa *et al.* 1999), profundidade do perfil do solo (Fierer *et al.* 2003) e o contingente histórico de micro-organismos (Ge *et al.* 2008).

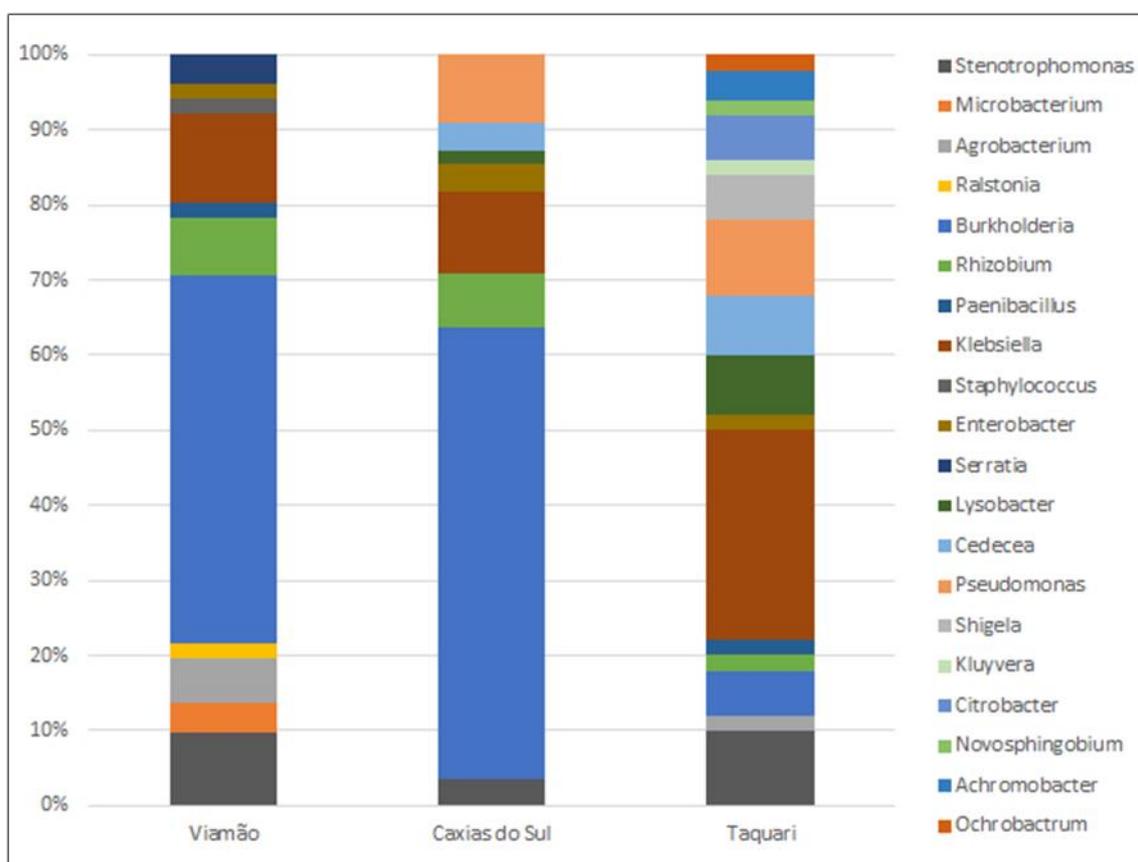


Figura 1. Distribuição de gêneros bacterianos nas respectivas regiões amostradas.

Com base nas características de promoção de crescimento avaliadas e na identificação taxonômica parcial, foram pré-selecionados doze isolados – sete Gram-positivos e cinco Gram-negativos – das diferentes regiões amostradas para o sequenciamento do fragmento total do gene 16S rRNA com intuito de obter-se uma identificação taxonômica em nível de espécie (Tabela 2).

Foram identificadas as seguintes espécies, com sua respectiva região de origem: *Rhizobium miluonense* (Viamão), *Rhizobium lusitanum* (Caxias do Sul), *Rhizobium mayense* (Caxias do Sul), *Rhizobium pusense* (Taquari), *Bacillus cucumis* (Taquari), *Paenibacillus durus* (Taquari e Caxias do Sul), *Bacillus niacini* (Taquari), *Bacillus megaterium* (Taquari) e *Paenibacillus terrae* (Caxias do Sul).

Tabela 2. Identificação dos isolados selecionados para sequenciamento em nível de espécie e suas respectivas características avaliadas *in vitro*. FOS – solubilização de fosfato; SID – produção de sideróforos; CI – produção de compostos indólicos; BIO – formação de biofilme.

Isolado	Identificação	Fonte	FOS	SID	CI ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	BIO
VIA7	<i>Rhizobium miluonense</i>	solo	-	+	12,65	-
VIA10	<i>Rhizobium miluonense</i>	solo	-	-	2,95	-
CAX69	<i>Rhizobium lusitanum</i>	solo	-	-	3,39	+
CAX103	<i>Rhizobium mayense</i>	raízes	-	-	6,68	-
TAQ155	<i>Rhizobium pusense</i>	raízes	-	+	15,04	+
B12	<i>Bacillus cucumis</i>	solo	+	-	0	-
B18	<i>Paenibacillus durus</i>	solo	+	-	0	-
B19	<i>Bacillus niacini</i>	solo	+	-	44,71	+
B34	<i>Bacillus megaterium</i>	solo	+	-	11,53	-
B41	<i>Bacillus megaterium</i>	solo	+	-	14,22	-
B63	<i>Paenibacillus terrae</i>	solo	+	-	23,15	+
B65	<i>Paenibacillus durus</i>	solo	+	-	0	-

Três dos doze isolados identificados em nível de espécie foram selecionados para montagem de uma curva de crescimento e, posteriormente, foram testados em um ensaio em câmara de crescimento. O intuito da curva de crescimento foi estabelecer em qual momento da curva de crescimento os isolados apresentavam a maior produção de

compostos indólicos. Os resultados obtidos com a montagem das curvas de crescimento estão demonstrados na Figura 2.

Para o isolado *Bacillus niacini*, observou-se que o tempo de crescimento em que foi registrada a mais alta densidade óptica coincidiu com o período em que ocorreu o ápice na produção de compostos indólicos por este isolado. O mesmo ocorreu após aproximadamente 40 horas de crescimento à 30°C. Para o isolado *Rhizobium miluonense*, a maior densidade óptica foi registrada após 42 horas de crescimento, enquanto que o ápice de produção de compostos indólicos ocorreu em aproximadamente 30 horas de crescimento. Para o isolado *Paenibacillus terrae*, a densidade óptica atingiu seu ápice em aproximadamente 42 horas e a produção de compostos indólicos em aproximadamente 20 horas.

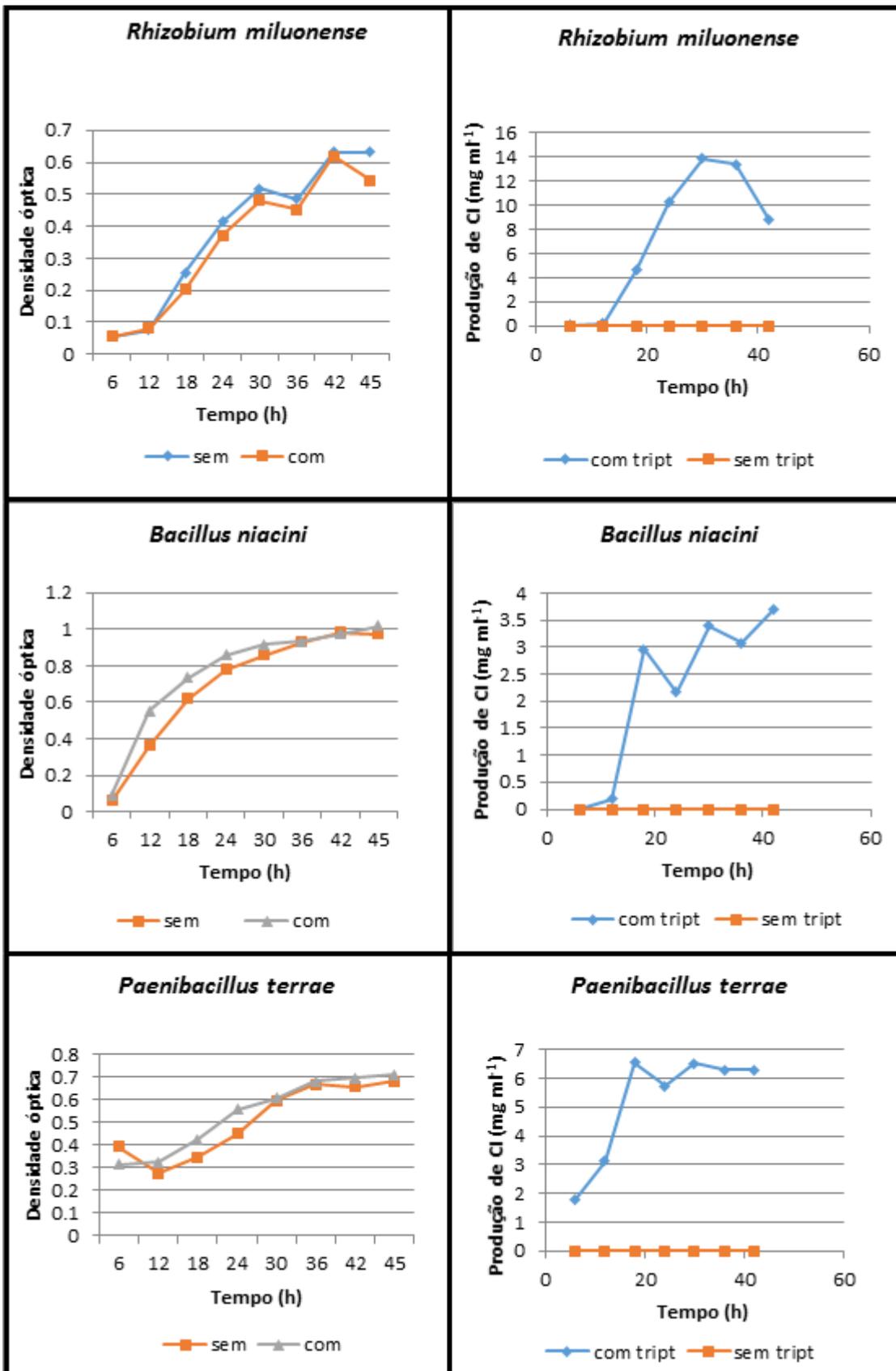


Figura 2. Curvas de crescimento (DO) e de produção de compostos indólicos (CI) dos isolados selecionados multiplicados em meio com e sem triptofano (tript).

Para testar a interação entre as PGPB e plantas de sorgo, foi realizado um ensaio em câmara de crescimento para o qual foram testados os três isolados bacterianos, cujas características de promoção de crescimento foram apresentadas anteriormente na Tabela 2. Para este ensaio foi utilizada uma mistura de vermiculita e areia estéreis como substrato para o crescimento das plantas.

Tabela 3. Efeito da inoculação de PGPB na promoção do crescimento de sorgo sob condições de câmara de crescimento na presença e na ausência de triptofano no meio de cultivo das bactérias selecionadas, com comparação entre tratamentos inoculados e tratamento controle com 25% da dose de nitrogênio.

Tratamentos	Sem triptofano				Com triptofano			
	Parte aérea		Raízes		Parte aérea		Raízes	
	Comprimento (cm)	Peso seco (g)						
25% controle	44,4 a	0,83 a	47,5 a	0,42 a	44,2 a	0,73 a	47,2 a	0,37 b
VIA07	40,7 a	0,66 a	42,0 b	0,33 b	46,7 a	0,77 a	46,6 a	0,41 a
B19	17,8 c	0,08 c	42,3 b	0,08 c	21,1 b	0,12 c	44,3 a	0,09 c
B63	23,9 b	0,15 c	43,4 a	0,10 c	21,6 b	0,13 c	41,1 a	0,09 c

*Os dados representam as médias de 12 réplicas das plantas crescidas em vermiculita e areia

** Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não diferem significativamente com $P > 0.05$ (Teste de Tukey)

De acordo com a Tabela 3, as plantas de sorgo inoculadas com os isolados B19 (*Bacillus niacini*) e B63 (*Paenibacillus terrae*) em ambos os tratamentos (com triptofano e sem triptofano) apresentaram uma redução significativa no comprimento e peso seco de raízes e parte aérea quando comparadas com as plantas do tratamento não-inoculado com 25% da dose de nitrogênio. O mesmo pode ser observado na Figura S1, que mostra todas as réplicas de cada tratamento.

As plantas de sorgo inoculadas com o isolado VIA07 (*Rhizobium miluonense*), entretanto, apresentaram um aumento significativo do peso seco de raízes quando comparadas com as plantas do tratamento não-inoculado com 25% de nitrogênio no tratamento com triptofano. As plantas inoculadas com VIA07 também apresentaram um pequeno aumento no peso seco de parte aérea em relação às plantas do tratamento não-inoculado com 25% da dose de nitrogênio. Porém, este aumento não foi estatisticamente significativo.

Tabela 4. Efeito da inoculação de PGPB na promoção do crescimento de sorgo sob condições de câmara de crescimento na presença e na ausência de triptofano no meio de cultivo das bactérias selecionadas, com comparação entre tratamentos inoculados e tratamento controle com 100% da dose de nitrogênio.

Tratamentos	Sem triptofano				Com triptofano			
	Parte aérea		Raízes		Parte aérea		Raízes	
	Comprimento (cm)	Peso seco (g)						
100% controle	46,0 a	0,85 a	50,0 a	0,38 a	44,5 a	0,83 a	46,9 a	0,40 a
VIA07	40,7 a	0,66 b	42,0 a	0,34 a	46,7 a	0,77 a	46,6 a	0,41 a
B19	17,8 c	0,08 c	42,3 a	0,08 c	21,1 b	0,12 c	44,3 a	0,09 c
B63	23,9 b	0,16 c	43,4 a	0,10 c	21,6 b	0,13 c	41,1 a	0,09 c

*Os dados representam as médias de 12 réplicas das plantas crescidas em vermiculita e areia

** Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não diferem significativamente com $P > 0,05$ (Teste de Tukey)

Quando comparadas com as plantas do tratamento não-inoculado com 100% da dose de nitrogênio, as plantas inoculadas com os isolados B19 e B63 apresentaram uma significativa redução no comprimento e peso seco de parte aérea e peso seco de raízes. As plantas inoculadas com o isolado VIA07 apresentaram um pequeno aumento de comprimento de parte aérea e de peso seco de raízes não-significativos no tratamento com triptofano e uma redução significativa de peso seco de parte aérea no tratamento sem triptofano (Tabela 4).

O gênero *Bacillus* contém diversas espécies que podem prover algum tipo de benefício a plantas e seres humanos. Muitas dessas espécies produzem compostos com atividade antimicrobiana, sobretudo antifúngica (Giacomodonato *et al.* 2001). Kim *et al.* (2003) demonstraram em seu estudo a ação antimicrobiana de isolados de *Bacillus niacini*, a qual também apresentou, em outros estudos, capacidade de degradação de ácido nicotínico, que representa importância farmacêutica (Nagel e Andreesen 1990). O isolado obtido neste estudo demonstrou nos testes *in vitro* ter habilidades interessantes para promoção de crescimento de plantas, como a capacidade de solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e produção de compostos indólicos. Entretanto, o ensaio em planta mostrou um comportamento diferente para este isolado, como observado nas Tabelas 3 e 4 e Figura S1.

O gênero *Paenibacillus* é uma subdivisão do gênero *Bacillus* e da mesma forma contém espécies com potencial benéfico a plantas e seres humanos. O isolado deste estudo obteve bons resultados nos testes *in vitro* de promoção de crescimento, assim

como os obtidos por outros autores, como Yadav *et al.* (2016). Entretanto, seu comportamento durante ensaio em plantas de sorgo também se mostrou diferente.

Bactérias e outros micro-organismos presentes nos solos produzem e excretam substâncias denominadas compostos voláteis (Vespermann *et al.* 2007), os quais podem ter efeito positivo ou negativo sobre o crescimento das plantas (Kai *et al.* 2016). Em alguns casos, os compostos voláteis produzidos podem induzir o sistema de resistência das plantas (Ryu *et al.* 2004) ou atuar como agentes de controle biológico (Vespermann *et al.* 2007). Em outros casos, entretanto, podem inibir o crescimento de outros organismos, inclusive plantas (Kai e Piechulla 2010). Os isolados B19 e B63 quando colocados em contato com as plantas testadas podem ter produzidos compostos voláteis que foram responsáveis pela drástica redução de tamanho observada nas plantas.

Posteriormente, foi realizado um novo ensaio em câmara de crescimento utilizando o isolado com destacado potencial de promoção de crescimento de sorgo observado no primeiro ensaio com intuito de testar sua interação em condições mais próximas das encontradas em ambientes naturais. Portanto, neste segundo ensaio o substrato utilizado foi solo proveniente da região de origem do isolado.

Tabela 5. Efeito da inoculação de PGPB na promoção do crescimento de sorgo sob condições de câmara de crescimento na presença e na ausência de triptofano no meio de cultivo da bactéria selecionada, com comparação entre tratamentos inoculados e tratamento controle com 25% da dose de nitrogênio.

Tratamentos	Sem triptofano				Com triptofano			
	Parte aérea		Raízes		Parte aérea		Raízes	
	Comprimento (cm)	Peso seco (g)						
25% controle	30,0 a	0,24 b	60,9 a	0,22 b	28,5 b	0,22 b	62,8 a	0,24 a
VIA07	35,2 a	0,38 a	71,7a	0,36 a	32,4 a	0,28 a	60,7 a	0,24 a

*Os dados representam as médias de 7 réplicas das plantas crescidas em solo nativo

** Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não diferem significativamente com $P > 0.05$ (Teste de Tukey)

As plantas de sorgo inoculadas com o isolado VIA07 (*Rhizobium miluonense*) apresentaram um aumento significativo dos valores de comprimento e peso seco de parte aérea no tratamento com triptofano e do peso seco de parte aérea e raízes no tratamento sem triptofano, quando comparadas com as plantas do tratamento não-inoculado com 25% da dose de nitrogênio. Esta diferença no crescimento das plantas de sorgo também pode ser observada na Figura S2, que mostra todas as réplicas dos tratamentos não-inoculados e do tratamento com inoculação do isolado bacteriano selecionado.

Tabela 6. Efeito da inoculação de PGPB na promoção do crescimento de sorgo sob condições de câmara de crescimento na presença e na ausência de triptofano no meio de cultivo da bactéria selecionada, com comparação entre tratamentos inoculados e tratamento controle com 100% da dose de nitrogênio.

Tratamentos	Sem triptofano				Com triptofano			
	Parte aérea		Raízes		Parte aérea		Raízes	
	Compri- mento (cm)	Peso seco (g)	Compri- mento (cm)	Peso seco (g)	Compri- mento (cm)	Peso Seco (g)	Compri- mento (cm)	Peso seco (g)
100% controle	28,2 b	0,22 b	55,9 a	0,20 b	27,1 a	0,24 a	48,9 a	0,23 a
VIA07	35,2 a	0,38 a	71,7 a	0,36 a	32,4 a	0,28 a	60,7 a	0,24 a

*Os dados representam as médias de 7 réplicas das plantas crescidas em solo nativo

** Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não diferem significativamente com $P > 0.05$ (Teste de Tukey)

Quando comparadas com as plantas do tratamento não-inoculado com 100% da dose de nitrogênio, as plantas inoculadas com o isolado VIA07 apresentaram significativo aumento dos valores de comprimento e peso seco de parte aérea e peso seco de raízes no tratamento sem triptofano. Com relação ao tratamento com triptofano, o crescimento das plantas inoculadas com o isolado bacteriano selecionado foi estatisticamente equivalente ao das plantas não-inoculadas em todos os parâmetros avaliados.

Há grandes diferenças físicas, químicas e biológicas entre os substratos utilizados nos dois ensaios em câmara de crescimento. A vermiculita é um substrato estéril e que não fornece nutrientes. O solo, por outro lado, pode conter uma enorme diversidade de micro-organismos e inúmeras substâncias que podem ser fonte de nutrientes. Esse fator poderia explicar uma diferença de resultados entre as diferentes condições. Apesar do solo utilizado ser da mesma região amostrada anteriormente, algumas de suas características abióticas podem ter sido modificadas ao longo do intervalo de tempo entre uma coleta e outra (2014 e 2018). Dessa forma, está em andamento uma nova análise química do solo coletado mais recentemente. De posse desses dados, será possível analisar se algum fator químico, além da comunidade bacteriana nativa, pode ter contribuído de forma efetiva para os resultados obtidos nesse ensaio.

Porém, em ambos os ensaios realizados o isolado VIA07 se mostrou promissor. Quando utilizado vermiculita, as plantas inoculadas com este isolado apresentaram um crescimento semelhante às plantas não-inoculadas que receberam a dose completa de nutrientes. Quando utilizado solo nativo, as plantas inoculadas com esse isolado apresentaram um crescimento superior ao das plantas não-inoculadas e que receberam a dose completa de nutrientes (Tabelas 3-6 e Figuras S1 e S2).

Também ocorreram diferenças entre os tratamentos com e sem triptofano. Com relação ao ensaio em solo, de modo geral as plantas que foram inoculadas com o isolado multiplicado em meio de cultura com triptofano não tiveram um crescimento significativo. Diversos trabalhos citam um efeito inibitório do triptofano sobre o crescimento de plantas quando em excesso. Segundo Bazarani e Friedman (2000), a adição de triptofano não apenas aumenta a produção de ácido indol-acético das bactérias associadas às plantas, mas também provoca a inibição do alongamento radicular.

Com relação ao conteúdo de nutrientes das plantas dos dois ensaios realizados, os dados obtidos estão mostrados nas Figuras 3-6. A análise da quantidade de nitrogênio, fósforo e potássio nas folhas das plantas do ensaio em vermiculita e areia foi realizada apenas para as plantas inoculadas com o isolado VIA07 (*Rhizobium miluonense*).

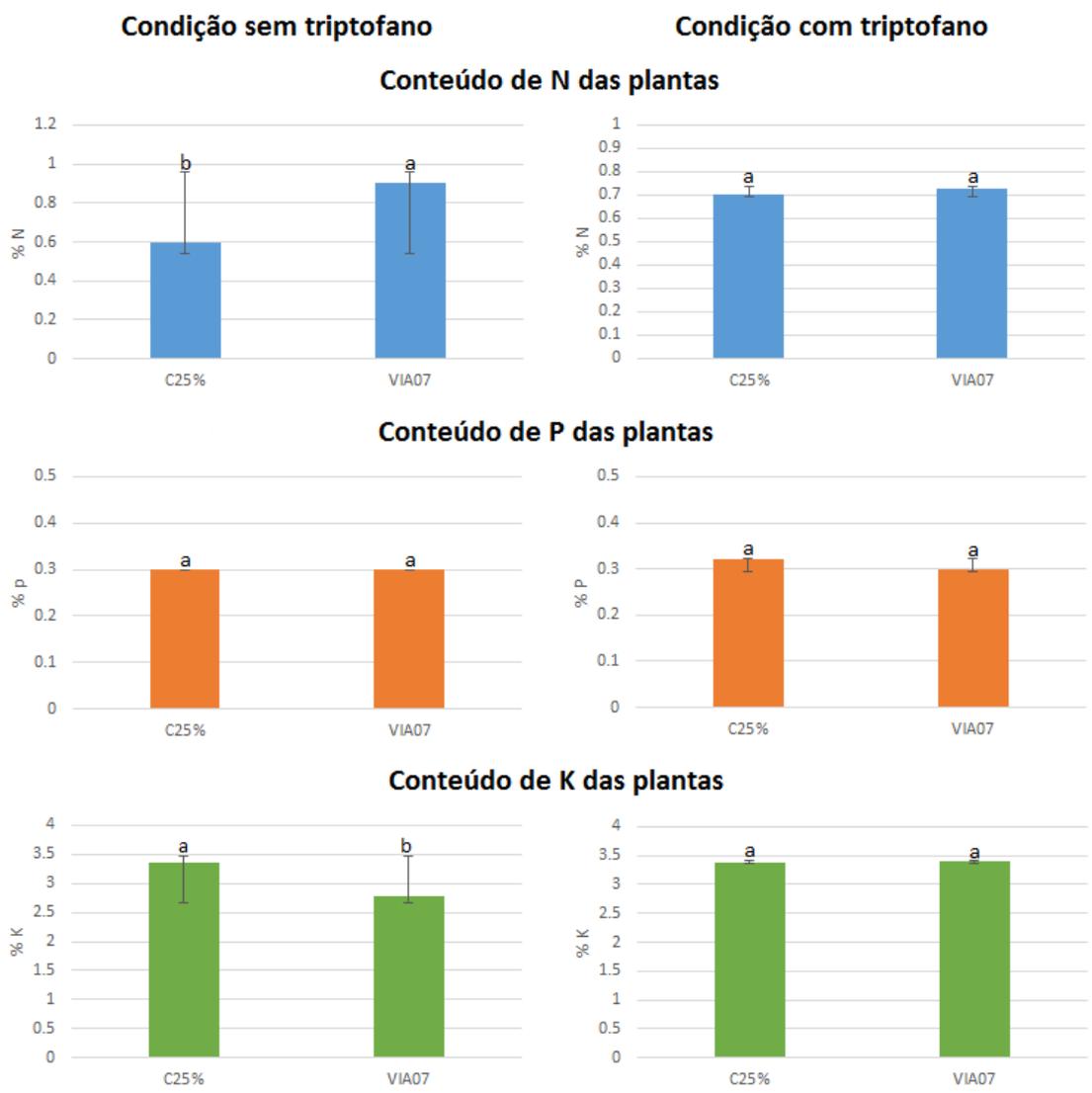


Figura 3. Influência da inoculação do isolado VIA07 e do controle não-inoculado com 25% da dose de nutrientes (C25%) na absorção de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) em plantas de sorgo após ensaio em câmara de crescimento com duração de 45 dias sob as condições sem triptofano e com triptofano. Os dados representam as médias de 12 réplicas das plantas crescidas em vermiculita e areia. $P > 0.05$ (Teste de Tukey).

As plantas de sorgo inoculadas com o isolado selecionado apresentaram um aumento significativo do teor de nitrogênio nas folhas no tratamento sem triptofano quando comparadas as plantas não-inoculadas e com 25% da dose de nutrientes. Porém, a inoculação das plantas com o isolado selecionado ocasionou uma redução significativa da absorção de potássio. No tratamento com triptofano, as plantas inoculadas apresentaram quantidade de nutrientes equivalente a das plantas não-inoculadas, para os três nutrientes analisados (Figura 3).

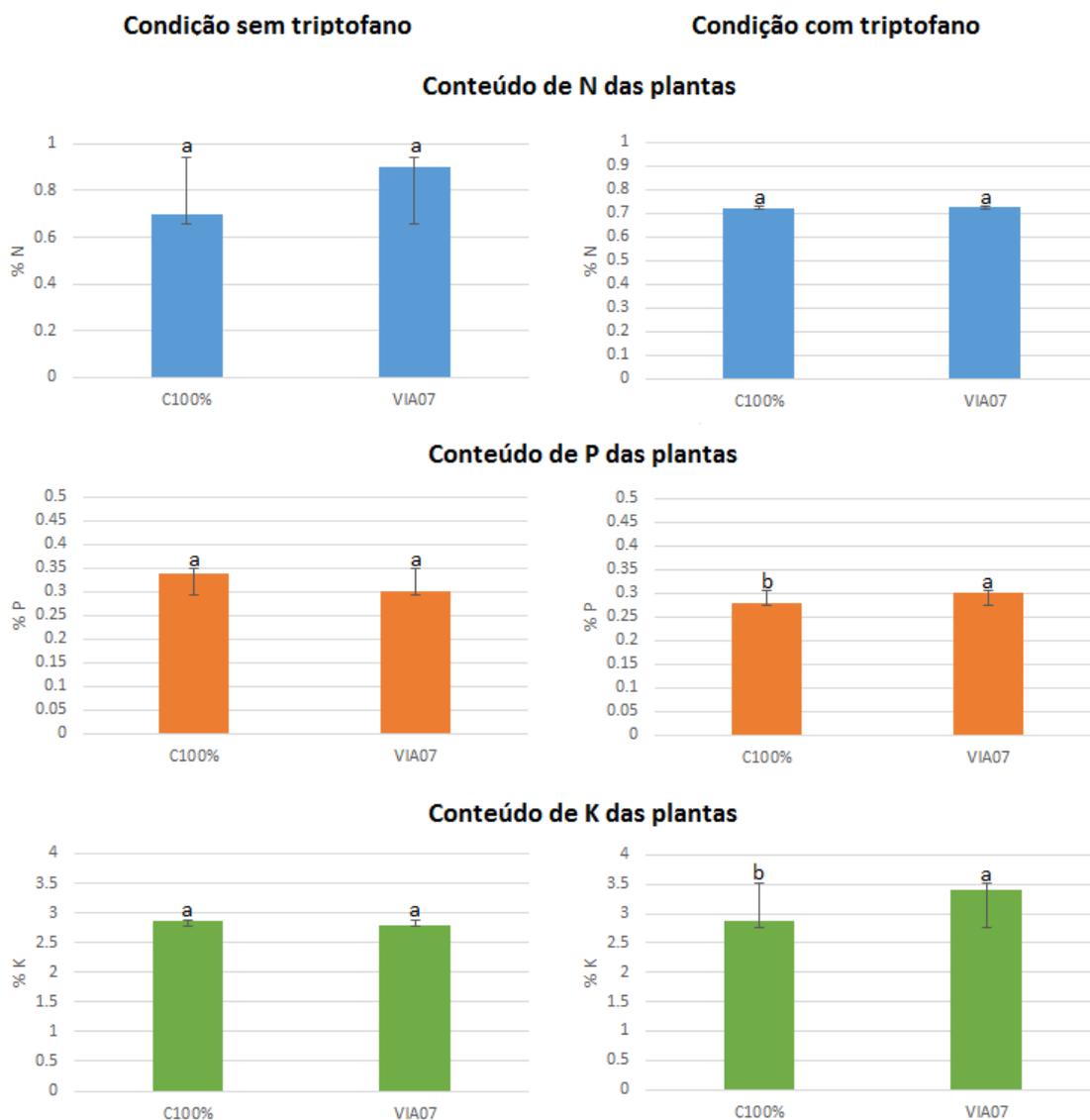


Figura 4. Influência da inoculação do isolado VIA07 e do controle não-inoculado com 100% da dose de nutrientes (C100%) na absorção de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) em plantas de sorgo após ensaio em câmara de crescimento com duração de 45 dias sob as condições sem triptofano e com triptofano. Os dados representam as médias de 12 réplicas das plantas crescidas em vermiculita e areia. $P > 0.05$ (Teste de Tukey).

As plantas inoculadas com o isolado selecionado apresentaram significativo aumento das quantidades de fósforo e potássio no tratamento com triptofano quando comparadas as plantas não-inoculadas e com 100% da dose de nutrientes. No tratamento sem triptofano, as plantas inoculadas apresentaram quantidade de nutrientes equivalente a das plantas não-inoculadas, para os três nutrientes analisados (Figura 4).

Com relação ao ensaio com uso de solo nativo, as plantas inoculadas com o isolado selecionado apresentaram aumento nas quantidades de nitrogênio e potássio no

tratamento sem triptofano quando comparadas as plantas não-inoculadas e com 25% da dose de nutrientes (Figura 5).

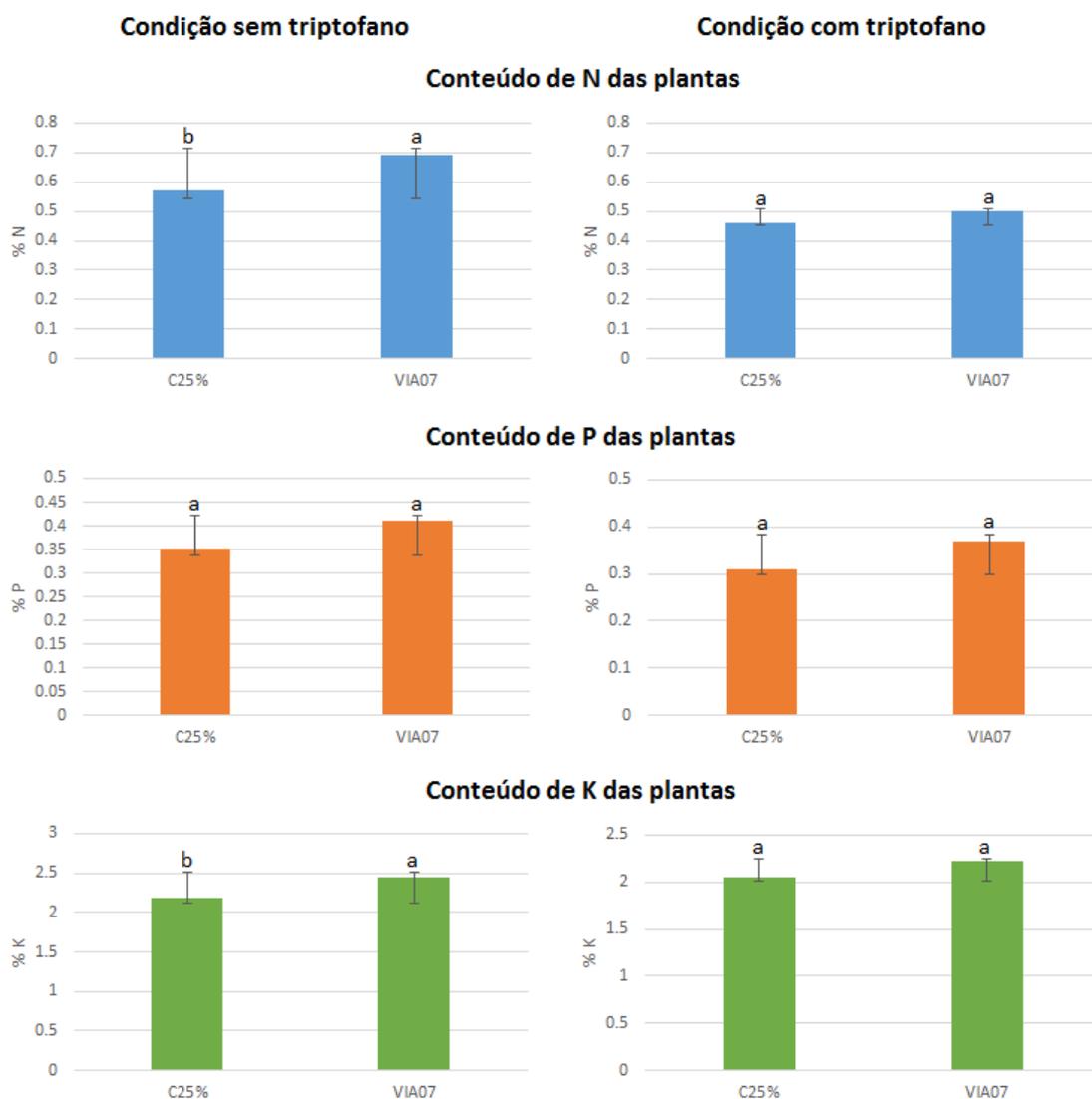


Figura 5. Influência da inoculação do isolado VIA07 e do controle não-inoculado com 25% da dose de nutrientes (C25%) na absorção de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) em plantas de sorgo após ensaio em câmara de crescimento com duração de 45 dias sob as condições sem triptofano e com triptofano. Os dados representam as médias de 7 réplicas das plantas crescidas em solo nativo. $P > 0.05$ (Teste de Tukey).

Quando comparadas com as plantas não-inoculadas que receberam 100% da dose de nutrientes, as plantas inoculadas com o isolado selecionado apresentaram aumento significativo da quantidade de fósforo em ambos os tratamentos (com e sem triptofano) e uma redução significativa da quantidade de potássio no tratamento com triptofano (Figura 6). Entretanto, dentre os aumentos de quantidade de nutrientes estatisticamente significativos observados nenhum foi extremamente destacado.

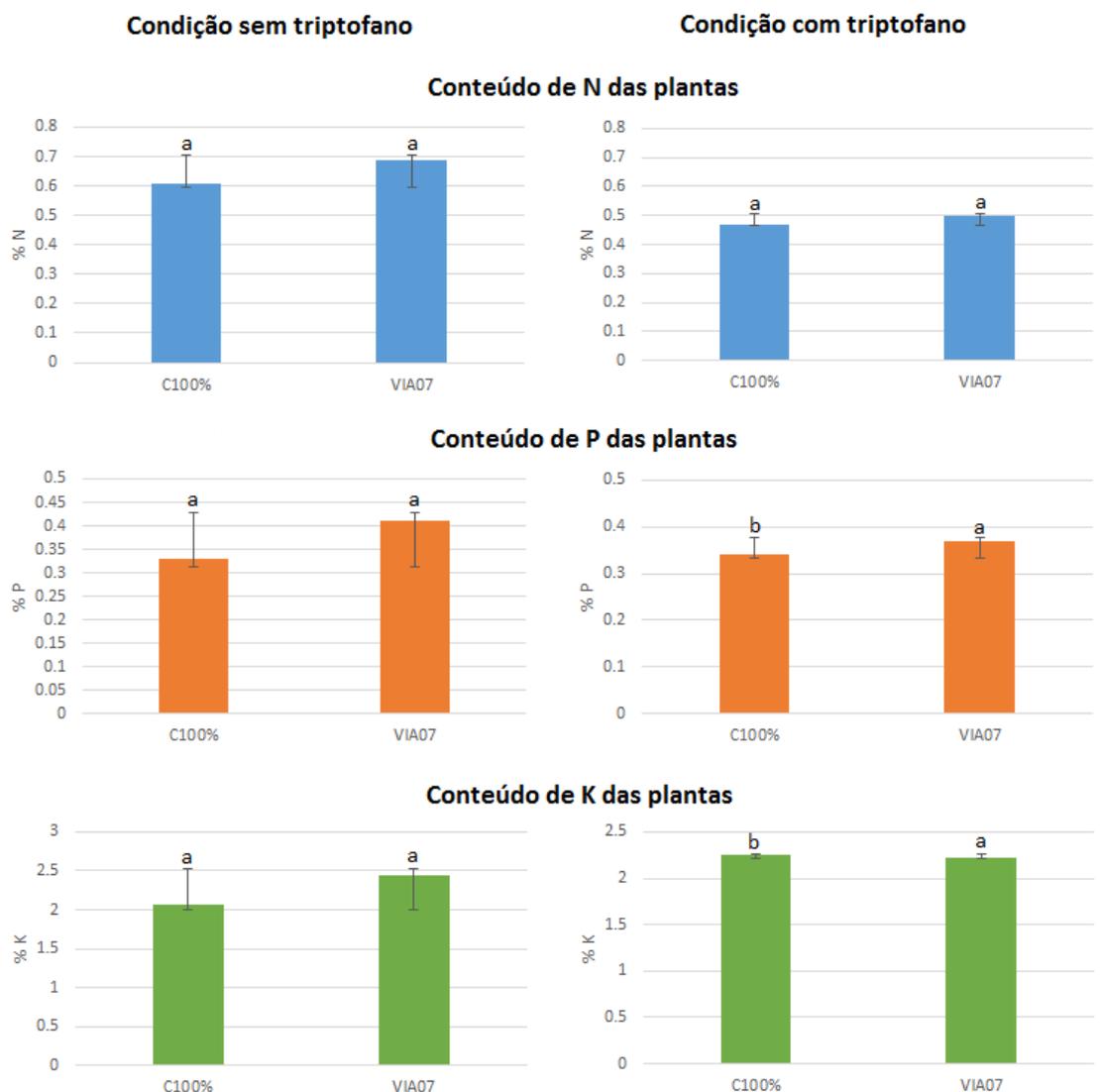


Figura 6. Influência da inoculação do isolado VIA07 e do controle não-inoculado com 100% da dose de nutrientes (C100%) na absorção de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) em plantas de sorgo após ensaio em câmara de crescimento com duração de 45 dias sob as condições sem triptofano e com triptofano. Os dados representam as médias de 7 réplicas das plantas crescidas em solo nativo. $P > 0.05$ (Teste de Tukey).

Em resumo, esse trabalho demonstrou que existem bactérias que são capazes de interagir de maneira positiva com plantas de sorgo e promoverem seu crescimento. Em particular, o isolado VIA07, identificado como pertencente à espécie *Rhizobium miluonense*, foi bastante efetivo no estímulo do crescimento da parte aérea e das raízes dessas plantas, além de promover a absorção de nutrientes fundamentais para o desenvolvimento dessas. Testes em campo poderão comprovar a eficiência desse isolado e sua utilização como inoculante para essa cultura.

Tabela S1. Características abióticas dos solos das regiões amostradas.

Regiões amostradas	P (mg/dm ³)	K (mg/dm ³)	Argila (%)	MO (%)	pH (H ₂ O)	Al (cmol _e /dm ³)	Ca (cmol _e /dm ³)	Mg (cmol _e /dm ³)
Viamão	5,4	123,0	24,0	2,2	6,0	0,0	3,3	1,4
Caxias do Sul	5,4	99,0	40,0	4,4	4,9	0,4	5,1	1,7
Taquari	3,1	96,0	36,0	2,2	4,9	1,2	1,4	0,7

* K: potássio; P: fósforo; MO: Matéria orgânica; Al: alumínio; Ca: cálcio; Mg: magnésio.

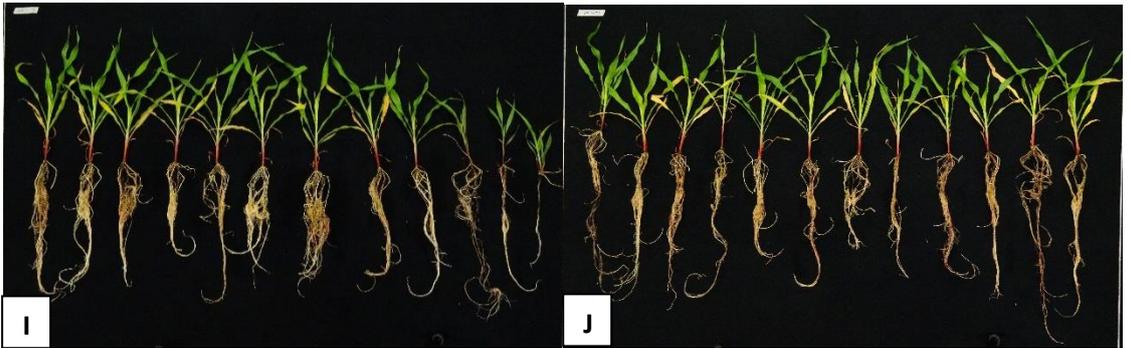
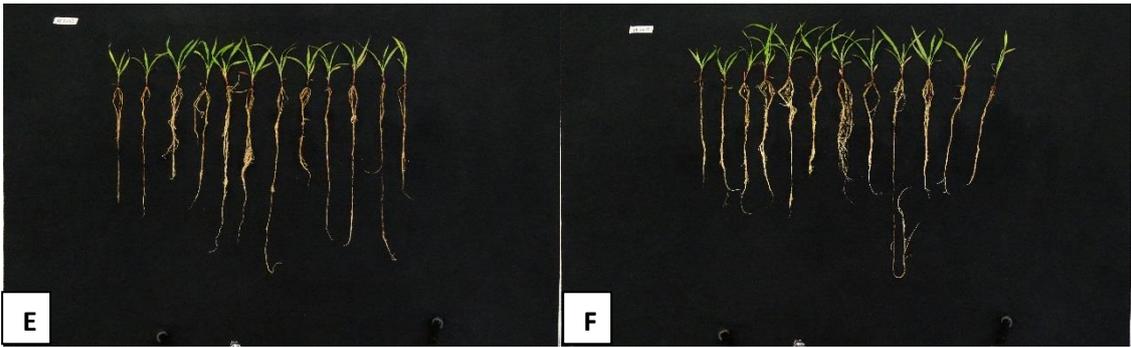
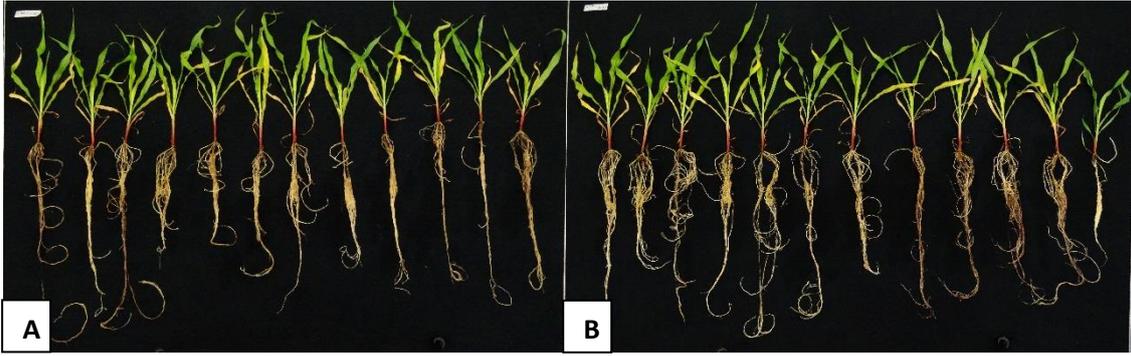


Figura S1. Plantas de sorgo do ensaio em câmara de crescimento com vermiculita e areia (1:1) e inoculação de isolados bacterianos selecionados. 3A – tratamento controle com 100% da dose de nitrogênio e sem triptofano; 3B – tratamento controle com 100% de nitrogênio e com triptofano; 3C – tratamento controle com 25% da dose de nitrogênio e sem triptofano; 3D – tratamento controle com 25% de nitrogênio e com triptofano; 3E – tratamento inoculado com isolado 19 e sem triptofano; 3F – tratamento inoculado com isolado 19 e com triptofano; 3G – tratamento inoculado com isolado 63 e sem triptofano; 3H – tratamento inoculado com isolado 63 e com triptofano; 3I – tratamento inoculado com isolado 07 e sem triptofano; 3J – tratamento inoculado com isolado 07 e com triptofano.

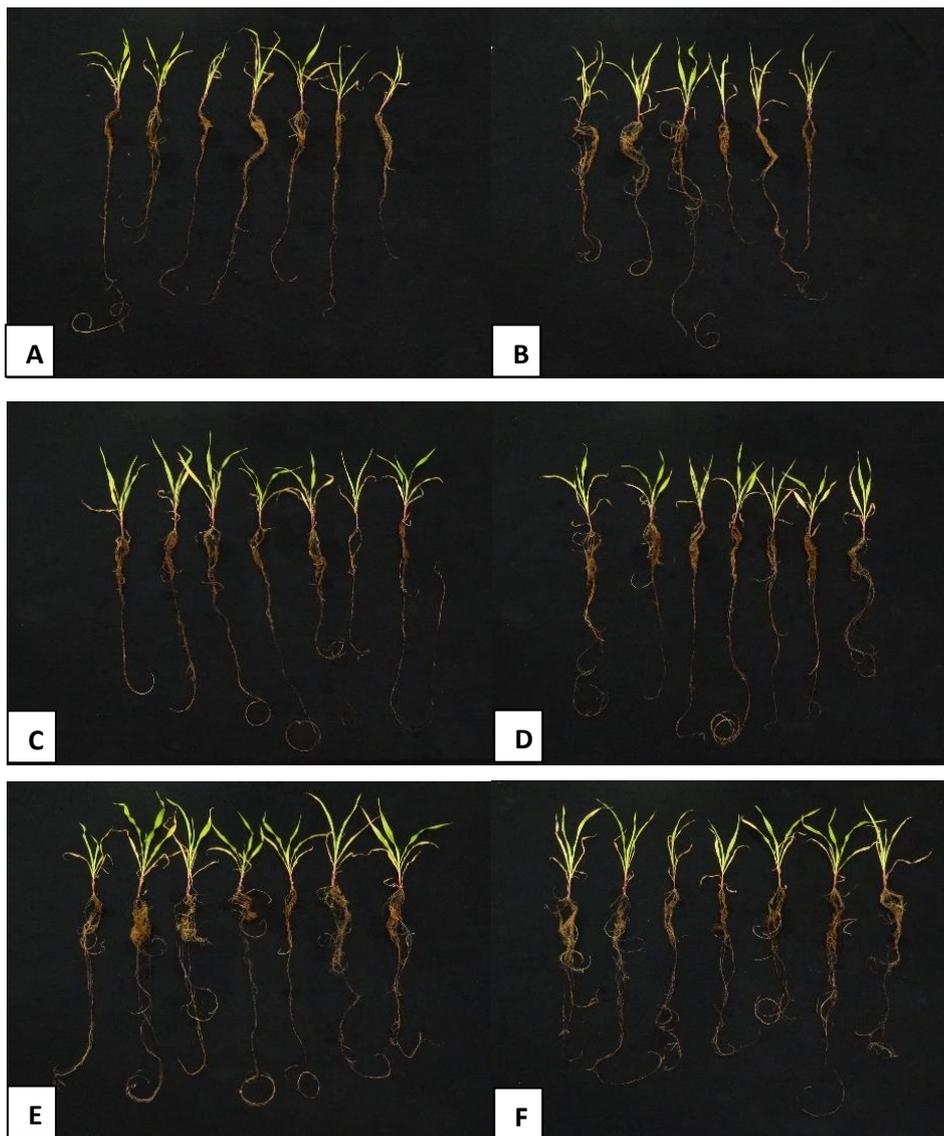


Figura S2. Plantas de sorgo do ensaio em câmara de crescimento com solo e inoculação de isolado bacteriano selecionado. 4A – tratamento controle com 100% da dose de nitrogênio e sem triptofano; 4B – tratamento controle com 100% de nitrogênio e com triptofano; 4C – tratamento controle com 25% da dose de nitrogênio e sem triptofano; 4D – tratamento controle com 25% de nitrogênio e com triptofano; 4E – tratamento inoculado com isolado 07 e sem triptofano; 4F – tratamento inoculado com isolado 07 e com triptofano.

Referências Bibliográficas

Alami Y; Achouak W; Marol C; Heulin T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3393-3398, 2000.

Ambrosini A, Beneduzi A, Stefanski T, Pinheiro F.G, Vargas L.K, Passaglia L.M.P. Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Soil* 356:245–264, 2012.

Asgar HN; Zahir ZA; Arshad M; Khaliq A. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica jucea* L. *Biol. Fertil. Soil* 35:231-237, 2002.

Bashan Y, de-Bashan L, Prahbu S.R, Hernandez J.P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil* 378:1–33, 2014.

Bazarani, O., Friedman, J. Effect of exogenously applied L-tryptophan allelochemical activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Journal of Chemical Ecology*, Vol.26, No.2, 2000.

Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L.K., Bodanese-Zanettini, M.H., Passaglia, L.M.P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 39:311-320, 2008.

Chen Y, Fan J.B, Du L, Xu H, Zhang Q.Y, He Y.Q. The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. *Appl Soil Ecol* 84:235-244, 2014.

Contesto C, Milesi S, Mantelin S, Zancarini A, Desbrosses G, Varoquaux F, Bellini C, Kowalczyk M, Touraine B (2010) The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta* 232:1455–1470, 2010.

Costa P, Beneduzi A, Souza R, Schoenfeld R, Vargas LK and Passaglia LMP. The effects of different fertilization conditions on bacterial plant growth promoting traits: Guidelines for directed bacterial prospection and testing. *Plant Soil* 368:267-280, 2013.

Costa, P.B.d., Granada, C.E., Ambrosini, A., Moreira, F., de Souza, R., dos Passos, J.F.M., Arruda, L., Passaglia, L.M.P. A model to explain plant growth promotion traits: a multivariate analysis of 2211 bacterial isolates. *PLoS One* 9, 2014.

Dimkpa C.O, Merten D, Svatos A, Büchel G., Kothe E. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J Appl Microbiol* 5:687-1696, 2009.

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

Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E.C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17, 7843– 7853, 1989.

EMBRAPA Milho e Sorgo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Sorgo/CultivodoSorgo/> 9ª edição, Jul/2015.

Estrada G.A, Baldani V.L.D, Oliveira D.M, Urquiaga S., Baldani J.V. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil* 369:115-129, 2013.

Felske A, Wolterink A, Van Iis R, de Vos WM, Akkermans ADL. Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30:137-145, 1999.

Giacomodonato, M.N., Pettinari, M.J., Souto, G.I., Méndez, B.S., López, N.I. A PCR-based method for the screening of bacterial strains with antifungal activity in suppressive soybean rhizosphere. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Volume 17, Issue 1, pp 51–55, 2001.

Glickmann, E., Dessaux, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 793– 796, 1995.

Granada C, Costa P.B, Lisboa B.B, Vargas L.K., Passaglia L.M.P. Comparison among bacterial communities present in arenized and adjacent areas subjected to different soil management regimes. *Plant Soil* 373:339-358, 2013.

Haggag W.M., Timmusk S. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *J Appl Microbiol* 104:961–969, 2008.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology Journal.*; 2:95-108, 2004.

Hungria M, Nogueira MA and Araujo RS. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: Strategies to improve sustainability. *Biol Fertil Soils* 49:791-801, 2013.

Jaillais Y, Chory J. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat Struct Mol Biol.* 17(6): 642–645, 2010.

Kahindy, J.H.P.; Woome, P., George, T.; Moreira, F.M.S.; Karanja, N.K.; Giller, K.E. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem functioning in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. *Applied Soil Ecology*, v.6, p.55-76, 1997.

Kai, M., Piechulla, B. Impact of volatiles of the rhizobacteria *Serratia odorifera* on the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Signal. Behav.* 5, 444–446, 2010.

Loaces I, Ferrando L., Scavino A.F. Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. *Microb Ecol* 61:606-618, 2011.

Ludwig-Muller J., Epstein E. Occurrence and in vivo biosynthesis of indole-3-butyric acid in corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.* 97: 765–770, 1991.

Malusá, E; Sas-Paszt, L.; Ciesielska, J. Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 491206, 12p, 2012.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, <http://www.agricultura.gov.br/>

Nagel, M., Andreesen, J.R. *Bacillus niacini* sp. nov., a Nicotinate-Metabolizing Mesophile Isolated from Soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 41: 134-139, 1991.

Panhwar, Q.A., O. Radziah, M. Sariah and I. Mohd Razi. Solubilization of phosphate forms by phosphate solubilizing bacteria isolated from aerobic rice. *Int. J. Agric. Biol.*, 11: 667–673, 2009.

Pontes, A. P., Souza, R. de, Granada, C. E., Passaglia, L.M.P. Screening of plant growth promoting bacteria associated with barley plants (*Hordeum vulgare* L.) cultivated in South Brazil. *Biota Neotropica*, 15(2), e20140105, 2015.

Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., and Paré, P. W. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134, 1017–1026, 2004.

Sanginga N, Danso SKA, Mulongoy K, Ojeifo AA. Persistence and recovery of introduced *Rhizobium* 10 years after inoculation on *Leucaena leucocephala* grown on an Alfisol in Southwestern Nigeria. *Plant Soil* 159:199–204, 1994.

Santner A, Estelle M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. 459:1071-1078, 2009.

Sarwar M, Kremer R.J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Lett. Appl. Microbiol.* 20:282-285, 1992.

Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160:47-56, 1987.

Seldin L, van Elsas JD, Penido EGC. *Bacillus* nitrogen fixers from Brazilian soils. *Plant Soil* 70:243-255, 1983.

Seneviratne G, Zavahir JS., Bandara WMMS., Weerasekara MLAW. Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, no. 6, pp.739–743, 2008.

Souza, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., Costa, P.B., Meyer, J., Vargas, L.K., Schoenfeld, R., Passaglia, L.M.P. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on

the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant Soil* 366:585-603, 2013.

Souza, R. de; Ambrosini, A; Passaglia, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 401-419, Dec. 2015.

Spaepen, S., Vanderleyden J., Remans, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425-448, 2007.

Stackebrandt, E., Liesack, W. Nucleic acids and classification. In *Handbook of New Bacterial Systematic*, pp. 151– 194. Eds M. Goodfellow and A. O'Donnell. London, UK: Academic Press, 1993.

Stepanovic S., Vukovic D., Hola V., Bonaventura G.D., Djukic S.; Cirkovic I., Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115, 891–899, 2007.

Sylvester-Bradley R, Asakawa N, La torraca S, Magalhães FMM, Oliveira L, Pereira R.M. Levantamento quantitativo de micro-organismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazônica* 12:15-22, 1982.

Teale, W.D., Paponov, I.A., Palme, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, vol. 7, 2006.

Vespermann, A., Kai, M., and Piechulla, B. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5639–5641, 2007.

4. Considerações finais e Perspectivas

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que o isolado bacteriano selecionado se mostrou bastante promissor como um promotor de crescimento de sorgo. Quando testado em um substrato estéril, sem a presença de qualquer outro micro-organismo, as plantas inoculadas, que haviam recebido apenas 25% da dose de nutrientes, tiveram um crescimento equivalente ao das plantas não-inoculadas que receberam 100% da dose de nutrientes.

Quando testado em solo, este isolado proporcionou um crescimento considerado significativo das plantas de sorgo. Este fato demonstra que a bactéria foi capaz de competir com os demais micro-organismos presentes no solo e se manteve ativa beneficiando a planta. Além disso, foi possível observar, em ambos os ensaios realizados, que a utilização do isolado bacteriano proporciona uma economia no uso de fertilizantes químicos e uma consequente redução de impactos ambientais, visto que sua utilização permite uma redução de 75% da dose de nutrientes aplicada. O isolado também estimulou a absorção de macro nutrientes pelas plantas, o que certamente colabora para a sua ação de promoção de crescimento vegetal.

Este isolado foi identificado com pertencente ao gênero *Rhizobium*, que tradicionalmente associa-se a plantas leguminosas. Entretanto, tem sido relatado recentemente a capacidade de associação de bactérias deste gênero com gramíneas como o arroz, o trigo e a cevada (Iyer e Rajkumar 2017). Este estudo demonstra que com o sorgo este tipo de relação também pode ocorrer.

Outro resultado interessante deste estudo também indica uma economia na produção de grãos. O excesso no suprimento de triptofano mostrou-se ser capaz de reduzir o crescimento das plantas. No caso de um resultado contrário, a necessidade de adição de triptofano a um inoculante tornaria o seu processo de produção mais oneroso e, por consequência, o preço do produto final seria mais elevado.

Após a escolha do micro-organismo, pode-se trabalhar na formulação do inoculante comercial. Para o sucesso deste produto é muito importante a escolha do carreador mais adequado, o qual vai conduzir os micro-organismos ao seu local de ação. Dentre as alternativas mais promissoras está a utilização de biopolímeros, que proporcionam proteção aos micro-organismos contra fatores bióticos e abióticos e sua liberação gradual junto das sementes. Uma vez obtida uma formulação, esta será testada em um ensaio a campo, no qual se observará se o inoculante produzido refletirá em um aumento na produtividade de sorgo.

5. Referências bibliográficas

Alami Y; Achouak W; Marol C; Heulin T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3393-3398, 2000.

Albareda M; Rodriguez-Navarro D.N; Camacho M; Temprano F.J. Alternative to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. *Soil Biol Biochem* 40:2771–2779, 2008.

Bashan Y, Hernandez J.P, Leyva L.A, Bacilio M. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol Fertil Soils* 35:359–368, 2002.

Bashan Y, de-Bashan L, Prahbu S.R, Hernandez J.P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil* 378:1–33, 2014.

Bernabeu, P.R., García, S.S., López, A.C., Vio, S.A., Carrasco, N., Boiardi, J.L., Luna, M.F. Assessment of bacterial inoculant formulated with *Paraburkholderia tropica* to enhance wheat productivity. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018.

Chen Y, Fan J.B, Du L, Xu H, Zhang Q.Y and He Y.Q. The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. *Appl Soil Ecol* 84:235-244, 2014.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 12 de outubro de 2017

Conley, S.P., Christmas, E.P. Utilizing inoculants in a corn-soybean rotation. *Purdue Agronomy*, Purdue University, 2015.

Contesto C, Milesi S, Mantelin S, Zancarini A, Desbrosses G, Varoquaux F, Bellini C, Kowalczyk M, Touraine B. The auxin-signaling pathway is required for the lateral root

response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta* (2010) 232:1455–1470, 2010.

Dimkpa C.O, Merten D, Svatos A, Büchel G and Kothe E. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J Appl Microbiol* 5:687-1696, 2009.

Diniz, G.M.M. Produção de Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) Aspectos Gerais. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife, PE, 2010.

EMBRAPA Milho e Sorgo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Sorgo/CultivadoSorgo/> **9ª edição**, Jul/2015

Estrada G.A, Baldani V.L.D, Oliveira D.M, Urquiaga S., Baldani J.V. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil* 369:115-129, 2013.

Figueiredo M.V.B. Tecnologias potenciais para uma agricultura sustentável. Recife, PE: Instituto Agrônomo de Pernambuco – Ipa/Emater/Seagri-AL, 1ª edição, 356p, 2013.

Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Rev. Microbiol.* 8, 623-633, 2010.

Gray E.J, Smith D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* 37, 395-412, 2005.

Haggag W.M., Timmusk S. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *J Appl Microbiol* 104:961–969, 2008.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology Journal.*; 2:95-108, 2004.

Hungria M, Nogueira M.A, Araujo R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: Strategies to improve sustainability. *Biol Fertil Soils* 49:791-801, 2013.

Iyer, B., Rajkumar, S. Host specificity and plant growth promotion by bacterial endophytes. *Current Research in Microbiology and biotechnology*, vol. 5, No. 2: 1018-1030, 2017.

Jaillais Y, Chory J. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat Struct Mol Biol.* 17(6): 642–645, 2010.

Jameson P.E. Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions - An overview. *Plant Growth Reg* 32: 369–380, 2000.

Jayaraman D, Gilroy S, Ane J.M. Staying in touch: mechanical signals in plant–microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol* 20:104–109, 2014.

Keiluweit M, Bougoure J.J, Nico P.S, Pett-Ridge J, Weber P.K, Kleber M. Mineral protection of soil carbon counteracted by root exudates. *Nat Clim Chang* 5:588–595, 2015.

Loaces I, Ferrando L, Scavino A.F. Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. *Microb Ecol* 61:606-618, 2011.

Ludwig-Muller J., Epstein E. Occurrence and in vivo biosynthesis of indole-3-butyric acid in corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.* 97: 765–770, 1991.

Malusá, E; Sas-Paszt, L.; Ciesielska, J. Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 491206, 2012.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento,
<http://www.agricultura.gov.br/>

Morais, T.P., Brito, C.H., Brandão, A.M., Rezende, W.S. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, n. 2, p. 290-298, 2016.

Morris, C.E.; Monier, J.M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 41:429–453, 2003.

Morshed, M.H., Hossain, M.S., Habib, M.A., Ahmed, M.M., Ibrahim, M., Ali, M.U., Islam, M.A. The effect of plant hormone indole acetic acid (IAA) on hematological and biochemical parameters in mice. *Bangladesh J Physiol Pharmacol*, 21(1/2): 5-8, 2006.

Nurmiaho-Lassila, E.L., Timonen S, Haahtela K, Sen R. Bacterial colonization patterns of intact *Pinus sylvestris* mycorrhizospheres in dry pine forest soil: an electron microscopy study. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 1017–1035, 1997.

Patten C.L., Glick B.R. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Canadian J Microbiol* 48: 635–642, 2002.

Rafique M., Hayat K., Mukhtar T., Amna, Khan A.A., Afridi M.S., Hussain T., Suntan T., Munis M.F.H., Imran M; Chaudhary H.J. Bacterial biofilm formation and its role against agricultural pathogens. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, A. Méndez-Vilas, Ed. 2015.

Reineke, G., Heinze, B., Schirawski, J., Buettner, H., Kahmann, R., Basse, C.W. Indole3acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Mol Plant Pathol* 9:339-55, 2008.

Reis, V.M., Pereira, W., Hipólito, G.S. Métodos de aplicação de bactérias diazotróficas em cana-planta para fins de determinação de eficiência agronômica. Comunicado Técnico 118 Embrapa, Seropédica, RJ, 2009.

Santner A, Estelle M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. 459:1071-1078, 2009.

Seneviratne G, Zavahir J.S., Bandara W.M.M.S., Weerasekara M.L.A.W. Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, no. 6, pp.739–743, 2008.

Silva, A.F. Sistema Embrapa de produção agroindustrial de sorgo sacarino para bioetanol: Sistema BRS1G – Tecnologia Qualidade Embrapa. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo.120 p., 2012.

Simon, S., Petrásek, J. Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science* 180, 454–460, 2011.

Spaepen S, Vanderleyden J and Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425-448, 2007.

Sutherland I.W. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3-9, 2001.

Scarcella, A. S. A.; Bizarria, J., Bastos, R., Gaspar, R.. Temperature, pH and carbon source affect drastically indole acetic acid production of plant growth promoting yeasts. *Braz. J. Chem. Eng.*, vol.34, n.2, pp.429-438, 2017.

Souza, R. de; Ambrosini, A; Passaglia, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.

Teale, W.D., Paponov, I.A., Palme, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, vol. 7, 2006.

Vogel, G.F., Martinkoski, L., Bittencourt, H.V.H., Grillo, J.F. Agronomic performance of *Azospirillum brasilense* on wheat crops. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science*, Guarapuava-PR, v.6, n.3, p.111-119, 2013.

Zhao, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol.* June 2; 61: 49–64, 2010.