

Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro

Occurrence of diazotrophic bacteria associated with forage sorghum cultivars

Clarissa Bergamaschi¹ Luiz Fernando Würdig Roesch¹ Patrícia Dörr de Quadros¹
Flávio Anastácio de Oliveira Camargo¹

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a ocorrência de bactérias diazotróficas associadas ao sorgo, selecionar cultivares eficientes na associação com bactérias diazotróficas e identificar os isolados mais eficientes em fixar nitrogênio atmosférico (N_2) e produzir ácido indol-acético (AIA). Utilizaram-se 14 cultivares de sorgo forrageiro em vasos, com dois níveis de N: 0 e 130kg ha⁻¹ de N. A seleção de cultivares foi baseada na associação com bactérias diazotróficas e na eficiência de absorção de nitrogênio das cultivares. Para o isolamento das bactérias, foram utilizados diferentes meios de enriquecimento semi-sólido e, após o isolamento, foram quantificadas a produção de AIA e a quantidade de N_2 fixada pelos isolados. A ocorrência de bactérias diazotróficas foi constatada em todas as cultivares avaliadas sendo que a distribuição das bactérias isoladas foi influenciada pelo genótipo da planta. Todos os isolados foram aptos em fixar N_2 e produzir AIA *in vitro*.

Palavras-chave: bactérias fixadoras de nitrogênio, produção de ácido indol-acético.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the occurrence of diazotrophic bacterial associated with sorghum plants, to select efficient sorghum cultivars associated with diazotrophic bacterial, as well as to identify isolates efficient on nitrogen fixation (N_2) and indole acetic acid (IAA) production. Fourteen forage sorghum cultivars were cropped in jars under two levels of nitrogen fertilization: 0 and 130kg ha⁻¹ of N. The selection of sorghum cultivars was based on the association with diazotrophic bacterial and on the efficiency of nitrogen absorption. Semi-solid enrichment medium was used for the isolation of the diazotrophic bacterial. The occurrence of diazotrophics was verified in all cultivars of sorghum evaluated and, the distribution of the isolates was affected by the plant genotype. All the isolates were able to fix N_2 and to produce IAA *in vitro*.

Key words: nitrogen fixing bacteria, indole acetic acid production.

INTRODUÇÃO

No Brasil, os produtores de sorgo costumam ter grandes gastos com fertilizantes nitrogenados todos os anos. Além do alto custo, a adubação nitrogenada pode ainda provocar danos ao ambiente, podendo afetar a sustentabilidade do agroecossistema. No solo, destaca-se a presença de bactérias diazotróficas, que são microrganismos que realizam a conversão enzimática do nitrogênio gasoso em amônia. Além da fixação biológica de nitrogênio (FBN), alguns desses microrganismos também produzem substâncias promotoras de crescimento de plantas (PCPs). Com isto, reduzem-se custos com adubação nitrogenada e minimizam-se os danos ao ambiente.

Pesquisas demonstraram que a inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de sorgo promove respostas significativas. Inoculando o gênero *Azoarcus* em plantas de sorgo para avaliar a FBN, STEIN et al. (1997) observaram considerável atividade de fixação de nitrogênio, estimada em 10,7% do N da parte aérea e 2% do N da raiz. Contudo, esse potencial de fixação depende da interação das bactérias com o genótipo da planta, dos fatores abióticos do meio e da competitividade com os demais microrganismos do local. Portanto, a interação bactéria-gramínea, em termos de potencialidade agrônoma como fixadoras de N_2

¹Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: fcamargo@ufrgs.br.

ou como produtoras de PCPs, depende desse grau de associação.

Estudos demonstraram que o genótipo da planta pode influenciar o tamanho e a composição da comunidade microbiana através dos exudatos liberados pelas raízes, que exercem papel chave no estímulo seletivo dos microrganismos. BODDEY et al. (1991) comprovaram que uma mesma bactéria pode ter diferentes graus de atividades da nitrogenase, quando inoculada em diferentes genótipos de sorgo, demonstrando que há uma estreita associação entre planta e bactéria.

Para desenvolver práticas viáveis ao aproveitamento desses microrganismos na cultura de sorgo, é necessário avaliar diferentes genótipos de sorgo em relação à resposta à adubação nitrogenada e à associação com bactérias diazotróficas específicas. Deste modo, o presente estudo objetivou avaliar a ocorrência de bactérias diazotróficas associadas à cultivares de sorgo atualmente utilizadas no Rio Grande do Sul, selecionar as cultivares mais eficientes na associação com bactérias diazotróficas, assim como identificar os isolados mais eficientes em fixar nitrogênio e produzir ácido indol-acético.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em vasos, ao ar livre, durante 59 dias. Os vasos continham solo proveniente do horizonte superficial de um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico arênico (EMBRAPA, 1999). Este solo apresentava as seguintes características: pH (H₂O) 5,0, 130g kg⁻¹ de argila, 5g kg⁻¹ de matéria orgânica, 2,9mg L⁻¹ de P, 19mg L⁻¹ de K, 0,2cmol_c L⁻¹ de Al trocável, 0,5cmol_c L⁻¹ de Ca trocável, 0,3cmol_c L⁻¹ de Mg trocável, 1,6cmol_c L⁻¹ de H + Al, 2,4cmol_c L⁻¹ de CTC e 35% de saturação por bases, segundo metodologia descrita em TEDESCO et al. (1995).

A adubação foi baseada na análise físico-química do solo e na Recomendação de Adubação e Calagem para o Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CAFS-RS/SC, 2004). Aplicaram-se 86,4mg L⁻¹ de P₂O₅ e 194,4mg L⁻¹ de K₂O por vaso na forma de solução nutritiva de KH₂PO₄, correspondendo a 48kg ha⁻¹ de fósforo e 108kg ha⁻¹ de potássio. Para o tratamento com nitrogênio, foram aplicados 40, 76 e 76mg de N por vaso na semeadura, aos sete e 21 dias após a emergência das plantas, respectivamente. O nitrogênio foi aplicado sob a forma de solução nutritiva, correspondendo a um total de 130kg ha⁻¹ de nitrogênio.

Aos 53 dias após a emergência, foi efetuada a colheita da parte aérea das plantas de todos os

tratamentos. A matéria seca da parte aérea das cultivares de sorgo foi analisada quanto ao conteúdo de nitrogênio total determinado a partir da digestão sulfúrica do tecido vegetal (TEDESCO et al., 1995). A seleção de cultivares de sorgo foi baseada na associação com bactérias diazotróficas e na eficiência de absorção de nitrogênio. A associação com bactérias diazotróficas foi estimada com base na diversidade de gêneros bacterianos isolados das cultivares de sorgo. A eficiência de absorção de nitrogênio foi calculada pela razão entre a diferença na quantidade de N das plantas com e sem adubação nitrogenada e a quantidade de N mineral aplicado nos tratamentos que receberam esse nutriente.

O isolamento de bactérias diazotróficas foi realizado segundo DÖBEREINER et al. (1995), em amostras de raízes das plantas sem aplicação de nitrogênio. Amostras de 10g de raízes foram trituradas com solução salina e feitas diluições seriadas de 10⁻² e 10⁻³. As amostras foram inoculadas nos meios de enriquecimento semi-sólidos NFB, JNFB e JMV, utilizados para o isolamento de *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, respectivamente. Os meios de cultura foram incubados a 28°C até a formação de película característica (cerca de sete dias). Após a formação de película, parte dela foi transferida para placas contendo meio sólido de enriquecimento para cada microrganismo a ser isolado, acrescido de 20mg de extrato de levedura. Para a purificação, as colônias formadas no meio sólido foram novamente transferidas para meios de cultura semi-sólidos e, após isso, transferidas para placas de Petri contendo meio Ágar-Batata (BALDANI & DÖBEREINER, 1980). Uma vez isoladas, as colônias foram armazenadas em microtubos contendo uma mistura de leite em pó + glicerol e congeladas a -18°C. Para identificar o provável gênero bacteriano, observaram-se características morfológicas das colônias em placas de Petri, tais como forma, bordos, coloração, textura e mudança de pH, em dois diferentes meios de cultura (DÖBEREINER et al., 1995).

Para quantificar o nitrogênio total fixado pelos isolados, alíquotas de 70µL da mistura de leite + glicerol foram inoculados em tubos contendo caldo nutritivo Dygs e incubadas sob agitação de 140g por 24h. Após isso, o número de células foi padronizado em espectrofotômetro, em densidade ótica de 0,2, com comprimento de onda de 600nm. Uma vez padronizadas as amostras, alíquotas de 600µL foram transferidas para meios de cultura semi-sólidos (três repetições) e incubadas em estufa a 28°C por 72h. Como controle, foi utilizado meio de cultura semi-sólido esterilizado não-inoculado. Após a incubação, alíquotas de 500µ de cada amostra foram tomadas para a quantificação

de proteínas, segundo BRADFORD (1976). Como padrão de comparação entre isolados, utilizou-se a estirpe *Azospirillum brasilense* Sp7 (ATCC 29145). O nitrogênio total foi quantificado após digestão sulfúrica e destilação com NaOH 10mol L⁻¹ (TEDESCO et al., 1995).

Para verificar a produção de ácido indolacético (AIA), 70µL da mistura do leite + glicerol foram inoculados em tubos contendo caldo nutritivo Dygs e incubados sob agitação de 140g por 24h. Após isso, o número de células foi padronizado em espectrofotômetro a uma densidade ótica de 0,3, a um comprimento de onda de 600nm. Erlenmeyers contendo 25mL de caldo nutritivo Dygs foram inoculados com 600µL das culturas. Os meios foram incubados sob agitação de 140g, a 30°C, por 72h. Foi utilizada como padrão a estirpe *Azospirillum brasilense* Sp7 (ATCC 29145). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 8.000g por 15 minutos e, em seguida, 3mL do sobrenadante foram adicionados a 2mL do reagente de Salkowski (2mL de FeCl₃ 0,5mol L⁻¹ + 98mL de HClO₄ 35 %). Após 30 minutos, a intensidade da cor foi mensurada em espectrofotômetro a 550nm. A curva padrão continha o caldo nutritivo esterilizado e quantidades conhecidas de AIA. A quantidade de AIA produzida foi calculada através da equação ($y = 0,0188x + 0,0003$; onde $y = [AIA]$ e $x =$ intensidade da cor mensurada em espectrofotômetro a 550nm), cujos limites de detecção foram 1,0 a 50µg mL⁻¹ de AIA. Foram tomados 500µL de cada amostra para quantificar proteínas, segundo metodologia de BRADFORD (1976).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott para comparação de médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 76 isolados de três meios de enriquecimento: NFb, JNFb e JMV. Uma matriz binária foi elaborada a partir de características das colônias dos isolados. A partir destas características, verificou-se que, de quatro grupos formados, três apresentaram 100% de similaridade com as estirpes padrão *Herbaspirillum seropedicae* Z67 (ATCC 35892), *Azospirillum brasilense* Sp7 (ATCC 29145) e *Burkholderia tropica* Ppe8 (ATCC BAA-831) (Figura 1).

O isolamento de bactérias mostrou que as 14 cultivares de sorgo forrageiro testadas foram aptas na associação com bactérias diazotróficas e, de acordo com a análise de similaridade, os isolados provavelmente pertencem aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Estes resultados estão de acordo com pesquisas anteriores, que

demonstraram a presença destes gêneros de bactérias em plantas de sorgo (BALDANI et al., 1986; CHIARINI et al., 1998; BASHAN et al., 2004).

Considerando a presença de bactérias diazotróficas nas 14 cultivares de sorgo analisadas, verificou-se que todas as cultivares estiveram associados a bactérias diazotróficas (Tabela 1). “Fepagro RS 18”, “Past 76” e “BR 601” apresentaram a maior diversidade, de acordo com os índices de Shannon-Weaver e Simpson (Tabela 1). Os resultados indicam que o genótipo da planta exerce efeitos diferenciais na colonização por estas bactérias, o que pode ser devido à composição química dos exudatos liberados pelas plantas, a qual pode variar entre genótipos (KIPE-NOLT et al., 1985). Segundo GRAYSTON et al. (1998), a variedade destes compostos liberados influencia a diversidade de microrganismos presentes na rizosfera. Assim sendo, a variação na diversidade de organismos isolados nas diferentes cultivares de sorgo pode ser explicada pela especificidade que ocorre entre planta e bactéria.

A produção de matéria seca e o teor de nitrogênio total das cultivares de sorgo aumentaram com a adubação nitrogenada (Tabela 2). As maiores produções de matéria seca foram observadas nas cultivares “BR 610”, “1 F 305”, “BRS 800” e “Fepagro 19”, quando foram aplicados 130kg ha⁻¹ de N. Quanto ao nitrogênio total no tecido das plantas, as cultivares “BRS 800”, “1 F 305”, “BR 610”, “Fepagro 19” e “855 F” foram as que apresentaram os maiores valores, com aplicação de nitrogênio (Tabela 2). A eficiência relativa de aproveitamento do nitrogênio aplicado variou entre cultivares (Tabela 2). Tal resposta pode ser atribuída a diferenças genéticas das cultivares (FERNANDES et al., 1991). Nos tratamentos em que não foi aplicado nitrogênio mineral, verificou-se uma baixa produção de matéria seca e acúmulo de N pelas cultivares testadas. Tais resultados podem indicar que a população de bactérias diazotróficas naturalmente associada a plantas de sorgo apresentou uma baixa fixação biológica de nitrogênio, insuficiente para refletir em aumento de matéria seca e nitrogênio total no tecido das plantas.

Embora não se tenha observado grandes incrementos na produção de matéria seca e no acúmulo de N no tecido das plantas quando não foi aplicado nitrogênio, de acordo com os resultados obtidos, as cultivares “Fepagro RS 18”, “Past 76” e “BR 601” mostraram-se promissoras para futuros estudos, considerando sua aparente eficiência na associação com bactérias diazotróficas. Para essas cultivares, observou-se elevada diversidade de bactérias diazotróficas associadas, nas quais foram isoladas bactérias dos meios de cultura JMV, JNFb e NFb.

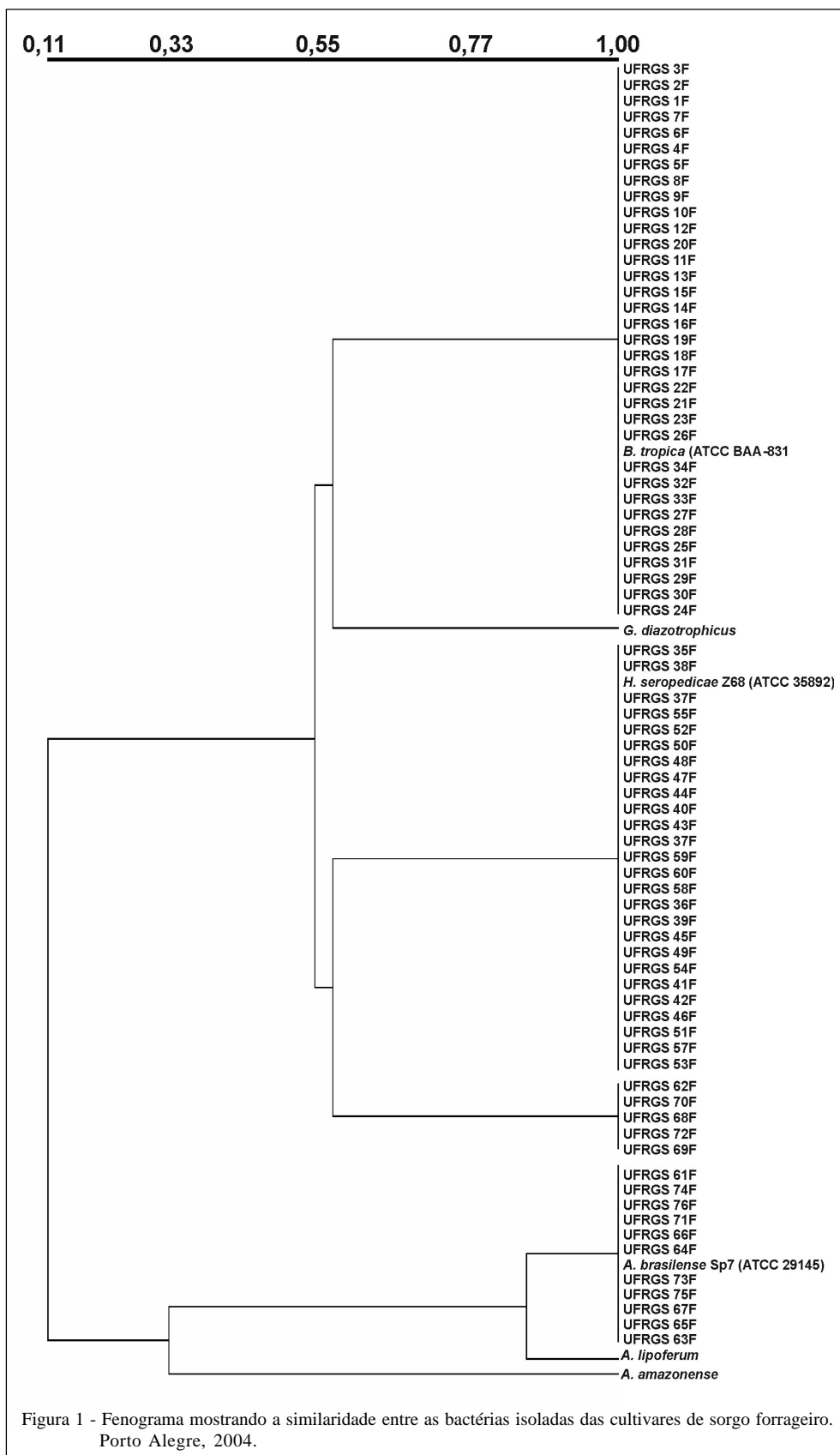


Tabela 1 - Índices de diversidade entre comunidades isoladas das cultivares de sorgo forrageiro do tratamento sem nitrogênio. Porto Alegre, 2004.

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

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

Os resultados da quantificação do nitrogênio atmosférico fixado pelas bactérias isoladas das cultivares de sorgo forrageiro (Tabela 3) variaram de 3,78 $\mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (isolado UFRGS21F) a 229,72 $\mu\text{g N mg proteína}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (isolado UFRGS62F). As

bactérias UFRGS62F, UFRGS60F e UFRGS55F foram as que mais fixaram N_2 *in vitro*.

Os valores da quantificação de AIA das bactérias isoladas (Tabela 3) variaram de 0,70 $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$ (isolado UFRGS19F) a 10,70 $\mu\text{g AIA mg}$

Tabela 2 - Matéria seca e quantidade de N acumulado na parte aérea das plantas de sorgo forrageiro avaliadas aos 53 dias após a emergência. Porto Alegre, 2004. (Médias de duas plantas por vaso e três repetições).

Cultivar	Matéria seca		Nitrogênio total		Eficiência relativa de aproveitamento do N
	Adubação nitrogenada (kg de N ha ⁻¹)				
	0	130	0	130	
	----- g planta ⁻¹ -----		----- mg N planta ⁻¹ -----		%
1 F 305	1,08 A b	8,49 A a	4,51 B b	54,18 A a	25,87
Fepagro RS 12	0,98 A b	5,73 B a	4,51 B b	33,57 C a	14,19
Fepagro RS 17	0,70 A b	6,93 B a	4,16 B b	48,34 B a	22,66
Fepagro RS 18	0,97 A b	6,79 B a	5,40 A b	50,49 B a	23,12
Fepagro 19	0,83 A b	7,45 A a	4,25 B b	52,44 A a	24,71
Past 49 C	1,12 A b	6,97 B a	5,76 A b	50,18 B a	22,78
Past 76	0,66 A b	5,99 B a	5,51 A b	46,24 B a	20,88
Past 10	0,92 A b	6,00 B a	5,18 A b	47,08 B a	21,48
BR 610	0,92 A b	8,54 A a	5,27 A b	53,67 A a	24,81
BR 506	1,07 A b	6,47 B a	5,54 A b	46,15 B a	21,06
Fepagro RS 11	1,00 A b	6,05 B a	5,64 A b	47,39 B a	21,41
BRS 800	1,00 A b	7,72 A a	4,56 B b	55,08 A a	25,90
BR 601	0,82 A b	6,31 B a	4,82 B b	49,22 B a	22,76
855 F	1,07 A b	4,39 B a	4,32 B b	51,62 A a	24,25
CV (%)	19,56	11,27	9,91	5,86	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 3 - N fixado e produção de AIA das bactérias isoladas das cultivares de sorgo.

Isolado	N fixado	AIA	Isolado	N fixado	AIA
	$\mu\text{g N mg prote\acute{a}na}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	$\mu\text{g AIA mg prote\acute{a}na}^{-1}$		$\mu\text{g N mg prote\acute{a}na}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	$\mu\text{g AIA mg prote\acute{a}na}^{-1}$
UFRGS 1F	11,60 h	5,13d	UFRGS40F	56,07 f	3,35 e
UFRGS 2F	26,01 g	3,41e	UFRGS41F	87,92 e	5,77 c
UFRGS 3F	16,63 h	7,97b	UFRGS42F	57,79 f	4,46 d
UFRGS 4F	20,54 h	1,87f	UFRGS43F	56,07 f	4,46 d
UFRGS 5F	43,83 g	3,02e	UFRGS44F	87,92 e	5,87 c
UFRGS 6F	14,83 h	1,80f	UFRGS45F	57,79 f	7,65 c
UFRGS 7F	27,60 g	4,95d	UFRGS46F	56,07 f	9,19 a
UFRGS 8F	28,48 g	4,95d	UFRGS47F	87,92 e	9,30 a
UFRGS 9F	14,24 h	4,90d	UFRGS48F	57,79 f	9,30 a
UFRGS 10F	8,43 h	7,26c	UFRGS49F	56,07 f	5,61 c
UFRGS 11F	43,69 g	6,90c	UFRGS50F	87,92 e	5,69 c
UFRGS 12F	16,76 h	3,03e	UFRGS51F	80,20 e	4,77 d
UFRGS 13F	12,68 h	3,03e	UFRGS52F	67,05 f	2,35 f
UFRGS 14F	20,94 g	3,02e	UFRGS53F	49,02 f	7,86 b
UFRGS 15F	16,85 h	6,16c	UFRGS54F	83,18 e	5,24 d
UFRGS 16F	17,77 h	9,04a	UFRGS55F	223,39 a	6,94 c
UFRGS 17F	39,15 g	6,50c	UFRGS56F	196,93 b	8,97 a
UFRGS 18F	18,90 h	4,18d	UFRGS57F	82,55 e	1,56 f
UFRGS 19F	11,20 h	0,70f	UFRGS58F	159,30 c	7,16 c
UFRGS 20F	25,59 g	4,43d	UFRGS59	194,89 b	7,16 c
UFRGS 21F	3,78 h	3,02e	UFRGS60F	227,64 a	7,16 c
UFRGS 22F	16,58 h	3,02e	UFRGS61F	67,47 f	5,99 c
UFRGS 23F	19,40 h	4,43d	UFRGS62F	229,72 a	3,36 e
UFRGS 24F	20,54 h	4,36d	UFRGS63F	66,27 f	6,52 c
UFRGS 25F	32,45 g	3,61e	UFRGS64F	73,37 f	8,00 b
UFRGS 26F	11,36 h	4,69d	UFRGS65F	55,04 f	6,27 c
UFRGS 27F	27,03 g	1,75f	UFRGS66F	83,97 e	1,64 f
UFRGS 28F	21,09 h	2,71f	UFRGS67F	157,44 c	9,07 a
UFRGS 29F	35,92 g	2,86e	UFRGS68F	158,05 c	5,85 c
UFRGS 30F	20,65 h	1,69f	UFRGS69F	66,45 f	3,46 e
UFRGS 31F	24,65 g	1,63f	UFRGS70F	71,94 f	1,79 f
UFRGS 32F	13,44 h	0,80f	UFRGS71F	61,98	5,03
UFRGS 33F	10,50 h	1,63f	UFRGS72F	66,99	1,58
UFRGS 34F	36,75 g	0,80f	UFRGS73F	63,07	3,39
UFRGS 35F	72,18 f	5,66c	UFRGS74F	86,71	10,7
UFRGS 36F	69,93 f	8,84a	UFRGS75F	172,67	6,51
UFRGS 37F	97,28 e	8,84a	UFRGS76F	53,55	9,48
UFRGS 38F	78,28e	8,21 b	Sp7	102,47	1,57
UFRGS 39F	82,73e	3,35 e	CV(%)	13,3	19,21

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

proteína⁻¹ (isolado UFRGS74F). Os maiores valores foram obtidos pelos isolados UFRGS74F, UFRGS16F, UFRGS36F, UFRGS37F, UFRGS46F, UFRGS47F, UFRGS48F e UFRGS56F, UFRGS67F e UFRGS76F. Estudando a produção de AIA de diversas espécies de bactérias diazotróficas, PEDRAZA et al. (2004) verificaram que a produção das bactérias incubadas

sob agitação de 90g por 72h, em caldo nutritivo, variou de 4,37 a 27,32 $\mu\text{g AIA mg prote\acute{a}na}^{-1}$. A maior produção foi obtida pelo isolado pertencente à espécie *A. brasilense*.

Os resultados de produção de AIA e N fixado pelos isolados demonstram que estes dois eventos não se inter-relacionaram (Tabela 3). Estes

resultados mostram-se coerentes, pois se sabe que estes processos são independentes, por serem codificados por genes distintos. Estudando a estirpe *Azospirillum* OAD-57, GADAGI et al. (2004) verificaram que houve correlação negativa entre a produção de PCPs e N fixado, já que a estirpe produziu grande quantidade de PCPs, porém fixou pequena quantidade de N.

O desempenho dos microrganismos foi quantificado *in vitro*, sugerindo que o próximo passo neste estudo seria avaliar o potencial dos isolados *in situ* para verificar sua competitividade em campo, pois a colonização e o estabelecimento destes microrganismos associativos são influenciados de maneira diferente, dependendo das populações naturais do solo (BALDANI et al., 1986).

CONCLUSÕES

Bactérias diazotróficas ocorrem em associação com plantas de sorgo forrageiro. A diversidade das bactérias diazotróficas foi influenciada pelos genótipos de sorgo. As bactérias isoladas foram aptas em fixar N₂ e produzir ácido indol-acético *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.12, n.4, p.433-439, 1980.
- BALDANI, J.I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., sp. Nov., a root associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.36, n.1, p.86-93, 1986.
- BASHAN, Y. et al. *Azospirillum* - plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, p.521-577, 2004.
- BODDEY, R.M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and soil**, Dordrecht, v.137, n.1, p.111-117, 1991.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.
- CHIARINI, L. et al. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: Root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.30, n.1, p.81-87, 1998.
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Recomendações de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 3.ed. Passo Fundo: SBRS – Núcleo Regional Sul, 1995. 394p.
- DÖBEREINER, J. et al. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: Embrapa-SP, 1995. 60p.
- EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de classificação de solos**. Brasília: SPI, 1999. 412p.
- FERNANDES, V.L.B. et al. Absorção e utilização de nitrogênio em planta de sorgo cultivado em solução nutritiva. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.22, n.1/2, p.89-96, 1991.
- GADAGI, R.S. et al. The effect of combined *Azospirillum inoculation* and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of the blanket flower *Gaillardia pulchella*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.100, p.323-332, 2004.
- GRAYSTON, S.J. et al. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.30, n.3, p.369-378, 1998.
- KIPE-NOLT, J.A. et al. Root exudation of sorghum and utilization of exudates by nitrogen-fixing bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.17, n.6, p.859-863, 1985.
- PEDRAZA, R.O. et al. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.233, p.15-21, 2004.
- STEIN, T. et al. Contribution of BNF by *Azoarcus* sp. BH72 in *Sorghum vulgare*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5/6, p.969-971, 1997.
- TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: Depto. de Solos da UFRGS, 1995. 174p.