



JOÃO PEDRO ALVES DE AQUINO

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS NA
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO E PRODUTIVIDADE DO
MILHO E SORGO SACARINO**

TERESINA - PI

2021

JOÃO PEDRO ALVES DE AQUINO

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO E
PRODUTIVIDADE DO MILHO E SORGO SACARINO**

Tese apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Agricultura Tropical para a obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Prof. Dr. Francisco de Alcântara Neto

Orientador

Prof. Dr. Jadson Emanuel Lopes Antunes

Coorientador

Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo

Coorientador

TERESINA, PIAUÍ

2021

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

A657b Aquino, João Pedro Alves de
Bactérias diazotróficas endofíticas na promoção do crescimento e
produtividade do milho e sorgo sacarino. / João Pedro Alves de Aqi-
no. - 2021
92 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de
Pós-Graduação em Agronomia - Agricultura Tropical, Teresina, 2021.
“ Orientação: Prof. Dr. Francisco de Alcântara Neto.

1. *Zea mays* 2. *Sorghum bicolor* 3. Inoculante biológico 4. Acúmulo
de nitrogênio 5. Desenvolvimento morfofisiológico I. Antunes, Jadson
Emanuel Lopes. II. Araújo, Ademir Sérgio Ferreira de. III. Título

CDD 633.15

JOÃO PEDRO ALVES DE AQUINO**Bactérias diazotróficas endofíticas na promoção do crescimento e produtividade do milho e sorgo sacarino.**

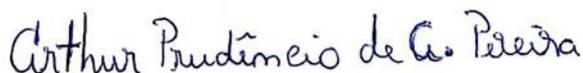
Tese apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Agricultura Tropical, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

APROVADA em 28 de janeiro de 2021.

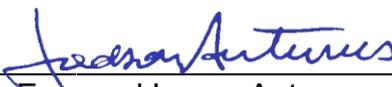
Comissão Julgadora:



Prof. Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas – UFRPE



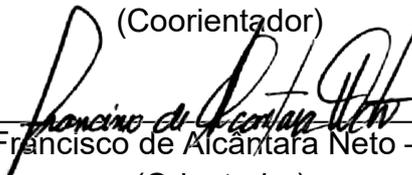
Prof. Dr. Arthur Prudêncio de Araújo Pereira – UFC



Prof. Dr. Jadson Emanuel Lopes Antunes – PNP/UFPI
(Coorientador)



Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo – CCA/UFPI
(Coorientador)



Prof. Dr. Francisco de Alcântara Neto – CCA/UFPI
(Orientador)

TERESINA-PI

2021

À Deus, por sempre guiar meu caminho. À minha família, em especial, ao meu pai, José Pedro de Aquino e à minha mãe, Maria Cleud Alves, pelo apoio, carinho e esforço em acreditar no meu futuro. À minha filha, Maria Valentina Lima de Aquino, por ser minha motivação diária.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante e pela força nos momentos mais difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pois o presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES - Código de Financiamento 001.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Piauí, por tornar oportuno a realização do meu doutorado.

Aos meus pais, José Pedro e Maria Cleud, por me darem a oportunidade de estudar, sendo o meu alicerce, minha base, meu tudo.

À minha esposa, Silvia Lima, à minha filha, Maria Valentina, ao meu irmão, Marcus Vinicius, e a todos os familiares, pelo apoio e compreensão.

À Universidade Federal do Piauí, por possibilitar todos os caminhos da minha vida acadêmica ao longo dos últimos 12 anos e, em especial, aos docentes dessa instituição que tiveram papel importante de incentivo: Marcos David Figueiredo de Carvalho, Lúcio Flavo Lopes Vasconcelos (EMBRAPA), Regina Lúcia Ferreira Gomes, Antônio Aécio de Carvalho Bezerra, Carlos José Gonçalves de Souza Lima e Ademir Sérgio Ferreira de Araújo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco de Alcântara Neto, pela confiança e pelo apoio de sempre. E ao meu coorientador, Dr. Jadson Emanuel Lopes Antunes, pelos ensinamentos técnico-científicos, colaboração nos experimentos e amizade.

Aos amigos adquiridos nas estradas da vida, os da graduação, do mestrado, do doutorado, particularmente, aos que contribuíram para a consolidação do presente trabalho: Carlos Humberto, Louise Melo, Maria dos Remédios, Ingrid Silva, Raquel, Regina Maria Sousa, Alzeneide Lopes, Vicente Neto, Danilo, Lara França, Delanio Brasil, Claudyanne Costa, Mirya Grazielle, Jayara Silva, Adriana Conceição, Mariane Pertile, Dona Toinha, Idenilson, Ana Célia, Leudimar Aires, Nilvânia Maria, Antônia, Sr. Chico, Marcos, Jarlano, Diego.

Aos meus amigos graduandos, Antônio Victor e Francisco Macêdo, que contribuíram na instalação e condução de todos os experimentos desenvolvidos na tese. E às minhas amigas de pós-graduação, Sandra Rocha e Marineide Amorim, por toda a ajuda, correções, ensinamentos e companheirismo.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para que chegássemos aos objetivos propostos.

Minha sincera GRATIDÃO!

“Nunca deixe que alguém te diga que não pode fazer algo.. Se você tem um sonho, deve protegê-lo. As pessoas que não podem fazer por si mesmas, dirão que você não consegue. Se quer alguma coisa, vá e lute por ela. Ponto Final”

Trecho do filme “À Procura da Felicidade”

RESUMO GERAL

Bactérias promotoras de crescimento (BPCP) atuam direta ou indiretamente melhorando o desempenho das plantas de diversas maneiras, podendo ser encontradas no tecido da planta, atuando no crescimento por meio da secreção de hormônios, enzimas ou auxiliando na aquisição de nutrientes. Com o intuito de melhorar a qualidade nutricional e de produção das culturas, sem aumentar os gastos e a contaminação ambiental pelo excesso de fertilizantes aplicados ao solo, este estudo objetivou selecionar isolados bacterianos, avaliar o desenvolvimento morfofisiológico e a produtividade da variedade de milho AG-1051 cultivada para milho verde e da variedade de sorgo sacarino Palo alto N52K1009, em resposta ao potencial da inoculação com diferentes isolados de BPCP endófitas de cana-de-açúcar. O estudo divide-se em três experimentos com ensaios distintos para cada cultura: o primeiro em condições totalmente estéreis, o segundo em condição de casa de vegetação com solo não estéril e o terceiro em condição de campo, com a finalidade de atingir a produção em dois ciclos de cultivo. Nos três experimentos, as duas culturas receberam, respectivamente, a inoculação com quarenta, treze e seis isolados bacterianos. Observou-se que no primeiro experimento a inoculação com BPCP promoveu incrementos significativos na parte aérea, crescimento da raiz e na massa seca de sorgo e milho em relação ao controle negativo. Em comparação ao controle positivo, 21 e 7 isolados promoveram efeito semelhante no crescimento da parte aérea de sorgo e milho, respectivamente. Os isolados de BPCP não promoveram acúmulo de N e teor de clorofila semelhante ao das plantas supridas com N. Por outro lado, 29 e 25 isolados apresentaram capacidade de promover acúmulo de N em sorgo e milho quando comparados ao controle negativo. Este estudo mostrou o potencial do uso desses isolados de BPCP como inoculante biológico para aumentar o crescimento e a produção de milho e sorgo. No segundo capítulo a inoculação com BPCP foi avaliada de forma isolada e em associação com a adubação nitrogenada com 50% do recomendado. Nessa condição, as BPCP influenciaram positivamente a fixação biológica de N e o metabolismo do N em milho e sorgo, mesmo quando as plantas foram cultivadas com N. Isso indica que a BPCP pode fornecer N ao milho e sorgo por meio do FBN e estimular o crescimento das plantas. No terceiro capítulo, os experimentos com as culturas foram conduzidos em condição de campo nas safras 2018/19 e 2019/20 em regime de sequeiro, assim como no capítulo dois utilizou-se a inoculação de BPCP de forma isolada e em associação com 50% da adubação nitrogenada. Verificou-se que a inoculação com BPCP aumentou substancialmente o crescimento morfofisiológico e produtividade das plantas de milho verde e sorgo sacarino. Nos dois ciclos de cultivo do milho verde, a inoculação com os isolados de *Burkholderia sp.* e *Bacillus subtilis*, acrescidos de 50% do N recomendado, se igualam em produtividade com as plantas que receberam 100% do N recomendado. Na cultura do sorgo sacarino, a inoculação com os isolados de *Paenibacillus sp.* sem adubação nitrogenada geraram os melhores parâmetros tecnológicos, sendo superiores, inclusive, aos da adubação nitrogenada completa. Este estudo sugere que a inoculação de BPCP pode ser útil para melhorar o desenvolvimento das plantas, a nutrição de N, a biomassa e a produtividade em milho verde e sorgo sacarino, dando ao produtor maior rentabilidade pelo menor uso de fertilizantes nitrogenados.

Palavras-chave: *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, Inoculante biológico, Acúmulo de Nitrogênio, Desenvolvimento morfofisiológico.

GENERAL ABSTRACT

Plant growth-promoting bacteria (PGPB) act directly or indirectly by improving the performance of plants in several ways, which can be found in plant tissue, acting on growth through the secretion of hormones, enzymes or assisting in the acquisition of nutrients. In order to improve the nutritional and production quality of crops, without increasing costs and environmental contamination by the excess of fertilizers applied to the soil, this study aimed to select bacterial isolates, evaluate morphophysiological development and productivity the corn variety AG-1051 and sweet sorghum variety Palo alto N52K1009, in response to the potential for inoculation with different sugarcane endophytic PGPB isolates. The study is divided into three experiments with different tests for each culture: the first in totally sterile conditions, the second in a greenhouse condition with non-sterile soil and the third in a field condition, with the purpose of achieving production in two cultivation cycles. In the three experiments, the two cultures received, respectively, inoculation with forty, thirteen and six isolates of PGPB. It was observed in the first experiment, inoculation with PGPB promoted significant increases in the aerial part, root growth and dry matter of sorghum and corn in relation to the negative control. In comparison to the positive control, 21 and 7 promoted a similar effect on the growth of the aerial part of sorghum and corn, respectively. PGPB did not promote N accumulation and chlorophyll content similar to that of plants supplied with N. On the other hand, 29 and 25 showed the ability to promote accumulation of N in sorghum and corn when compared to the negative control. This study revealed the potential of using PGPB as a biological inoculant to increase the growth and production of corn and sorghum. In the second chapter, the inoculation with PGPB was evaluated in isolation and in association with nitrogen fertilization with 50% of the recommended. In this condition, PGPB positively influenced the biological N fixation and N metabolism in corn and sorghum, even when the plants were grown with N. This indicates that PGPB can supply N to corn and sorghum through BNF and stimulate the plant growth. In the third chapter, the experiments with the cultures were carried out in field conditions in the 2018/19 and 2019/20 crops under rainfed conditions, as well as in chapter two, the inoculation of PGPB was used in isolation and in association with nitrogen fertilizer with 50% of the recommended. It was found that inoculation with PGPB substantially increased the morphophysiological growth and productivity of green corn and sweet sorghum plants. In the two green maize cultivation cycles, inoculation with the *Burkholderia sp.* and *Bacillus subtilis*, plus 50% of the recommended N, is equal in productivity with the plants that received 100% of the recommended N. In the culture of sweet sorghum, inoculation with the strain of *Paenibacillus sp.* without nitrogen fertilization they generated the best technological parameters, being superior, even, to the complete nitrogen fertilization. The present study shows that the inoculation of BPCP can be useful to improve plant development, N nutrition, biomass and productivity in green corn and sweet sorghum, giving the producer greater profitability due to the lower use of nitrogen fertilizers.

Key words: *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, Biological inoculant, Nitrogen accumulation, Morphophysiological development.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	VII
GENERAL ABSTRACT.....	VIII
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCP).....	12
2.1.1 Mecanismos diretos de promoção de crescimento.....	12
2.1.2 Mecanismos indiretos de promoção de crescimento.....	13
2.2 Utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas na agricultura.....	14
2.2.1 Inoculação de BPCP em Poaceae.....	15
2.3 A cultura do milho.....	16
2.4 A cultura do Sorgo Sacarino.....	17
3. REFERÊNCIAS.....	19
4. CAPÍTULO I - Plant growth promoting endophytic bacteria on maize and sorghum.	24
4.1 Abstract.....	24
4.2 Introduction.....	24
4.3 Material and methods.....	25
4.4 Results and discussion.....	27
4.5 Conclusion.....	35
4.6 References.....	35
5. CAPÍTULO II - Biological N fixation and physiological responses of maize and sorghum inoculated with plant growth-promoting bacteria.	38
5.1 Abstract.....	38
5.2 Introduction.....	39
5.3 Material and methods.....	41
5.4 Results and discussion.....	44
5.5 Conclusion.....	52
5.6 References.....	52
6. CAPÍTULO III - Produtividade de milho verde e sorgo sacarino submetidos a inoculação com bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada.....	56
6.1 Introdução.....	56
6.2 Material e Métodos.....	57
6.3 Resultados e Discussão.....	63
6.4 Conclusão.....	86
6.5 Referências.....	86
7. Considerações finais.....	92

1. INTRODUÇÃO GERAL

A demanda crescente por alimentos tem exigido significativa quantidade de fertilizantes sintéticos, os quais, em muitos casos, são utilizados excessivamente. Além disso, alguns nutrientes presentes nesses fertilizantes podem ser perdidos por lixiviação ou serem fixados ao solo em formas indisponíveis às plantas. Essa prática, muitas vezes rotineira, contamina o solo e afeta negativamente toda sua microbiota (TRIPTI et al., 2017; PEDRAZA et al., 2010), uma vez que a adubação excessiva pode vir a causar estresse salino, antagonismo a alguns nutrientes, elevação do pH, entre outros, que afetam a planta e os microrganismos presentes no solo.

A adoção de estratégias que possibilitem disponibilizar nutrientes para o solo é de grande importância para o ambiente agrícola. Nesse contexto, bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) vêm sendo fonte de estudos em diversas culturas, tais como: sorgo e milho (AQUINO et al. 2019), soja (MARINKOVIC et al. 2018), cana-de-açúcar (PEREIRA et al. 2019), apresentando resultados importantes no crescimento e produção. Essas bactérias têm se destacado como alternativa viável ao uso de fertilizantes minerais, podendo substituí-los total ou parcialmente na agricultura (SOUZA et al. 2015). As BPCP podem atuar melhorando o desenvolvimento das culturas por meio de mecanismos diretos de promoção do crescimento, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitohormônios e solubilização do fosfato.

A fixação biológica do N_2 mediada pelas BPCP tem sido foco de muitos estudos (FRANCO et al., 1999; HUNGRIA et al., 2000; LIU et al., 2020a) ao longo dos anos e, apesar de grande parte da sua contribuição estar direcionada às plantas da família Fabaceae (leguminosas), ganhos produtivos também têm sido observados em Poaceae (gramíneas) (OLANREWAJU; BABALOLA, 2019; EFTHIMIADOU et al., 2020). A FBN realizada por bactérias diazotróficas em Poaceae ocorre pela colonização da região rizosférica, onde essas bactérias podem ser de vida livre e estabelecer simbiose ou se associar às plantas (ANTUNES et al., 2017). Essas bactérias podem ser oriundas de solo rizosférico ou tecido endofítico vegetal, sendo necessário apresentarem boa capacidade de fixação de N *in vitro* e viabilidade de ser disseminada via inoculação de semente. Essa disseminação contribui para o sucesso da associação entre bactérias e não leguminosas, pois o baixo número de

bactérias endofíticas diazotróficas presentes nas plantas e/ou rizosfera é um fator que limita a eficiência dos microrganismos (JAMES, 2000).

Pesquisas sobre a associação de bactérias diazotróficas com gramíneas podem oferecer novas possibilidades de microrganismos com potencial inoculante. Na família Poaceae, culturas do milho e sorgo apresentam grande capacidade de estabelecer relações rizosféricas e/ou endofíticas com vários gêneros bacterianos. No milho temos: *Burkholderia* (ALVES, 2007), *Azospirillum* (HUNGRIA et al., 2010), rizóbios (BÉCQUER et al., 2011) e *Herbaspirillum* (FONSECA BREDA et al., 2016). Para a cultura do sorgo temos: *Burkholderia spp.* e *Herbaspirillum ssp.* (SANTOS et al. 2017), *Rhizobium* e *Pantoea* (MAREQUE et al. 2015) e *Burkholderia spp.* (NASCIMENTO et al. 2014). Entretanto, devido à especificidade genótipo-microrganismo ou, até mesmo, entre genótipo-estirpe é importante definir a associação que proporciona melhor resultado em plantas cultivadas.

Na região Nordeste, a inoculação de bactérias fixadoras de N em Poaceas tem bom potencial de uso por ser facilmente aplicável e pelas condições de baixa fertilidade e limitação hídrica serem normalmente encontradas nesta região. Dessa forma, o uso de BPCP pode promover o crescimento do sistema radicular, da fitomassa verde, incrementando a assimilação de CO₂ às plantas pela melhoria do aparato fotossintético (CASSETARI et al., 2016; KLEINGESINDS, 2010). Além disso, pode promover o crescimento vegetal através da síntese de auxinas, giberelinas, citocininas e solubilização de fosfato (BHARTI; BARNAWAL, 2018) e proteção contra agentes fitopatogênicos (MOREIRA et al., 2010).

Diante do princípio de que existe especificidade entre os microrganismos e seu hospedeiro, bem como influência do ambiente de cultivo em solo não estéril, com presença ou ausência de adubação nitrogenada, a prospecção e seleção de novas bactérias diazotróficas em Poaceas têm grande relevância científica e agrônômica. Dessa forma, são necessárias investigações que priorizem uma ampla gama de isolados em cultivos com solo não estéril na presença e ausência de adubação nitrogenada, visando compreender a melhor interação isolado-genótipo-ambiente no ganho de produção. Nesse contexto, esse estudo teve por objetivo selecionar isolados bacterianos, avaliar o desenvolvimento morfofisiológico e a produtividade da variedade de milho AG-1051, cultivada para milho verde, e da variedade de sorgo sacarino Palo alto N52K1009 em resposta ao potencial da inoculação com diferentes isolados de BPCP endofíticas de cana-de-açúcar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCP)

Bactérias que estimulam o crescimento de plantas, ocasionando efeitos biofertilizantes e bioestimulantes, aumentando a resistência a doenças, melhorando os mecanismos da planta para promover maior resistência aos estresses (STURZ; NOWAK, 2000) são conhecidas como BPCP (bactérias promotoras de crescimento em plantas). Elas podem ser encontradas na rizosfera em associação com sistemas radiculares de plantas, externamente na superfície radicular e em associações endofíticas (NIU et al., 2018).

Na última década, o entusiasmo pelos benefícios promovidos por essas bactérias tem despertado o interesse de estudos que envolvem diversos gêneros dessas bactérias, como *Bacillus* (LIU et al., 2020b), *Paenibacillus* (KHAN et al., 2020), *Herbaspirillum* (SILVA et al., 2020), *Burkholderia* e *Pseudomonas* (PAGNANI et al., 2020). Estes benefícios estão relacionados a mecanismos diretos como a estimulação da fixação de N, solubilização e disponibilização de nutrientes como ferro, enxofre e fosfatos inorgânicos e insolúveis, biossíntese de fitohormônios (ácido indol acético -AIA, giberelinas e citocininas). Indiretamente, mitigam os estresses abióticos (déficit hídrico) e bióticos, atuando no controle de fitopatógenos por meio da produção de exopolissacarídeos, sideróforos, quitinases, glucanases e antibióticos (NUMAN et al., 2018; ZULUAGA et al., 2020).

2.1.1 Mecanismos diretos de promoção de crescimento

Entre as BPCP, temos as bactérias diazotróficas que possuem importante papel na natureza e, principalmente, junto às plantas. Esses microrganismos procarióticos são capazes de converter o nitrogênio atmosférico (N₂) em forma disponível (NH₄⁺ - amônio) para as plantas pela fixação biológica de nitrogênio (FBN). Os diazotróficos podem ser de vida livre, estarem associados a espécies vegetais ou, ainda, estabelecer simbiose com plantas leguminosas. Estudos com esses microrganismos são de grande importância pela contribuição no fornecimento de N aos diversos ecossistemas (MOREIRA et al., 2010).

A capacidade de FBN das bactérias diazotróficas vem impulsionando estudos de isolamento, caracterização e seleção de isolados bacterianos eficientes na promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal, com vistas à redução na utilização de fertilizantes industrializados (BALDOTTO et al., 2010). Diversos são os

processos conciliados por esses microrganismos que, no solo, desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes e no crescimento vegetal.

Dentre os processos de promoção do crescimento de plantas, a FBN tem sido mais utilizada devido à sua eficiência, onde a enzima nitrogenase atua na quebra da tripla ligação do N_2 , reduzindo-o em NH_3 e, posteriormente, em NH_4^+ , disponibilizando-o às plantas (CHOUDHARY; VARMA, 2017). Segundo Dobereiner et al. (2003), a maior parte da FBN é realizada pela nitrogenase mediada pelo molibdênio encontrado em todos os diazotróficos, porém com diferenças em cada gênero de bactéria. Dessa forma, esses microrganismos associativos exercem efeitos positivos no crescimento das plantas direta ou indiretamente, através de um ou de diferentes combinações de mecanismos.

Além da FBN, as BPCP podem afetar o crescimento das plantas diretamente pela síntese de fitohormônios. Essa síntese é responsável pela maior parte da promoção do crescimento vegetal gerado pelas BPCP (DUCA et al., 2014). As principais classes de fitohormônios que atuam no mecanismo de promoção de crescimento vegetal são as auxinas, giberelinas, citocininas e o etileno. A auxina, representada pelo ácido indol-acético (AIA), é a principal responsável pelo crescimento resultante da atuação das BPCP, onde atua nos processos de alongamento, divisão e diferenciação das células no meristema (MOHITE, 2013).

As BPCP também têm mecanismos de promoção associados à sua capacidade de converter os fosfatos insolúveis em formas assimiláveis para as plantas (PATHAK et al., 2017). Após o N, o fósforo é o segundo nutriente inorgânico mais demandado pela maioria das plantas cultivadas. Portanto, as bactérias com capacidade de solubilizar fosfato por meio da produção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular e da sua boa reação de troca, atuam como promotores de crescimento (LIU et al., 2014).

2.1.2 Mecanismos indiretos de promoção de crescimento

De forma indireta, as BPCP, por meio de vários processos, podem propiciar melhores condições de crescimento às plantas em situações de estresse através de mecanismos de ação antibiótica no biocontrole de fitopatógenos (MAHANTY et al., 2017). A produção de enzimas líticas (lipase, celulase, quitinase e protease) são exemplos de mecanismos utilizados contra fungos fitopatogênicos (*Fusarium*

oxysporum, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, entre outros) que podem causar danos estruturais às células (GLICK, 2012).

Além disso, as BPCP têm o atributo de produzir sideróforos que podem contribuir para a capacidade dos isolados produtores de competir com o meio ambiente, colonizar o hospedeiro e promover o crescimento vegetal de forma direta através da disponibilidade de formas solúveis de ferro. Indiretamente, os sideróforos bacterianos podem remover o ferro (elemento químico) disponível no ambiente, tornando-o indisponível para o crescimento dos fitopatógenos (GLICK, 2012; BENEDEZI et al. 2013, SAHA et al., 2016).

2.2 Utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas na agricultura.

O uso de BPCP na agricultura teve início praticamente junto com o advento desta, pois mesmo o homem não sabendo de forma científica que as leguminosas tinham a capacidade de melhorar o cultivo de outras espécies, como as gramíneas, faziam cultivos em consórcios ou em sucessão e, desta forma, melhoravam a qualidade do solo e favoreceriam a microbiota. O primeiro relato de bactérias responsáveis pela fixação biológica de N em plantas foi descrito por Beijerinck em 1888. No Brasil, apenas em 1951 foi publicado o primeiro artigo específico de inoculação que culminou na difusão da tecnologia no país (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

No uso de inoculantes sempre foi pensando que as bactérias fixadoras de N₂ (*Rhizobium* e *Bradyrhizobium*) eram favorecidas, pois se achava que elas eram as únicas a conseguir estabelecer simbiose com as plantas leguminosas e formar nódulos nas raízes de plantas como soja, ervilha, amendoim e alfafa, nas quais realizam a conversão de N₂ em amônia (MURRAY, 2011). Embora o processo da nodulação limite-se, quase que exclusivamente, às culturas leguminosas, diversos estudos conseguiram identificar várias bactérias não simbióticas como sendo fixadores de N₂ de vida livre (*Azospirillum*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bacillus polymyxa*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* ou *Herbaspirillum*) (BODDEY et al., 1986). Essas bactérias demonstraram grande potencial de uso na agricultura como inoculante em leguminosas e não leguminosas.

A associação de diazotróficas fixadoras de nitrogênio com plantas não leguminosas por meio da simbiose endofítica que proporciona benefícios à planta

em cultivo, é conhecida a mais de 60 anos. O estabelecimento da associação depende de interação complexa entre o hospedeiro e o endófito, pois estes, ao encontrarem condições favoráveis, colonizam o interior das plantas para realizarem a fixação eficaz de N_2 e promoverem seu fornecimento para as células vegetais (BOURASSA et al., 2017).

Ao longo dos anos, os estudos nessa área estão se ampliando com bastante relevância, ficando entre as principais culturas cultivadas. No Brasil, a inoculação na cultura da soja com bactérias diazotróficas eficientes e específicas já propiciava economia em fertilizantes minerais nitrogenados de vários milhões de dólares por ano, mantendo a alta produtividade (HUNGRIA et al., 2005). Assim, a soja tornou-se muito competitiva no mercado pela sua baixa dependência de uso de fertilizante nitrogenado (DOBEREINER, 1997). Hoje os estudos em leguminosas, tais como os realizados por Sharma e Kumawat, (2020); Tavanti et al. (2020); Rondina et al. (2020), buscam diferentes estirpes de BPCP para as culturas mais promíscuas, ou seja, plantas que interagem com vários gêneros de bactérias e co-inoculação de promotoras para as que já possuem estirpe padrão. Diferentemente, os estudos em não leguminosas têm buscado isolados e mix de bactérias para uma resposta mais efetiva nas culturas.

2.2.1 Inoculação de BPCP em Poaceae.

Entre as plantas não leguminosas, as gramíneas destacam-se devido ao seu interesse econômico. Existem estudos (DAY; NEVES; DÖBEREINER, 1975) que datam de quase cinco décadas do uso de BPCP e o Brasil é uma das referências nesta linha de pesquisa. Entretanto, mesmo em países que são destaque nesses estudos, o uso dessa tecnologia é baixo (MARTINS et al., 2018). Apenas em 2009 as primeiras estirpes começaram a ser usadas em inoculantes comerciais com milho (*Zea mays*) e trigo (*Triticum aestivum*) (HUNGRIA et al., 2010). Mesmo sendo comuns respostas positivas nas pesquisas em gramíneas (AQUINO et al., 2019; AHMED et al., 2020; CARLSON et al., 2020), poucos produtos comerciais são encontrados no mercado, principalmente nas regiões mais distantes dos grandes centros produtores. De modo geral, a América do Sul tem mais de 50 empresas produzindo inoculantes, sendo que a maioria é produzida na Argentina (85 produtos), dois no Uruguai, um no Paraguai e apenas 16 no Brasil (CASSÁN; DIAZ-ZORITA,

2016). Diante disso, é importante existirem pesquisas nesses pequenos nichos por conta da especificidade entre o isolado e o hospedeiro.

2.3 A cultura do milho

Juntamente com a cultura do arroz e do trigo, o milho (*Zea mays* L.) é considerado uma das culturas mais importantes do mundo, sendo fonte alimentar para mais de 4,5 bilhões de pessoas, distribuídas em aproximadamente 94 países em desenvolvimento (SHIFERAW et al., 2011). O Brasil apresenta grande destaque no cenário internacional de produção de milho, sendo uma cultura agrícola de fundamental importância para o agronegócio brasileiro.

O país é o terceiro maior produtor mundial de milho, com produção de 101,0 milhões de toneladas na safra de 2018/2019. É o segundo maior exportador juntamente com a Argentina, ficando atrás, somente, dos Estados Unidos. As exportações anuais do país mais que triplicaram na última década, com média de 28,5 milhões de toneladas de milho produzidas nos últimos cinco anos (CONAB, 2019; USDA, 2019). O cultivo do milho está presente em todas as regiões do Brasil, atingindo uma área de aproximadamente 18 milhões de hectares (IBGE, 2019). Em larga escala, é cultivado em primeira e segunda safra, sendo que a última contempla quase 70% do milho produzido no país, com média de 10 ton há⁻¹ (CONAB, 2019; IBGE, 2019).

A comercialização interna do milho abrange a alimentação humana e animal, no entanto, cerca de 60% da produção total é destinada à indústria de rações para animais (MAPA, 2019). Em regiões como o Nordeste brasileiro, o consumo e comercialização do milho verde é bastante comum, onde a cultura destaca-se pela importância econômica e social. Por ser um alimento de baixo custo, apresenta uma gama de variabilidade em seu cultivo, podendo ser cultivado em pequena, média e grande escala (GALVÃO et al., 2014).

No estado do Piauí, grande parte do que é contabilizado se restringe ao monocultivo empresarial. Na última safra, o IBGE (2019) contabilizou mais de 450 mil hectares plantados com milho, gerando uma produção de mais de 1,7 milhões de toneladas. O cultivo em grande parte do estado é realizado por agricultores familiares de subsistência em cultivos consorciados. Muitos consomem e vendem a produção na forma de espiga verde em feiras e centros de abastecimento nas periferias das grandes e pequenas cidades.

Pela forma como é feita a comercialização de milho verde em todo o país, não se tem informações precisas sobre a produção de milho verde no Brasil, tanto para consumo *in natura*, quanto para a indústria de conservas alimentícias. Mesmo sem tantas informações de comercialização, é notável a sua crescente produção no país, em especial, na região Nordeste. Isso gera a expansão das áreas agrícolas, avanços tecnológicos e biotecnológicos e a adesão, por boa parte dos produtores, às sementes com altos índices de produtividade.

Vários fatores influenciam na produtividade dessa cultura, dentre eles, pode-se destacar a fertilidade do solo com o N sendo o principal macronutriente para a cultura (GALVÃO; BORÉM; PIMENTEL, 2017). Segundo Sangoi et al. (2010), cada tonelada de grão seco de milho a ser produzida tem a extração de 25 a 28 kg de N. Neste contexto, as adubações nitrogenadas na cultura, independente se é milho verde ou grão seco, são de grande importância e elevam bastante o custo de produção, sendo, muitas vezes, perdidas por lixiviação e volatilização gerada por aplicações excessivas (SÁ et al., 2017).

As alternativas ao uso de fertilizantes nitrogenados vêm sendo investigadas ao longo dos anos em forma de inovações tecnológicas, dentre as quais, o uso de microrganismos conhecidos como BPCP - bactérias promotoras de crescimento de plantas. O produto comercial com *Azospirillum brasilense* na cultura do milho tem dado bons resultados (VIDOTTI et al., 2020).

2.4 A cultura do Sorgo Sacarino

O sorgo sacarino (*Sorghum bicolor*) é uma espécie da família Poaceae com grande potencialidade ao setor sucroalcooleiro. O sorgo é uma cultura de origem africana bastante adaptável e polivalente devido às suas inúmeras aplicações, desde o uso alimentício dos grãos e folhas, ao uso do bagaço para a indústria de açúcar e combustível (VELMURUGAN et al. 2020). É cultivado na Índia, China, Austrália, África do Sul e América do Sul, sendo esse subcontinente americano um forte candidato a substituir o milho na produção de biocombustível (EMIGDYO et al., 2011), pois o uso de milho nessa região tem maior finalidade como gênero alimentício e, geralmente, é cultivado durante ou após o período chuvoso (ARUNA et al., 2018).

No Brasil, seu cultivo vem crescendo como matéria-prima de qualidade para o abastecimento do mercado na entressafra da cana-de-açúcar, reduzindo a

instabilidade do mercado de etanol no país (SILVA et al. 2017). Com ciclo entre 110 a 120 dias e propagação por sementes, o sorgo sacarino apresenta tolerância ao déficit hídrico e seu cultivo pode ser totalmente mecanizável e processado com a mesma tecnologia industrial desenvolvida para a cana-de-açúcar, fazendo com que seu potencial mereça mais estudos. Estudos como o realizado por Sipos et al. (2009) constataram que a planta de sorgo sacarino tem o potencial de extração máxima de 70% do seu peso em caldo do colmo. A composição básica da planta é umidade (73%), açúcares solúveis (13%), celulose (5,3%), hemicelulose (3,7%) e lignina (2,7%) (VELMURUGAN et al. 2020).

Por meio de seus constituintes, é perceptível o potencial do sorgo sacarino para a indústria sucroenergética. Entretanto, seu rendimento varia de acordo com algumas características de cada sistema de cultivo, como: genótipo, condições climáticas e fertilidade do solo (UMAKANTH et al., 2019). Por ser considerado uma cultura rústica (PRASAD et al. 2019), em geral seu cultivo está associado a áreas com baixa fertilidade e, proporcionalmente, com baixo potencial produtivo. Beltran et al. (2019), acreditam que o potencial de produtividade do sorgo sacarino pode ser aumentado com a aplicação adequada de fertilizantes.

Trabalhos que usam BPCP na cultura do sorgo vêm sendo utilizados com o objetivo de melhorar a qualidade da produção sem aumento nos gastos, sem contaminação ambiental provocada pelo excesso de fertilizantes aplicados ao solo e para a melhoria nutricional da cultura. Abbaszadeh-Dahaji et al. (2020) ao avaliarem a nutrição e o crescimento de plantas de sorgo cultivadas em solo calcário de baixa fertilidade, observaram que o uso de BPCP aumentaram significativamente o crescimento das plantas e os teores de Mn, Zn, Cu e K em comparação com as plantas não inoculadas. Embora existam outros estudos que avaliam o crescimento (AQUINO et al., 2019; WIDAWATI et al., 2018; SCHLEMPER et al., 2018; SANTOS et al., 2017) dessa cultura, ainda faltam pesquisas de campo que busquem resultados sobre a melhoria nas características tecnológicas.

3. REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH-DAHAJI, P. et al. Abdolreza. Improved growth and nutrition of Sorghum (*Sorghum bicolor*) plants in a low-Fertility calcareous soil treated with plant growth-promoting rhizobacteria and Fe-EDTA. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 31-42, 2020.
- AHMED, A. et al. Impact assessment of plant growth promoting rhizobacteria on growth and nutrient uptake of maize (*Zea Mays*). **Pakistan Journal of Agricultural Research**, v. 33, n. 2, p. 234-246, 2020.
- AQUINO, J. P. A. et al. Plant growth-promoting endophytic bacteria on maize and sorghum1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, p. e56241-e56241, 2019.
- ARUNA, C. et al. **Breeding Sorghum for Diverse End Uses**. Woodhead Publishing. (Ed) 2018.
- BALDOTTO, L. E. B. et al. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 2, p. 349-360, 2010.
- BELTRAN, A. K. M. et al. Agronomic and yield performance of sweet sorghum under different fertilizer schemes. **Philippine Journal of Crop Science**, v. 44, n. 3, p. 87-92, 2019.
- BENEDUZI, A. et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94-104, 2013.
- BHARTI, N.; BARNAWAL, D. Amelioration of salinity stress by PGPR: ACC deaminase and ROS scavenging enzymes activity. In: **PGPR amelioration in sustainable agriculture**. Woodhead Publishing, p. 85-106, 2019.
- BODDEY, R. M. et al. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, v. 95, n. 1, p. 109-121, 1986.
- BOURASSA, D. V. et al. The Lipopolysaccharide Lipid A Long-Chain Fatty Acid Is Important for Rhizobiumleguminosarum Growth and Stress Adaptation in Free-Living and Nodule Environments. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 30, n. 2, p. 161-175, 2017.
- CARLSON, R. et al. Rhizobacteria-induced systemic tolerance against drought stress in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Microbiological Research**, v. 232, p. 126388, 2020.
- CASSÁN, F; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117-130, 2016.
- CHOUDHARY, D. K.; VARMA, A. Nitrogenase (uma enzima chave): estrutura e função. In: **Rhizobium Biology and Biotechnology** . Springer, Cham, p. 293-307. 2017.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: Análise mensal**. GUTH, T. L. F. p.4, jun. 2019 Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-milho/item/download/28400_a7ac31374a6551d606bc8939e82942_7c> Acesso: 07 dez. 2020

DAY, J. M.; NEVES, M. C. P.; DOBEREINER, J. Nitrogenase activity on the roots of tropical forage grasses. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 107-112, 1975.

DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 771-774, 1997.

DOBEREINER, J. Non-symbiotic nitrogen fixation in tropical soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, p. 1-6, 1986.

DUCA, D. et al. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85-125, 2014.

EFTHIMIADOU, A. et al. Effect of foliar and soil application of plant growth promoting bacteria on growth, physiology, yield and seed quality of maize under Mediterranean conditions. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

EMIGDYO, B. M. et al. Desempenho de cultivares de sorgo sacarino para a produção de etanol sob diferentes densidades de plantas. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, ISSN 1678-2518, 22 p. 2011.

FRANCO, A. A. et al. Fixação biológica de nitrogênio: uma alternativa aos fertilizantes nitrogenados. Siqueira JO, Moreira FMS, Lopes AS, Guilherme LRG, Faquin V, Furtini AE No, Carvalho G, editores. **Interrelações fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: SBCS/UFLA, 1999.

GALVÃO, J. C. C.; BORÉM, A.; PIMENTEL, M. A. **Milho: do plantio à colheita**. 2.ed. Viçosa (MG): Ed. UFV, 382p. 2017.

GALVÃO, J.C.C. et al. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Ceres**, v. 61, n. 7, 2014.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**. v. 2012, p. 963401-963401, 2012.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**. v. 331, n. 1-2, p. 413-425. 2010.

HUNGRIA, M. et al. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11-12, p. 1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON,

W.E. (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture: forestry ecology and environment**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.25-42, 2005.

IBGE – LSPA (Levantamento Sistemático da Produção Agrícola). Tabela 1618- **Área plantada, área colhida e produção, por ano da safra e produto**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>> Acesso: 07 dez. 2020

KHAN, M. S. et al. Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Endophytic Bacteria *Paenibacillus polymyxa* SK1 from *Lilium lancifolium*. **BioMed research international**, v. 2020, 17 p., 2020.

LIU, J. et al. Molecular speciation of phosphorus present in readily dispersible colloids from agricultural soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 78, n. 1, p. 47-53, 2014.

LIU, J et al. The impacts of domestication and breeding on nitrogen fixation symbiosis in legumes. **Frontiers in genetics**, v. 11, 2020a.

LIU, X. et al. *Bacillus subtilis* HG-15, a Halotolerant Rhizoplane Bacterium, Promotes Growth and Salinity Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum*). **Research Square**, DOI: 10.21203/rs.3.rs-19695/v1, 2020b.

MAHANTY, T. et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 4, p. 3315-3335, 2017.

MARINKOVIC, J. et al. Effects of soybean co-inoculation with plant growth promoting rhizobacteria in field trial. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 23, n. 2, p. 13401-13408, 2018.

MARTINS, M. R. et al. Impact of plant growth-promoting bacteria on grain yield, protein content, and urea¹⁵N recovery by maize in a Cerrado Oxisol. **Plant and Soil**, v. 422, n. 1-2, p. 239-250, 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Apresentação CONAB milho**. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/vegetal/culturas/milho>> Acesso: 07 dez. 2020

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, n. 3, p. 638-649, 2013.

MOREIRA, F. M. de S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74, 2010.

MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Ufla, Lavras, 2006.

MURRAY, J. D. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 6, p. 631-639, 2011.

- NIU, X. et al. Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with foxtail millet in a semi-arid agroecosystem and their potential in alleviating drought stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2018.
- NUMAN, M. et al. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. **Microbiological Research**, v. 209, p. 21-32. 2018.
- OLANREWAJU, O. S.; BABALOLA, O. O. Bacterial Consortium for Improved Maize (*Zea mays* L.) Production. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, p. 519, 2019.
- PAGNANI, G. et al. Open field inoculation with PGPR as a strategy to manage fertilization of ancient Triticum genotypes. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, n. 1, p. 111-124, 2020.
- PATHAK, D. V. et al. Biofertilizer application in horticultural crops. In: **Microorganisms for Green Revolution**. Springer, Singapore, p. 215-227, 2017.
- PEREIRA, W. et al. Sugarcane productivity as a function of nitrogen fertilization and inoculation with diazotrophic plant growth-promoting bacteria. **Sugar Tech**, v. 21, n. 1, p. 71-82, 2019.
- PRASAD, S. et al. Sweet Sorghum: An Excellent Crop for Renewable Fuels Production. In: **Prospects of Renewable Bioprocessing in Future Energy Systems**. Springer, Cham, p. 291-314, 2019.
- RONDINA, A. B. L. et al. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biology and Fertility of Soils**, p. 1-13, 2020.
- SÁ, J.C. de M. et al. Low-carbon agriculture in South America to mitigate global climate change and advance food security. **Environment International**, Oxford, v.98 p.102- 112, 2017.
- SAHA, M. et al. Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 3984–3999, 2016.
- SANGOI, L. et al. **Ecofisiologia da cultura do milho para altos rendimentos**. Lages: Graphel, 87p. 2010.
- SANTOS, C. L. R. et al. Contribution of a mixed inoculant containing strains of *Burkholderia* spp. and *Herbaspirillum* ssp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 96-106, 2017.
- SCHLEMPER, T. R. et al. Effect of *Burkholderia tropica* and *Herbaspirillum frisingense* strains on sorghum growth is plant genotype dependent. **PeerJ**, v. 6, p. e5346, 2018.
- SHARMA, M. K.; KUMAWAT, D. M. Estudo de co-inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Aspergillus niger* em soja para fixação de nitrogênio. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 9, n. 4, p. 383-394, 2020.

- SHIFERAW, B. et al. Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. **Food Security**, v. 3, p. 307- 327, 2011.
- SILVA, F. C. et al. **Sistema de produção mecanizada da cana-de-açúcar integrada à produção de energia e alimentos**. Brasília, DF: Embrapa, v. 2, pt. 6, cap. 1, p. 574, 2017.
- SILVA, J. R. et al. Endophytic diazotrophic bacteria mitigate water deprivation effects in pineapple explants during acclimatization. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 32, n. 1, p. 63-77, 2020.
- SIPOS, B. et al. Sweet sorghum as feedstock for ethanol production: enzymatic hydrolysis of steam-pretreated bagasse. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 153, n. 1-3, p. 151-162, 2009.
- STURZ, A. V., NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**. V.15, p. 183-190, 2000.
- TAVANTI, T. R. et al. Yield and quality of soybean seeds inoculated with *Bacillus subtilis* strains. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 24, n. 1, p. 65-71, 2020.
- UMAKANTH, A. V. et al. Sweet sorghum for biofuel industry. In: **Breeding Sorghum for Diverse End Uses**. Woodhead Publishing, p. 255-270, 2019.
- USDA, United States Department of Agriculture. **USDA Agricultural Projections to 2029**. Office of the Chief Economist, World Agricultural Outlook Board. Prepared by the Interagency Agricultural Projections Committee. Long-term Projections Report OCE-2020-1, 114 pp. 2020. Disponível em <<https://www.ers.usda.gov/webdocs/outlooks/95912/oce-2020-1.pdf?v=9234.9>> Acesso: 01 dez. 2020
- VELMURUGAN, B. et al. Sweet sorghum: a potential resource for bioenergy production. In: **Refining Biomass Residues for Sustainable Energy and Bioproducts**. Academic Press, p. 215-242, 2020.
- VIDOTTI, M. S. et al. Maize responsiveness to *Azospirillum brasilense*: Insights into genetic control, heterosis and genomic prediction. **PloS one**, v. 14, n. 6, 2019.
- WIDAWATI, S. et al. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination and seedling growth of *Sorghum bicolor* L. Moench. In: IOP conference series: **Earth and environmental science**. IOP Publishing, v. 166, n. 1, p. 2018.
- ZULUAGA, M. Y. A. et al. Diversity and plant growth-promoting functions of diazotrophic/N-scavenging bacteria isolated from the soils and rhizospheres of two species of Solanum. **PloS one**, v. 15, n. 1, p. e0227422, 2020.

4. **CAPÍTULO I** - AQUINO, J. P. A.; MACEDO JUNIOR, F. B.; ANTUNES, J. E. L.; FIGUEIREDO, M.; ALCÂNTARA NETO, F.; ARAUJO, A. S. F. Plant growth-promoting endophytic bacteria on maize and sorghum. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 49, p. e56241, 16 out. 2019. <https://www.revistas.ufg.br/pat/article/view/56241/33822>

4.1 Abstract

Plant growth-promoting bacteria (PGPB) act directly or indirectly improving the plant performance in several ways. These bacteria can be found in plant tissue and act on plant growth through secretion of hormones and enzymes or assisting the acquisition of nutrients. This study evaluated forty PGPB isolates, obtained in leaves and culms of sugarcane, on sorghum and maize growth. These isolates were compared with a negative (-N) and positive (+N) control. The PGPB isolates promoted significant increases on shoot and dry weight of sorghum and maize as compared the negative control (-N). Compared with the positive control (+N), twenty-one and seven isolates promoted similar effect on shoot growth of sorghum and maize, respectively. The response of root growth by the use of PGPB was highly significant for sorghum and maize as compared with both negative (-N) and positive (+N) control. For sorghum, thirty-three and seven isolates promoted higher root dry weight of sorghum as compared with the negative (-N) and positive (+N) control, respectively. The PGPB isolates did not promote N accumulation and chlorophyll content similar to plants supplied with N (+N). Otherwise, 29 and 25 isolates presented ability for promoting N accumulation in sorghum and maize as compared with the negative control (-N). This study showed the potential for using these PGPB isolates as biological inoculant to increase the growth and yield of maize and sorghum. Particularly, the isolates IPACC24 and IPACC26, both identified as *Bacillus subtilis*, presented the better responses for plant growth and N accumulation.

Keywords: N accumulation; chlorophyll; endophytic bacteria; *Bacillus subtilis*

4.2 Introduction

Plant growth-promoting bacteria (PGPB) are microorganism which can improve plant performance in many different ways, operating via a multitude of physiological, molecular, and biochemical pathway (PALACIOS et al. 2014). These bacteria act directly or indirectly on promotion of plant growth through secretion of hormones and enzymes or assisting the acquisition of nutrients, such as N and P

(AHEMAD; KIBRET 2014). Also, PGPB can protect the plants from pathogens, improve soil structure and degrade pollutants (HAYAT et al. 2010; AHEMAD 2012).

Several genera of bacteria are classified as PGPB, such as *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* (BHATTACHARYYA; JHA 2012). *Bacillus* and *Pseudomonas* act on plant growth mainly by synthesis of plant hormones, i.e., auxin, cytokinin and gibberellins, and production of siderophore and antibiotics (ADESEMOYE et al. 2008). On the other hand, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* are involved on biological N fixation in legume (SULIEMAN; TRAN 2014) and non-legume plants (SANTI et al. 2013) and also could synthesize phytohormones, such as indole-3-acetic acid (FUKAMI et al. 2018). Thus, the inoculation of these rhizobacteria can enhance the plant development and productivity. Indeed, previous studies have reported *Bacillus* and *Pseudomonas* increasing the growth of soybean and wheat (ARAUJO 2008; SHARMA et al. 2011). Similarly, *Azospirillum*, *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* were found promoting the growth of sugarcane (SCHULTZ et al. 2014), common bean (CHEKANAI et al. 2018) and soybean (ULZEN et al. 2016).

Maize and sorghum are two important cereal crops in the Brazil with a production of about 90 million tons in 2017 (IBGE 2017). Usually, maize and sorghum producers plant these crops in soils with deficits of nutrient and, therefore, PGPB could contribute enhancing plant biomass and nutrient uptake. In Brazil, some studies have found positive effects of PGPB on plant growth and yield in maize (ARAUJO; GUERREIRO 2010) and sorghum (SCHLEMPER et al. 2018).

However, it is important to select isolates of bacteria and evaluate them on different plants, mainly related with their plant growth-promoting ability. In this study, several PGPB, that were isolated from sugarcane and presented high biochemical and plant growth-promotion abilities (ANTUNES 2016), were evaluated for the ability for promoting plant growth in maize and sorghum. As sugarcane belongs to the same group of maize and sorghum, the hypothesis is that PGPB isolated from sugarcane would present efficiency in promoting the growth of maize and sorghum.

4.3 Material and methods

The study was done in the Laboratory of Soil Microbiology located at Agricultural Science Center, Federal University of Piauí, Brazil. Forty PGPB isolates, obtained in leaves and culms of sugarcane by Antunes et al. (2017), in table 1.

Table 1. PGPB isolates used in this study

PGPB	Genera ^a	IAA (mg L ⁻¹) ^b	ARA (nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹) ^c
IPACC01	<i>Bacillus sp.</i>	2.37	4.72
IPACC06	<i>Paenibacillus sp.</i>	2.11	7.41
IPACC07	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	0.21	7.88
IPACC10	<i>Burkholderia sp.</i>	3.93	5.16
IPACC14	<i>Paenibacillus sp.</i>	0.55	4.14
IPACC23	<i>Paenibacillus sp.</i>	1.96	7.07
IPACC24	<i>Bacillus subtilis</i>	2.21	0.88
IPACC25	<i>Bacillus subtilis</i>	0.28	7.02
IPACC26	<i>Bacillus subtilis</i>	2.99	7.10
IPACC29	<i>Bacillus subtilis</i>	1.41	5.03
IPACC30	<i>Bacillus subtilis</i>	2.46	6.39
IPACC33	<i>Pseudomonas sp.</i>	2.71	7.84
IPACC34	<i>Bacillus pumilus</i>	3.52	7.63
IPACC35	<i>Bacillus sp.</i>	0.01	6.48
IPACC36	<i>Bacillus pumilus</i>	30.77	6.62
IPACC38	<i>Paenibacillus sp.</i>	1.13	7.10
IPACC49	<i>Burkholderia sp.</i>	1.27	4.47
IPACC55	<i>Paenibacillus sp.</i>	0.68	7.66
IPACC56	<i>Pseudomonas sp.</i>	1.54	8.08
IPACF16	<i>Bacillus sp.</i>	0.36	4.31
IPACF18	<i>Bacillus sp.</i>	2.13	5.57
IPACF20	<i>Bacillus megaterium</i>	0.59	6.37
IPACF21	<i>Bacillus subtilis</i>	0.68	6.23
IPACF41	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	0.34	5.52
IPACF42	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	0.45	6.62
IPACF44	<i>Burkholderia sp.</i>	3.08	7.41
IPACF45	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	2.08	0.40
IPACF46	<i>Paenibacillus sp.</i>	0.38	7.09
IPACF47a	<i>Paenibacillus sp.</i>	2.56	4.45
IPACF47b	<i>Paenibacillus sp.</i>	2.14	3.95
IPACF48	<i>Brevibacillus agri</i>	6.13	5.58
IPACF62	<i>Paenibacillus sp.</i>	0.40	7.45
IPACF65	<i>Bacillus megaterium</i>	1.30	7.70
IPACF66	<i>Pseudomonas sp.</i>	0.09	6.55
IPACC53	No identified	2.96	0.30
IPACC58	No identified	0.44	0.75
IPACC59	No identified	1.24	0.97
IPACF17	No identified	1.09	6.59
IPACF40	No identified	0.54	5.52
IPACF60	No identified	0.11	9.18

^aClassified according to NCBI, ^bIAA: Indole-3- acetic acid and ^cARA: Acetylene-reducing activity, by Antunes (2016) and Antunes et al. (2017).

Were inoculated in seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* L.), cv Palo Alto N52K1009, and maize (*Zea mays* L.), cv AG-1051. Therefore, two experiments (sorghum and maize) were conducted, in a completely randomized design with three

replicates, in a growth chamber and consisted of forty PGPB isolates (Table 1) plus negative (-N) and positive (+N) control. The negative and positive control consisted of uninoculated plants without and with N supply, respectively.

For the preparation of the inoculant, the PGPB isolates were individually grown in Erlenmeyer flasks containing 50 mL of liquid medium (Tryptic Soy Broth - TSB at 25%) and incubated under orbital shaking (200 rpm and 31 °C) for 72 h. The bacterial growth was verified through optical density in a spectrophotometer (wavelength of 540 nm) and considered a final concentration of 10^9 CFU mL⁻¹.

The experimental unit consisted of pots (0.8 dm³) containing 0.7 dm³ of sterile sand (pH 6.8) that was autoclaved (120°C at 101 KPa) for 60 min. The procedure of autoclaving was repeated three times. Sorghum and maize seeds were surface-disinfected with alcohol (70%) for 30 s and sodium hypochlorite (2%) for 60 s, being then washed with sterile water (VINCENT 1970). Seeds were directly inoculated with 1 ml aliquots of the cell suspensions containing the PGPB isolates. Plants grew under a photoperiod cycle of 14 h light at 28°C and 10 h dark at 20°C. A volume of 2 mL of Hoagland's nutrient solution (HOAGLAND; ARNON 1950), without N, was added to each pot every three days. The positive control (+N) received 50 and 75 mg N per pot for sorghum and maize, respectively. These rates were diluted in water and applied five times during the experiment (10 mL per pot).

Sorghum and maize were maintained for 30 and 45 days, respectively, and then the plants were harvested. Plant height and diameter of stem were measured. Shoot and roots were dried at 65°C to constant weight to evaluate their dry weight. N content in leaf was evaluated by the Kjeldahl method (BREMNER; MULVANEY 1982) and chlorophyll content was estimated by spectrophotometric method (LICHTENTHALER; WELLBURN 1983).

The normality of data was analyzed by using the test of Shapiro-Wilk. Afterward, data were statistically analyzed by using ANOVA, and the means were compared using Scott-Knott test ($p < 0.05\%$).

4.4 Results and discussion

4.4.1 PGPB effect on plant growth

All PGPB isolates promoted significant increase in sorghum height (Figure 1A), while 21 isolates increased in maize height (Figure 1B) as compared with negative control (-N). When compared with the positive control (+N), 20 and 21 PGPB isolates

presented similar effect on sorghum and maize height, respectively.

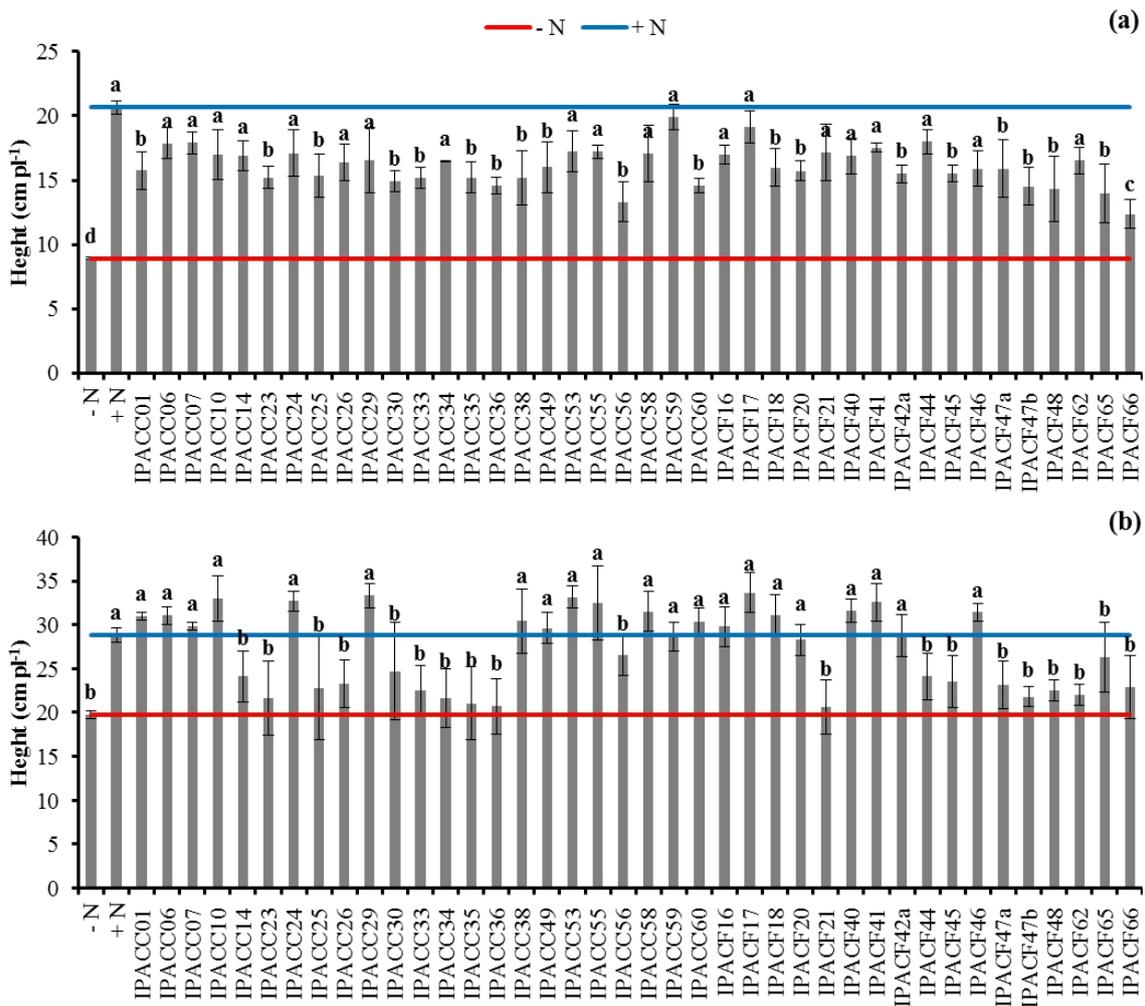


Figure 1 Plant height of sorghum (a) and maize (b) inoculated with PGPB isolates. Means followed by the same letter do not differ significantly at 5% by Scott-Knott test; -N: negative control; +N: positive control

Similarly, all PGPB isolates promoted the increase of the diameter of stem in sorghum (Figure 2A) and maize (Figure 2B) as compared with negative control (-N). When compared with the positive control (+N), the results were contrasting for sorghum and maize. As compared with positive control (+N), nine isolates showed, in sorghum, similar effect on diameter of stem, while that 17 isolates promoted, in maize, significant increases on the diameter of stem.

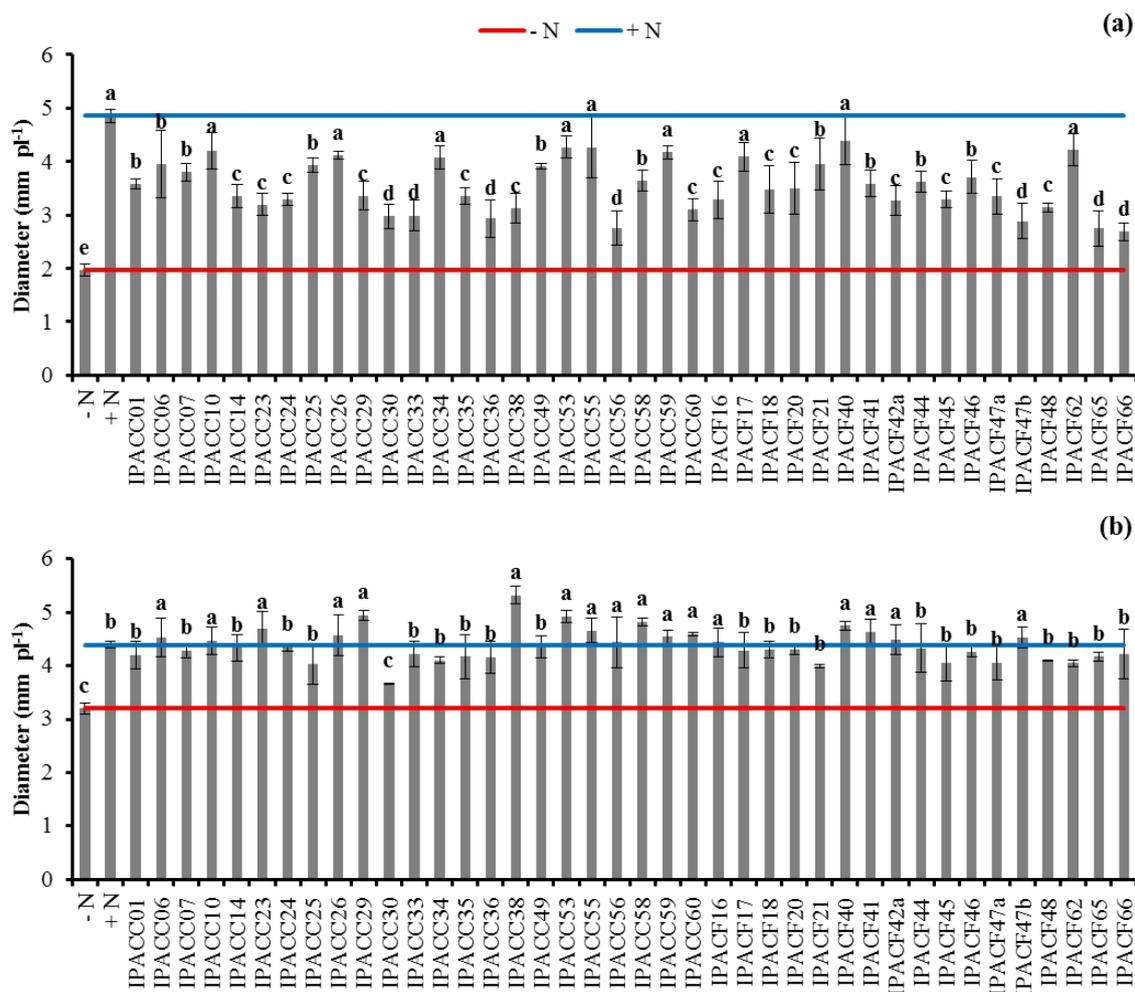


Figure 2 Diameter of stem in sorghum (a) and maize (b) inoculated with PGPB isolates. Means followed by the same letter do not differ significantly at 5% by Scott-Knott test. -N: negative control; +N: positive control

A total of 21 PGPB isolates promoted significant increases on shoot dry weight of sorghum (Figure 3A) and maize (Figure 3B) as compared the negative control (-N). Compared with the positive control (+N), twenty-one and seven isolates promoted similar effect on shoot growth of sorghum and maize, respectively. Maize inoculated with PGPB improved considerably the rate of shoot dry weight in our study. The highest biomasses were obtained with plants inoculated with the isolates IPACC24, IPACC29, IPACC38, IPACC53, IPACC55, IPACC58 and IPACF20.

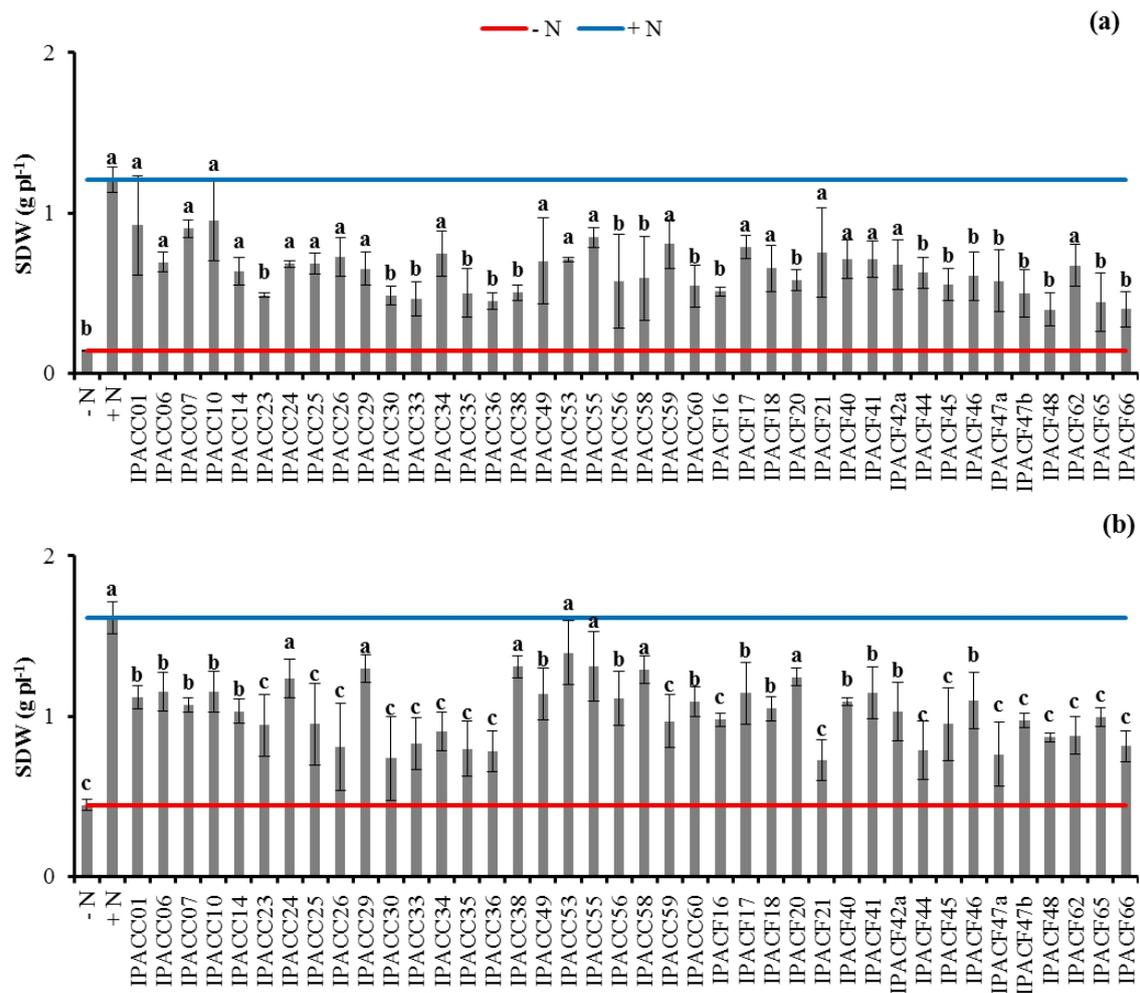


Figure 3 Shoot dry weight (SDW) of sorghum (a) and maize (b) inoculated with PGPB isolates. Means followed by the same letter do not differ significantly at 5% by Scott-Knott test. -N: negative control; +N: positive control

The response of root growth by the use of PGPB was highly significant for sorghum and maize as compared with both negative (-N) and positive (+N) control. For sorghum, thirty-three and seven isolates promoted higher root dry weight of sorghum as compared with the negative (-N) and positive (+N) control, respectively (Figure 4A). However, except for isolates IPACC33 and IPACF48, all isolates increased significantly the root dry weight of maize than the negative (-N) and positive (+N) control (Figure 4B). Interestingly, the results highlight the isolates IPACC59 (no identified) and IPACC24 (*Bacillus subtilis*) which presented the highest ability for promote root growth in sorghum and maize, respectively.

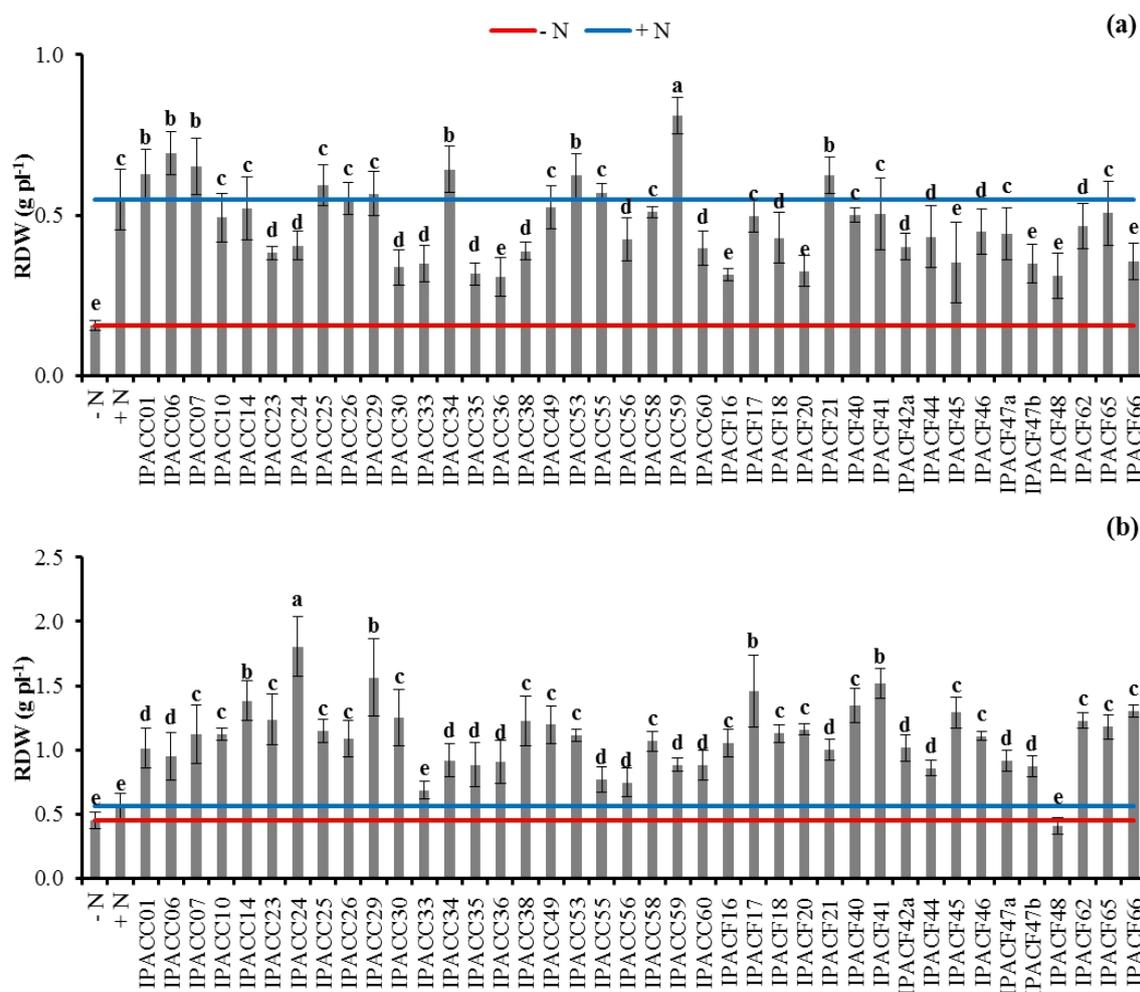


Figure 4 Root dry weight (RDW) of sorghum (a) and maize (b) inoculated with PGPB isolates. Means followed by the same letter do not differ significantly at 5% by Scott-Knott test. -N: negative control; +N: positive control

In this study, PGPB isolated from sugarcane were evaluated on the growth of maize and sorghum. In a general view, the results show that the PGPR promoted the maize and sorghum growth when compared with plants with and without N supply. It confirms that PGPB present ability to promote plant growth in sorghum and maize. The mechanisms by which PGPB stimulate plant growth involve, among others, synthesis of phytohormones, such as indol acetic acid, and biological nitrogen fixation (SOUZA et al. 2015). These results confirm the importance of using PGPB for promotion plant growth of maize and sorghum. Indeed, previous studies have reported positive responses of maize and sorghum growth when these plants were inoculated with PGPB (MOUNDE et al. 2015; WIDAWATI e SULIASIH 2018; SCHLEMPER et al. 2018). Schelemper et al. (2018) inoculated sorghum with some PGPB species and found significant increases in sorghum growth compared with the

control. Similarly, Arruda et al. (2013) isolated and tested several PGPB on maize plants and observed that the inoculation with different bacteria significantly promoted the growth of roots (50–68%) and shoot (25–54%) in comparison to the negative control.

Interestingly, the root growth was the parameter that presented positive and significant influence of the isolates even compared with plant with N supply (positive control). Thus, some isolates were able for enhancing the root growth of maize and sorghum. As an important parameter for plant growth, roots are critical to the plant growth since this structure presents functions of plant anchorage, absorption and conduction of nutrients and water (MALOOF 2004). Thus, the significant increase in root growth promoted by some PGPB is important for maize and sorghum development. This increase in root growth stimulated by PGPB can be attributed to the synthesis of plant growth-regulating substances, such as indol acetic acid, which coordinates the developmental processes in plants and promotes higher root development through the increase in the number of lateral and adventitious root formation (DUCA et al. 2014). Recent studies have also observed significant root growth of maize (YOUSEIF 2018), sorghum (WIDAWATI; SULIASH 2018) and wheat (DAL CORTIVO et al. 2017). In maize, Youseif (2018) observed a significant increase in root growth with inoculation of 49 PGPB isolates and attributed it to the high ability for synthesizing indol acetic acid. According to Vikram et al. (2007); Bhattacharyya e Jha (2012) the auxin produced by the bacteria can positively influence the development of the root system, and then contributes to improve essential nutritive elements absorption for the plant growth.

4.4.2 PGPB effect on N accumulation and chlorophyll content

The PGPB isolates did not promote N accumulation and chlorophyll content similar to plants supplied with N (+N). Otherwise, 29 and 25 isolates presented ability for promoting N accumulation in sorghum (Figure 5A) and maize (Figure 5B) as compared with the negative control (-N). The isolate IPACC23 (*Paenibacillus sp.*), IPACC26 (*Bacillus subtilis*), IPACC30 (*Bacillus subtilis*), IPACC33 (*Pseudomonas sp.*), IPACF44 (*Burkholderia sp.*), IPACF47a (*Paenibacillus sp.*) and IPACF48 (*Brevibacillus agri*) presented the highest ability to promote N accumulation in maize; while that the isolates IPACC26 (*Bacillus subtilis*) and IPACC30 (*Bacillus subtilis*) were the more efficient PGPB for promoting N accumulation in sorghum.

In relation to chlorophyll content, 29 and 25 isolates presented efficiency in sorghum (Figure 6A) and maize (Figure 6B) as compared with the negative control (-N). For both crops, the isolates IPACC26 (*Bacillus subtilis*) and IPACF66 (*Pseudomonas sp.*) presented the highest ability for promoting the chlorophyll content. The results show that maize and sorghum accumulated N and chlorophyll in association with PGPB. As the inoculated plants did not receive N supply, this accumulation of N was originated by biological N fixation by PGPB. According to Kuan et al. (2016), PGPB may provide a biological alternative to fix N from atmosphere. These endophytic bacteria colonize the plant tissues, such as roots, stem and leaves, and can fix N for use of plants (JAMES et al. 1997).

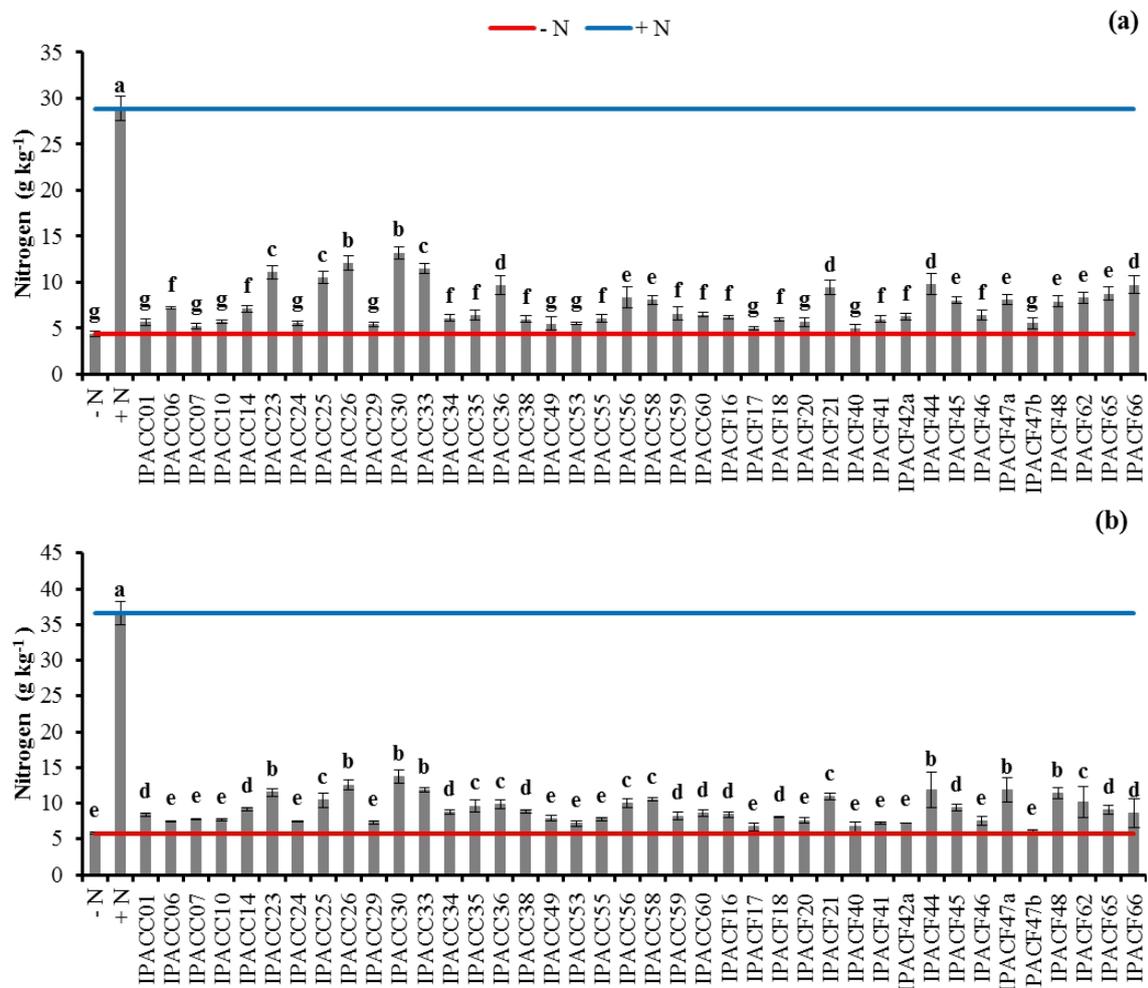


Figure 5 Nitrogen accumulated in shoot of sorghum (a) and maize (b) inoculated with PGPB isolates. Means followed by the same letter do not differ significantly at 5% by Scott-Knott test. -N: negative control; +N: positive control.

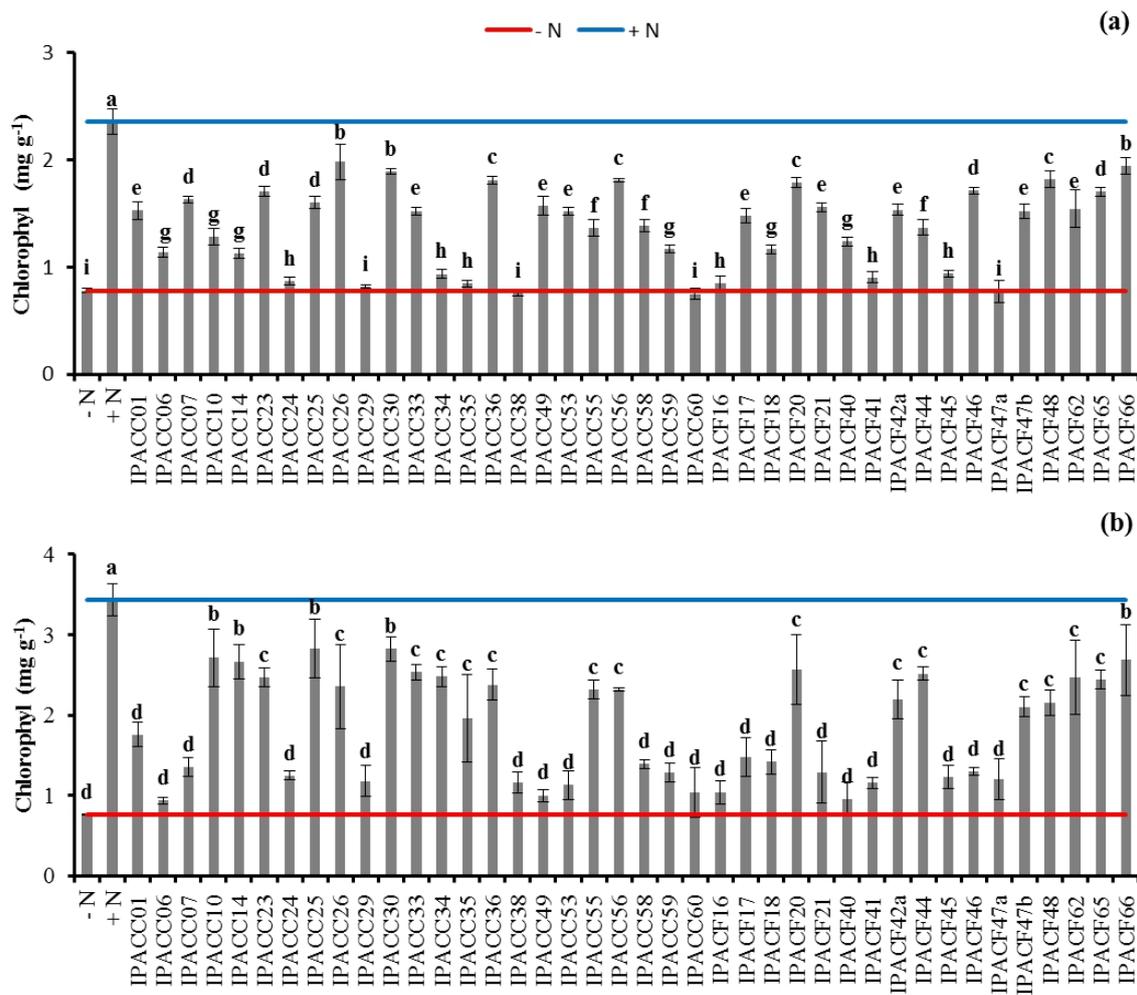


Figure 6 Chlorophyll content in shoot of sorghum (a) and maize (b) inoculated with PGPB isolates. Means followed by the same letter do not differ significantly at 5% by Scott-Knott test. -N: negative control; +N: positive control

Kuan et al. (2016) evaluated the inoculation of PGPR on growth and N fixation of maize and observed a significant increase in the N accumulation in plants. For sorghum, Alagawadi; Gaur (1992) observed that the inoculation with rhizobacteria significantly increased N accumulation. PGPB are also contribute for increasing the chlorophyll content in maize and sorghum and it can suggest an indirect effect of PGPB on chlorophyll since the content of this pigment is directly correlated with N accumulation in plants (LIU et al. 2012). Previous studies have also reported significant effect of PGPB on chlorophyll content in maize (ALMAGHRABI et al. 2014) and wheat (TURAN et al. 2012). Interestingly, *Bacillus subtilis* was found to be the more efficient in contribute with N and, consequently, chlorophyll to maize and sorghum and this finding agrees with previous studies which observed *Bacillus subtilis* promoting the accumulation of N and chlorophyll content in maize (LIMA et al.

2015; Pupathy e Radziah 2015) and sorghum (DAS et al. 2010). The isolates which promoted the highest N accumulation in maize and sorghum also presented high ability for fixing N, measured by ARA (Table 1). It confirms the evidences that *Bacillus* presents ability to fix N from atmosphere (MOLLICA et al. 1985). In the case of *Pseudomonas*, studies have reported that bacteria from this genus can also fix molecular N (UMAROV et al. 1994; SHABAYEV 2010) and, thus, stimulate the accumulation of N and chlorophyll in maize (KIFLE; LAING 2016) and sorghum (PRAVEEN et al. 2012).

4.5 Conclusion

These results found in this study indicate the potential for using these PGPB isolates as biological inoculant to increase the growth and yield of maize and sorghum. These large numbers of PGPB from different bacterial genera show a future potential application on plant growth for modern agriculture. The isolates IPACC24 and IPACC26, both identified as *Bacillus subtilis*, presented the better responses for plant growth and N accumulation. It suggests that these isolates could be used in further studies acting as plant growth-promoters. Also, it is equally important to study in detail the potentiality of these PGPB along with their mechanism of action involved in sustainable crop production.

4.6 References

- ADESEMOYE, A.O. et al. Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 423-426, 2008.
- AHEMAD, M. Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: a review. **Journal of Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology(IIOAB)** v. 3, n. 3, 2012.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University-Science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.
- ALAGAWADI, A. R.; GAUR, A. C. Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench in dry land. **Tropical Agriculture**, v.69, p.347-350, 1992.
- ALMAGHRABI, O. A. et al. Enhancement of Maize Growth Using Some Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Under Laboratory Conditions. **Life Science Journal**, v. 11, n. 11, p. 764-772, 2014.
- ANTUNES, J. E. L. **Bactérias diazotróficas endofíticas em cana-de-açúcar: estratégia para uma agricultura sustentável**. PhD student in Agronomy (Soil Science). Universidade Federal Rural de Pernambuco. 154 p. 2016.

- ANTUNES, J. E. L. et al. Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Genetics and Molecular Research**. v. 16, n. 2, 2017.
- ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, 2008.
- ARAUJO, F. F.; GUERREIRO, R. T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência Agrotecnologia**. v. 34, n. 4, p. 837-844, 2010.
- ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15-22, 2013.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.
- BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. Nitrogen—Total 1. **Methods of soil analysis**. Part 2. Chemical and microbiological properties, (methodsofsoilan2), v. 2, p. 595-624, 1982.
- CHEKANAI, V. et al. Response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to nitrogen, phosphorus and rhizobia inoculation across variable soils in Zimbabwe. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 266, p. 167-173, 2018.
- DAL CORTIVO, C. et al. Increased root growth and nitrogen accumulation in common wheat following PGPR inoculation: Assessment of plant-microbe interactions by ESEM. **Agriculture, Ecosystem and environment**, v. 247, p. 396-408, 2017.
- DAS, I. K. et al. Rhizosphere competence of biocontrol agent *Bacillus subtilis* strain SRB28 from sorghum. **Indian Phytopathology**, v. 63, n. 4, p. 375-379, 2010.
- DUCA, D. et al. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85-125, 2014.
- FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M.; *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 73, 2018.
- HAYAT, R. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579-598, 2010.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. **California agricultural experimental station**, v. 347, n. 2, 1950.
- IBGE, **Levant. Sistem. Prod. Agríc.** Rio de Janeiro, v. 30, p.1-81, 2017.
- JAMES, E. K. et al. *Herbaspirillum* an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of Sorghum bicolor L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 3, p. 785-798, 1997.
- KIFLE, M. H.; LAING, M. D. Isolation and Screening of Bacteria for Their Diazotrophic Potential and Their Influence on Growth Promotion of Maize Seedlings in Greenhouses. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 1225, 2016.

- KUAN, K. B. et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0152478, 2016.
- LICHTENTHALER, H.; WELLBURN, A. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 603, p. 591-592, 1983.
- LIMA, F.F. et al. *Bacillus subtilis* e adubação nitrogenada na produtividade do milho. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 4, 2015.
- LIU, Z. A. et al. Using a chlorophyll meter to estimate tea leaf chlorophyll and nitrogen contents. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 12, n. 2, p. 339-348, 2012.
- MALLOOF, J. N. Plant Development: Slowing Root Growth Naturally. **Current Biology**, v. 14, n. 10, p. R395-R396, 2004.
- MOLLICA, M. L. et al. An improved method to detect acetylene-reducing activity in *Bacillus* strains. **Journal Microbiological Methods**, v. 3, n. 3-4, p. 147-157, 1985.
- MOUNDE, L. G. et al. Potential of Rhizobacteria for Promoting Sorghum Growth and Suppressing *Striga hermonthica*. **Development Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 122, n. 2, p. 100-106, 2015.
- PALACIOS, A. O. et al. Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria-an overview. **Biology and fertility of soils**, v. 50, n. 3, p. 415-432, 2014.
- PRAVEEN, K. G. et al. Plant Growth Promoting *Pseudomonas spp.* from Diverse Agro-Ecosystems of India for *Sorghum bicolor* L. **Journal of Biofertilizers and Bippesticides**, v. 7, p. 2, 2012.
- PUPATHY, U. T.; RADZIAH, O. Growth response of corn to nitrogen-fixing bacteria enriched compost. **Asian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 1, p. 72-80, 2015.
- SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743-767, 2013.
- SCHLEMPER, T. R. et al. Effect of *Burkholderia tropica* and *Herbaspirillum frisingense* strains on sorghum growth is plant genotype dependent. **PeerJ**, v. 6, p. e5346, 2018.
- SCHULTZ, N. et al. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, p. 407-414, 2014.
- SHABAYEV, V. P. Effect of the Introduction of the Nitrogen-Fixing Bacteria *Pseudomonas putida* 23 on the Nitrogen Balance in Soil. **Eurasian Soil Science**, v. 43, n. 4, p. 436-441, 2010.
- SHARMA, S. K. et al. Selection of plant growth-promoting *Pseudomonas spp.* that enhanced productivity of soybean-wheat cropping system in Central India. **Journal Microbiol Biotechnol**, v. 21, p. 1127-1142, 2011.
- SOUZA, R. D.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.

SULIEMAN, S.; TRAN, L. S. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: metabolism and regulatory mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p.19389-19393, 2014.

TURAN, M.; GULLUCE, M.; ŞAHİN, F. Effects of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria on Yield, Growth, and Some Physiological Characteristics of Wheat and Barley Plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 43, n. 12, p. 1658-1673, 2012.

ULZEN J, et al. *Bradyrhizobium* Inoculants Enhance Grain Yields of Soybean and Cowpea in Northern Ghana. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1770, 2016.

VIKRAM, A. et al. Growth promotional potential of *Pseudomonas fluorescens* FPD 10 and its interaction with *Bradyrhizobium* sp. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 354-361, 2007.

VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. **Oxford: Blackwell Scientific Publications**, (IBP Hand book, 15), v.15, p. 200, 1970.

WIDAWATI, S.; SULIASIH, M. The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination and Seedling Growth of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Earth and Environmental Sciences**, v.166, p. e012022, 2018.

YOUSEIF, S. H. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria and their effects on the growth of maize plants under greenhouse conditions. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 63, p. 25-35, 2018.

ZAHIR, A. Z.; ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, M. T. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. **Advances in Agronomy**, v. 81, p. 98-169, 2004.

5. CAPÍTULO II - Biological N fixation and physiological responses of maize and sorghum inoculated with plant growth-promoting bacteria. Submetido a revista Theoretical and Experimental Plant Physiology.

5.1 Abstract

As important cereal species, maize and sorghum are cropped in several countries, being used as human food and animal feeding. These crops demand high amount of N and the optimization of BNF could contribute with N and, at the same time, improve some important physiological traits, such as chlorophyll, amino acids, and proteins. Here, we hypothesized that PGPB, combined with N-fertilizer, would be able to promote plant growth and improve N metabolism and efficiency on maize and sorghum. Thus, this study aimed to evaluate the inoculation of PGPB, combined or not with N-fertilizer, on the growth and N metabolism of maize and sorghum. In the study, the inoculation with PGPB was evaluated in isolation and in association with

nitrogen fertilization in 50% of the recommended, in this condition, in maize grown without N, IPACC01, IPACC08, IPACC26, IPACC29, IPACC38, IPACC55 and IPACC58 increased the shoot dry weight; while IPACC07, IPACC10, IPACC38, IPACC53, and IPACF40 increased the root dry weight. When maize was grown with N, IPACC29, IPACC53, IPACC55, and IPACC59 increased the plant biomass. In sorghum grown without N, IPACC07, IPACC26, IPACC38, and IPACC55 increased the biomass of root as compared to non-inoculated plants. Interestingly, IPACC55, in sorghum, and IPACC38, in both plants, promoted the highest growth of roots in plants grown without N as compared to those grown with N, as PGPB positively influences the biological fixation of N and the metabolism of N in corn and sorghum, even when the plants were cultivated with N This indicates that PGPB can supply N to corn and sorghum, through FBN, and stimulate plant growth. In both plants, PGPB increased the biomass of shoot and roots as compared to non-inoculated plants.

Keywords: Increased biomass; N accumulation; endophytic bacteria

5.2 Introduction

Mineral fertilizers have contributed to support the crop yield and productivity (LU; TIAN 2017). Particularly, N-fertilizers are the most used in agriculture since this nutrient is highly required by plants, acting on their growth and yield, and also increasing the photosynthetic rates (SUN et al. 2016; BASSI et al. 2018). Plants absorb N, from the soil, as nitrate or ammonium ions, being the first one the most uptake as it is more available due to the adsorption of ammonium by soil cation exchange matrix or microorganisms (BLOOM 2015). Since the requirement of N by plants is high, this nutrient is applied at high rates to avoid significant losses of yield (BLOCH et al. 2020). However, application of high rates of N-fertilizers can promote soil, air and water pollution (GOOD; BEATY, 2011). Regarding to soils, the intensive use of N-fertilizers has promoted acidification and degradation, and, consequently, these processes can decrease plant growth (LU and TIAN 2013; TIAN and NIU 2015).

Therefore, these environmental issues have led to find ecological and sustainable alternatives for providing N to plants instead N-fertilizers. In the last decade, plant growth-promoting bacteria (PGPB) has been recognized as an environmental, ecological and sustainable alternative to support plant growth and, at

the same time, decrease their dependency on fertilizers, mainly N-fertilizers (SOUZA et al. 2015). In plants, PGPB colonize the rhizosphere, endosphere and phyllosphere, and can enhance their growth (DONG et al. 2019). This group of bacteria presents direct strategies to increase the plant growth, such as biological N fixation (BNF) (DE LA TORRE-RUIZ et al. 2016; COMPANT et al. 2019).

BNF is a process where PGPB reduce N from the atmosphere and convert to ammonium (BRUIJN 2015), and then making it available to plants. This process has contributed with about 30% to 50% of the total N required by plants (ORMENO-ORRILLO et al. 2013). In legumes, the contribution of BNF on the total N accumulated by plants is highly variable and depends on the plant species as well as the PGPB (MARTINS et al. 2003; RUMJANEK et al. 2005). For instance, in soybean the estimates of total N derived from BNF range from 60 to 98% of the total N accumulated (ALVES et al. 2003; SALVAGIOTTI et al. 2008; COLLINO et al. 2015). By contrast, the contribution of BNF in non-legumes plants is lower than in legumes. In non-legumes plants, studies have reported that N, derived from BNF, corresponds to 36%, 48% and 57% of the total N accumulated in rice, wheat and sugarcane, respectively (LADHA et al. 2016; ANTUNES et al. 2019).

In addition to influencing BNF in plants, PGPB can also affect the metabolism of N in plants (ZEFFA et al. 2019), such as on the synthesis of important nitrogenous compounds, i.e., chlorophylls, amino acids, nucleotides and proteins (BLOOM 2015). Thus, in PGPB-inoculated plants, it could be expected any alteration on the nitrogenous compounds in plants. For instance, the inoculation of *Bacillus* sp. increased the chlorophyll content in lima bean (LIMA et al. 2016). In maize, *Azospirillum brasilense* increased leaf nitrate and ammonium, while *Bacillus* sp. decreased leaf amino acids and proteins (CALZAVARA et al. 2019). Therefore, the use of PGPB, especially those with BNF capability, can be considered as a promising tool to improve N metabolism in cereals (LADHA et al. 2016).

As important cereal species, maize and sorghum are cropped in several countries, being used as human food and animal feeding (RIBEIRO et al. 2019). These crops demand high amount of N and the optimization of BNF could contribute with N and, at the same time, improve some important physiological traits, such as chlorophyll, amino acids, and proteins. Here, we hypothesized that PGPB, combined with N-fertilizer, would be able to promote plant growth and improve N metabolism and efficiency on maize and sorghum. Thus, this study aimed to evaluate the

inoculation of PGPB, combined or not with N-fertilizer, on the growth and N metabolism of maize and sorghum.

5.3 Material and methods

5.3.1 PGPB isolates

In this study, thirteen PGPB were selected according to their contrasting biochemical potential (AQUINO et al. 2019) (Table 1). Particularly, they present high variability in producing indole-3-acetic acid (IAA) and reducing acetylene, i.e. a measurement of nitrogenase activity. Each PGPB was individually grown in Erlenmeyer containing Tryptic Soy Broth liquid culture medium at 25% and incubated under orbital shaking (200 rpm and 31 °C) for 72h. The optimum growth was verified by measuring the optical density using a spectrophotometer (wavelength of 540 nm), and a final concentration of 10^9 CFU mL⁻¹ was considered for inoculation.

Table 1. Isolates of plant growth-promoting bacteria (BPCP) used in this study

PGPB	Genera ^a	Indole-3-Acetic acid (mg L ⁻¹) ^b	Acetylene-reducing activity (nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹) ^c
IPACC01	<i>Bacillus</i> sp.	2.37	4.72
IPACC08	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	0.22	7.05
IPACC07	<i>H. seropedicae</i>	0.21	7.88
IPACC10	<i>Burkholderia</i> sp.	3.93	5.16
IPACC26	<i>B. subtilis</i>	2.99	7.10
IPACC29	<i>B. subtilis</i>	1.41	5.03
IPACC36	<i>B. pumilus</i>	30.77	6.62
IPACC38	<i>Paenibacillus</i> sp.	1.13	7.10
IPACC55	<i>Paenibacillus</i> sp.	0.68	7.66
IPACC53	No identified	2.96	0.30
IPACC58	No identified	0.44	0.75
IPACC59	No identified	1.24	0.97
IPACF40	No identified	0.54	5.52

^a Classified according to NCBI, ^b IAA: Indole-3- acetic acid and ^c ARA: Acetylene-reducing activity, by Antunes (2016) and Antunes et al. (2017).

5.3.2 Experimental procedure

All PGPB were evaluated on maize and sorghum in a pot-experiment in a greenhouse located at the Center of Agricultural Science from Federal University of Piauí (Teresina, Piauí, Brazil). Two individual experiments were conducted to compare the responses of maize (*Zea mays* L.) cv. AG-1051, and sorghum (*Sorghum bicolor* L.) cv. Palo Alto N52K1009, to inoculation of PGPB. The experiment was conducted in a completely randomized blocks design with five

replications and a 14 x 2 factorial scheme, which consisted of the combination of 14 treatments (13 PGPB and one non-inoculated plant) and two nitrogen levels (without N fertilization or fertilization with 50% of N required by the plants).

The experiments were conducted in plastic pots containing 18 dm³ of soil (Table 2). The soil contained 83%, 11% and 6% of sand, silt and clay, respectively. Before sowing, all seeds were surface disinfected with 70% alcohol (30 s) followed by 2% sodium hypochlorite (60 s), and then washed with sterile distilled water. Seeds were inoculated with 1.0 mL of the cell suspensions containing PGPB. Ten days after sowing, one plant was left in each pot. All pots received the application of P₂O₅ (2.5 and 2.1 g per pot to maize and sorghum, respectively) and K₂O (2.1 and 2.4 g per pot to maize and sorghum, respectively). For treatments with 50% of N required by the plants, it was applied ammonium sulfate (3.37 and 2.47 g per pot to maize and sorghum, respectively) at the sowing.

Table 2. Chemical characterization of the soil used in the experiments

Amostras (m)	pH H ₂ O	P ---- mg dm ⁻³ ----	K ⁺	Na ⁺	Mg ⁺²	Ca ⁺²	Al ⁺³	H+Al	SB	CTC	V %	Granulometria (%)		
							cmol c dm ⁻³					Areia	Silte	Argila
0.0 – 0.2	5.7	0.4	14.0	3.5	0.8	1.3	0.1	1.1	2.2	3.4	66.0	83	11	6

CEC = cation exchange capacity. SB = sum of basis. V = base saturation.

5.3.3 Data collection and measurements

Both plants species were collected 50 days after germination and samples of fresh leaves were collected for biochemical analysis. Afterward, leaf area was measured by using automatic leaf area meter (Model LiCor LI-3000). Shoot were separated from the roots, and both were oven-dried at 65 °C to determine the shoot and root dry weight.

In fresh leaves, total chlorophyll has been read in spectrophotometer at 646 nm and 664 nm, and the content was calculated according to Lichtenthaler and Wellburn (1983), expressed in mg g⁻¹ fresh weight (FW). Free ammonia, nitrate, total free amino acids and soluble protein were quantified using the aliquots of the supernatant (extract) obtained in water bath at 100 °C (60 min). Free ammonia was measured by the phenol-hypochlorite method (WEATHERBURN 1967). The extract was mixed with phenol-nitroprusside reagent (1% phenol and 0.005% sodium nitroprusside) and alkaline hypochlorite solution (0.5% sodium hydroxide and 0.15% sodium hypochlorite), and incubated at 37 °C (30 min). Posteriorly, the mixture was read at 625 nm. The content of free ammonia was calculated and expressed in μmol g⁻¹ FW.

Nitrate concentration was determined by nitration of salicylic acid as described by Cataldo et al. (1975). For this, the extract was mixed with 5% salicylic acid (in concentrated sulfuric acid; w/v). Posteriorly, 2.0 N sodium hydroxide was added, and the mixture was read at 410 nm. The content of nitrate was calculated and expressed in $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW.

To measure the concentration of total free amino acids (Yemm and Cocking 1955), extract was homogenized with 0.2 M citrate buffer (pH 5.0) and ninhydrin-cyanide reagent (1% ninhydrin plus 0.01 potassium cyanide in 2-methoxyethanol), and then incubated in water bath at 100 °C (15 min). Afterward, the tubes were cooled in an ice bath, 60% ethanol was added, and samples were read at 570 nm. The concentration of total free amino acids was calculated and expressed in $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW. Soluble proteins were measured after mixing aliquots of the extract with Bradford's reagent (acidified solution of Coomassie Brilliant Blue G-250) as described by Bradford (1976). The content of soluble proteins was calculated and expressed as mg g^{-1} FW.

The N content was evaluated using the semi-micro Kjeldahl method (BREMNER; MULVANEY 1982). Dry samples of shoots were ground in a Willey mill (20-mesh), mixed with catalyst (potassium sulfate, cooper sulfate pentahydrate and selenium) and concentrated sulfuric acid, and subject to boiling digestion with the temperature above 400 °C. Posteriorly, the mixture was diluted with distillate water and aliquots of the mineralized were mixed with diluent (catalyst diluted in 1.1 M sulfuric acid), solution I (2.68% dibasic sodium phosphate, 5% potassium sodium tartrate and 4% sodium hydroxide), solution II (15% sodium salicylate and 0.03% sodium nitroprusside), and 6% sodium hypochlorite. After incubation at 37 °C (15 min), the mixture was read at 650 nm. The N content was calculated and expressed as mg g^{-1} DW (dry weight).

Based on the aforementioned data, the relative, symbiotic and nitrogen use efficiencies were calculated. The relative efficiency was calculated by the ratio between shoot dry weight of the inoculated treatment and shoot dry weight of the nitrogen control multiplied by 100 (BERGENSEN et al. 1971). Nitrogen control were non-inoculated plants fertilized with 50% of N. The symbiotic efficiency, calculated only to inoculated plants, was quantified using the following formula: $(\text{N-total of inoculated}) - (\text{N-total of nitrogen control}) / (\text{N-total of nitrogen control} - \text{N-total of absolute control}) \times 100$ (BROCKWELL et al. 1966). Absolute control was non-

inoculated plants non-fertilized with N. The N use efficiency of each treatment was calculated as the square of total dry mass (in kg) divided by total nitrogen (in g) as described by Siddiqi and Glass (1981).

5.3.4 Statistical analysis

All statistical analyses were carried out separately for maize and sorghum plants. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), preceded by an F-test, and means were compared by the Scott-Knott's test, both at $p \leq 0.05$. These statistical analyses (univariate tests) were performed using the statistical software R Studio (version 3.5.2) using the ExpDes package. Principal component analysis (PCA) was performed with all data obtained, previously standardized, in order to identify the effects of inoculation with PGPB in maize and sorghum plants. This analysis was executed using the Past (v.4.02) statistics software (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>).

5.4 Results and discussion

The analysis of variance showed individual and interactive effects of the inoculation and N fertilization on the majority of variables in maize and sorghum (Table 3). In maize, the exceptions were free ammonia and N use efficiency, in N-fertilization treatments, and total chlorophyll, in the interaction. Total free amino acids did not present significant differences for inoculation and N-fertilization. In sorghum, the exceptions were total chlorophyll, root dry weight, nitrate, total free amino acids and soluble proteins, in N-fertilization, while that total free amino acids did not vary significantly for the interaction. Interestingly, except for total free amino acids in maize (Scott-Knott's test; $p = 0.07$), the inoculation influenced significantly all variables in maize and sorghum.

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) in double factorial scheme with an additional treatment performed with experimental data obtained from maize and sorghum plants

	Analysis of variance (F-value)			Coefficient of variation (%)
	Inoculation (IN)	Nitrogen (NT)	Interaction (IN x NT)	
Maize variables				
Foliar area	26.6**	66.0**	7.51**	6.9
Total chlorophyll	24.9**	44.4**	1.6 ^{NS}	8.4
Shoot dry weight	9.4**	10.0**	4.8**	8.5
Root dry weight	7.1**	5.8**	7.0**	13.7
Total nitrogen	98.9**	129.4**	13.6**	3.8
Symbiotic efficiency	101.5**	130.0**	13.5**	12.6
Relative efficiency	9.3**	9.9**	4.8**	8.6
Nitrogen use efficiency	7.5**	2.8 ^{NS}	5.8**	18.8
Free ammonia	91.4**	0.15 ^{NS}	5.4**	8.8
Nitrate	36.1**	29.1**	11.0**	9.3
Total free amino acids	1.7 ^{NS}	2.5 ^{NS}	2.8**	8.7
Soluble proteins	13.2**	3.5**	3.3**	8.8
Sorghum variables				
Foliar area	38.8**	30.9**	10.0**	7.9
Total chlorophyll	11.7**	1.6 ^{NS}	4.4**	8.9
Shoot dry weight	87.6**	26.2**	6.8**	7.7
Root dry weight	21.5**	1.9 ^{NS}	7.9**	13.2
Total nitrogen	180.4**	112.6**	18.6**	3.3
Symbiotic efficiency	191.6**	119.5**	19.7**	7.8
Relative efficiency	87.6**	26.2**	6.7**	7.7
Nitrogen use efficiency	60.4**	5.3**	9.4**	15.1
Free ammonia	19.6**	1.8**	16.1**	8.7
Nitrate	77.4**	0.25 ^{NS}	14.9**	9.3
Total free amino acids	15.2**	3.7 ^{NS}	0.63 ^{NS}	8.9
Soluble proteins	8.6**	0.48 ^{NS}	0.89 ^{NS}	8.9
Degrees of freedom	13	1	13	-

**Significant at 5%. ^{NS}Non-significant. CV = coefficient of variation.

In general, PGPB promoted higher total leaf area, chlorophyll and biomass (shoot and roots dry weight) in maize and sorghum as compared to non-inoculated plants (Figure 1 and 2). Interestingly, some PGPB improved the performance of plants grown without N fertilization when compared with those plants grown in N-fertilized soils. Thus, IPACC55 promoted the highest leaf area in maize and sorghum grown without N as compared to N-fertilized plants (Figure 1a). By the way, IPACC55 showed better performance on chlorophyll (Figure 1b) and shoot dry weight (Figure 2a) of sorghum as compared to other PGPB. In maize, IPACC10 promoted the highest values of leaf area and chlorophyll in plants grown without and with N, respectively.

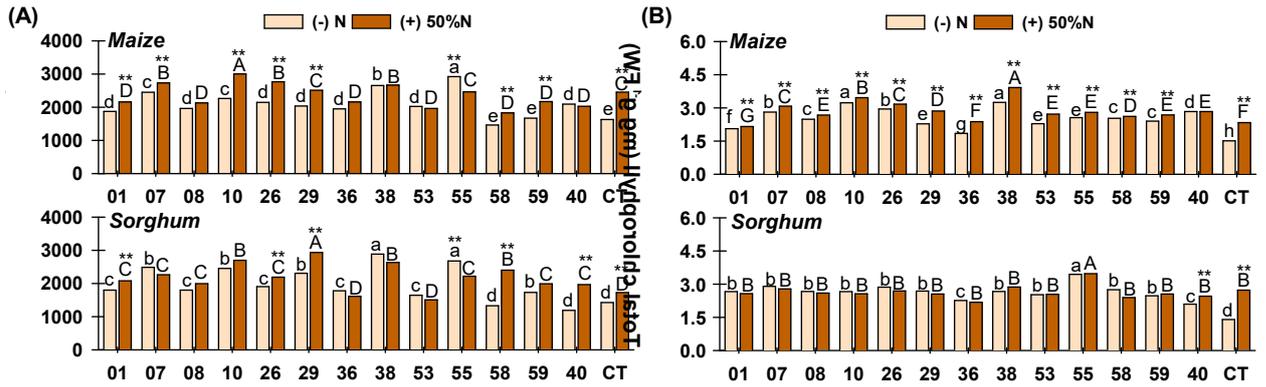


Figure 1. Total leaf area (a) and total chlorophyll (b) of maize and sorghum plants inoculated with PGPB (IPACC01, IPACC07, IPACC08, IPACC10, IPACC26, IPACC29, IPACC36, IPACC38, IPACC53, IPACC55, IPACC58, IPACC59 and IPACF40) and supplied or not with nitrogen at 50% of full fertilization. CT = plants non-inoculated. Different lowercase letters indicated the significant differences among plants when non-supplied with N, while capital letters show the significant differences among plants when supplied with 50% of full fertilization. The double asterisk (**) indicates significant differences between non-fertilized and fertilized plants in each treatment (Scott-Knott' test; $p \leq 0.05$).

In both plants, PGPB increased the biomass of shoot and roots as compared to non-inoculated plants (Figure 2).

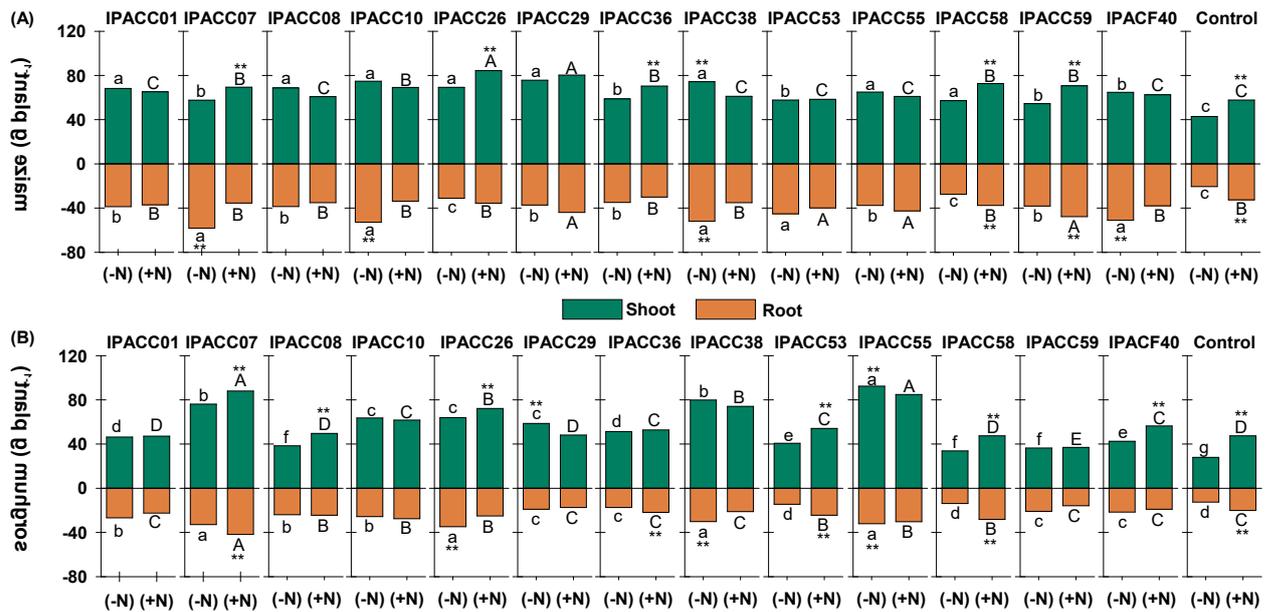


Figure 2. Shoot and root dry weight of maize (a) and sorghum (b) plants inoculated with PGPB (IPACC01, IPACC07, IPACC08, IPACC10, IPACC26, IPACC29, IPACC36, IPACC38, IPACC53, IPACC55, IPACC58, IPACC59 and IPACF40) and supplied or not with nitrogen at 50% of full fertilization. Control = plants non-inoculated. Different lowercase letters indicated the significant differences among plants when non-supplied with N, while capital letters show the significant differences among plants when supplied with 50% of full fertilization. The double asterisk (**) indicates significant differences between non-fertilized and fertilized plants in each treatment (Scott-Knott' test; $p \leq 0.05$).

In maize grown without N, IPACC01, IPACC08, IPACC26, IPACC29, IPACC38, IPACC55 and IPACC58 increased the shoot dry weight; while IPACC07, IPACC10, IPACC38, IPACC53, and IPACF40 increased the root dry weight. When

maize was grown with N, IPACC29, IPACC53, IPACC55, and IPACC59 increased the plant biomass. In sorghum grown without N, IPACC07, IPACC26, IPACC38, and IPACC55 increased the biomass of root as compared to non-inoculated plants. Interestingly, IPACC55, in sorghum, and IPACC38, in both plants, promoted the highest growth of roots in plants grown without N as compared to those grown with N (Figure 2).

The parameters related to N fixation have shown that IPACC55 increased the total N and symbiotic efficiency in maize grown with N (Figure 3a and 3b),

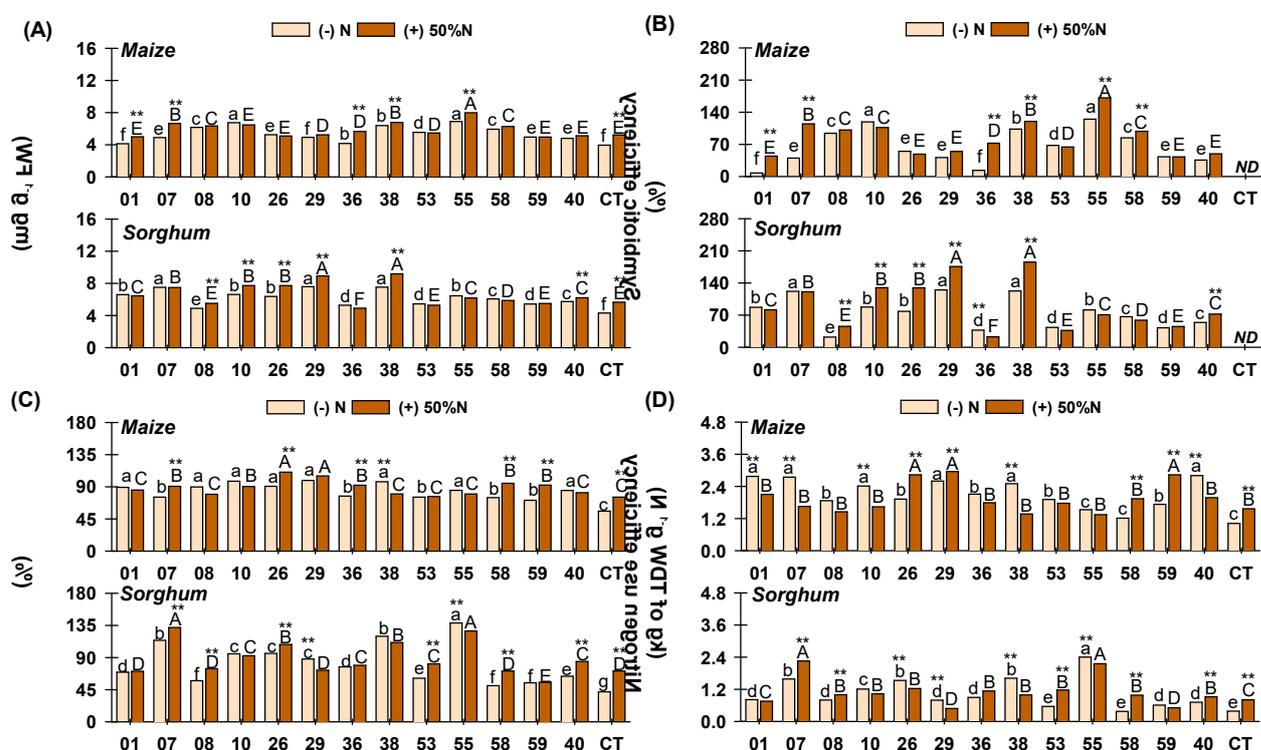


Figure 3. Total nitrogen (a), symbiotic efficiency (b), relative efficiency (c) and nitrogen use efficiency (d) of maize and sorghum inoculated with PGPB (IPACC01, IPACC07, IPACC08, IPACC10, IPACC26, IPACC29, IPACC36, IPACC38, IPACC53, IPACC55, IPACC58, IPACC59 and IPACF40) and supplied or not with nitrogen at 50% of full fertilization. CT = plants non-inoculated. ND = non-determined. Different lowercase letters indicated the significant differences among plants when non-supplied with N, while capital letters show the significant differences among plants when supplied with 50% of full fertilization. The double asterisk (**) indicates significant differences between non-fertilized and fertilized plants in each treatment (Scott-Knott' test; $p \leq 0.05$).

while that IPACC10 increased the total N and symbiotic efficiency in plants grown without N. In sorghum, IPACC29 and IPACC38 increased the total N and symbiotic efficiency. Interestingly, IPACC07 increased the total N and symbiotic efficiency in plants grown without N. The majority of PGPB increased the relative efficiency and N use efficiency in maize (Figure 3c and 3d). Thus, plants grown without N increased their relative efficiency by inoculation of IPACC01, IPACC08,

IPACC10, IPACC26, IPACC29, IPACC38, IPACC55 and IPACF40. In maize grown with N, IPACC26 or IPACC29 promoted the highest values of relative efficiency (Figure 3c). Regarding to N use efficiency, IPACC01, IPACC07, IPACC10, IPACC29, IPACC38, and IPACF40 showed better performance in plants grown without N. However, in plants grown with N, IPACC26, IPACC29, and IPACC59 were most effective. Interestingly, IPACC55 promoted the highest values of relative efficiency and N use efficiency in both plants grown with and without N; while IPACC07 increased these parameters in plants grown with N.

The content of nitrogenous compounds varied between inoculated maize and sorghum grown with or without N (Figure 4). In general, PGPB reduced the free ammonia in maize grown with or without N (Figure 4a).

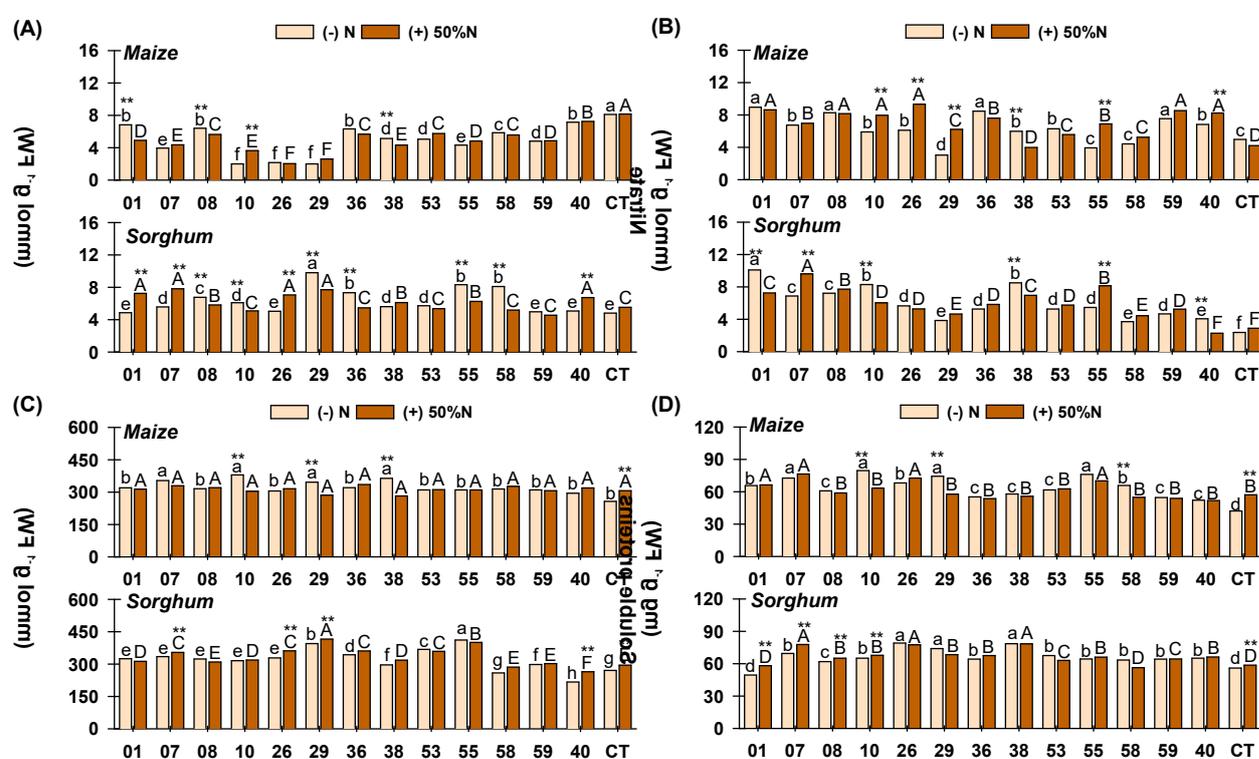


Figure 4. Free ammonia (a), nitrate (b), total free amino acid (c) and soluble proteins (d) of maize and sorghum inoculated with PGPB (IPACC01, IPACC07, IPACC08, IPACC10, IPACC26, IPACC29, IPACC36, IPACC38, IPACC53, IPACC55, IPACC58, IPACC59 and IPACF40) and supplied or not with nitrogen at 50% of full fertilization. CT = plants non-inoculated. Different lowercase letters indicated the significant differences among plants when non-supplied with N, while capital letters shows the significant differences among plants when supplied with 50% of full fertilization. The double asterisk (**) indicates significant differences between non-fertilized and fertilized plants in each treatment (Scott-Knott' test; $p \leq 0.05$).

In sorghum, lowest values of free ammonia were found in plants inoculated with IPACC01, IPACC07, IPACC26, IPACC29 and IPACF40 when grown with N; and plants inoculated with IPACC04, IPACC26, IPACC59 and IPACF40 when grown without N (Figure 4a). In maize grown with N, IPACC01, IPACC08, IPACC10, IPACC26, IPACC59 or IPACF40 increased the values of nitrate (Figure 4b). In

sorghum, IPACC01 and IPACC07 increased the values of nitrate in plants grown without and with N, respectively (Figure 4b).

The total free amino acids varied between maize and sorghum (Figure 4c). PGPB-inoculated maize grown with N did not show different content of total free amino acids as compared to non-inoculated plants; however, plants grown without N and inoculated with IPACC07, IPACC10, IPACC29 and IPACC38 displayed higher values of total free amino acids (Figure 4c). In sorghum grown with and without N, IPACC29 and IPACC55 promoted the increase in total free amino acids, respectively (Figure 4c). IPACC07 or IPACC55 promoted higher soluble proteins in maize; while IPACC29 or IPACC38 increased the soluble protein in sorghum (Figure 4d). Non-inoculated plants displayed lower content of soluble protein in maize and sorghum grown with or without N (Figure 4d).

Inoculated and non-inoculated plants were clustered separately (Figure 5), showing that all PGPB promoted distinct effect those found in non-inoculated plants, mainly in plants grown without N. The two principal axes explained 66.1% and 73.9% of the total variation in maize and sorghum grown without N, respectively (Figure 5a and 5c).

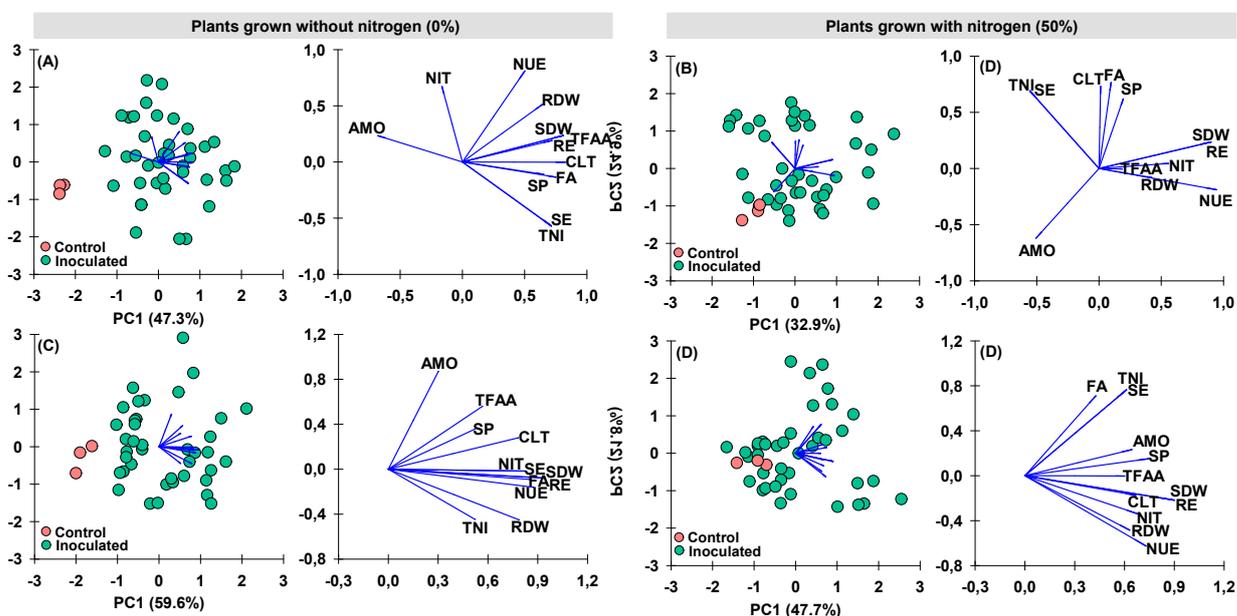


Figure 5. Principal component analysis of maize (a, b) and sorghum (c, d) plants inoculated with PGPB (IPACC01, IPACC07, IPACC08, IPACC10, IPACC26, IPACC29, IPACC36, IPACC38, IPACC53, IPACC55, IPACC58, IPACC59 and IPACF40) and supplied or not with nitrogen at 50% of full fertilization. Control = Plants non-inoculated. FA = foliar area. CLT = total chlorophyll. SDW = shoot dry weight. RDW = root dry weight. AMO = free ammonium. NIT = nitrate. TFAA = total free amino acids. SP = soluble protein. TNI = total nitrogen. RE = relative efficiency. SE = symbiotic efficiency. NUE = nitrogen use efficiency.

In plants grown with N, the two principal axes explained 57.8% and 69.5% of the total variation in maize and sorghum, respectively (Figure 5b and 5d). Inoculated maize and sorghum grown without N displayed higher plant biomass and relative and N use efficiencies (loadings > 0.4). In plants grown with N, the inoculation improves the shoot dry weight and symbiotic and N use efficiencies (loadings > 0.5) (Figure 5d).

Selected PGPB were inoculated in maize and sorghum that were grown with and without N fertilization. In line with the hypothesis, the inoculation of PGPB, independent of N-fertilization, was able to promote plant growth and improve N metabolism and efficiency on maize and sorghum. It is an interesting finding since N is the most required nutrient by maize and sorghum and can confirm that the use of PGPB could be a potential ecological and sustainable strategy to increase plant performance and, at the same time, reduce the use of N-fertilizers. Interestingly, all PGPB used in this study were previously inoculated in sugarcane and showed high potential for increasing the growth and BNF (Antunes et al. 2017).

Although the inoculation of PGPB, in general, increased the growth and N metabolism in maize and sorghum, there were differences between PGPB on the responses of plants, even when the plants were grown without N fertilization as compared to those fertilized ones. Therefore, IPACC55 can be highlighted as a potential PGPB by increasing leaf area in both plants, while promoted higher chlorophyll content and shoot dry weight in sorghum. On the other hand, IPACC10 has promoted higher leaf area and chlorophyll content in maize. Leaf area and chlorophyll are important parameters related to photosynthesis and plant growth, and previous studies have reported high leaf area associated to chlorophyll on photosynthetic rates and growth of maize (LI et al. 2015) and sorghum (SILVA et al. 2019). Although in this study we did not estimate the photosynthesis, these results suggest IPACC55 and IPACC10 as potential to promote maize and sorghum growth through of higher photosynthetic rates. Interestingly, IPACC55 also contributed for increasing the root growth of maize, while IPACC38 stimulated more roots in both plants.

All PGPB used in this study were classified according their biochemical capabilities (ANTUNES et al. 2017). Particularly, IPACC10 (*Burkholderia* sp.) presented high capability to produce IAA, while IPACC55 and IPACC38 (*Paenibacillus* sp.) had high acetylene-reduction activity, i.e., nitrogenase activity. These features could explain the higher maize growth with the inoculation of

IPACC10, and the values of total N and symbiotic efficiency in maize and sorghum inoculated with IPACC55 and IPACC38, respectively, even when plants were grown with N. *Burkholderia* and *Paenibacillus* are well recognized as potential plant growth-promoters with high performance on BNF. Particularly, *Burkholderia* presents high efficiency on nitrogenase activity and BNF in non-legumes plants, being found as plant growth-promoter of maize and sorghum (PERIN et al. 2006; AQUINO et al. 2019). *Paenibacillus* presents *nifH* gene encoding Fe protein of nitrogenase and shows nitrogenase activity (Liu et al. 2019), being potentially suggested to be used as biofertilizer to some crops, such as maize, wheat and sugarcane (HAO and CHEN 2017; AQUINO et al. 2019).

We can also highlight the potential of IPACC07 and IPACC08, identified as *Herbaspirillum seropedicae*, in contributing with N to plants. *Herbaspirillum seropedicae* is an N-fixing bacterium mostly associated to maize, sugarcane and sorghum (MONTEIRO et al. 2008). Previous studies have reported increases on the growth and N fixation in maize and sorghum with the inoculation of *H. seropedicae* (RIBAUDO et al. 2006), *Paenibacillus* sp. (AQUINO et al. 2019) and *Burkholderia* sp. (SCHLEMPER et al. 2018). Interestingly, when compared to plants grown without N, the inoculation of maize and sorghum with IPACC08 (*H. seropedicae*) induced the decrease in free ammonia content in plants grown with N. Since that accumulated free ammonia is toxic to plants, it is possible that IPACC08 stimulated their assimilation to avoid the leaf necrosis and other negative effects, and therefore the synthesis of nitrogenous compounds can be increased (WANG et al. 2014). The higher biomass associated to the higher total free amino acids and soluble proteins in plants inoculated with PGPB, when compared with non-inoculated plants, indicate that free ammonia was efficiently incorporated in organic molecules or structures.

Interestingly, maize and sorghum grown with N and inoculated with PGPB showed lower concentration of free ammonia, while increased their content of nitrate. It suggests higher availability of nitrate in the root zone, and an unbalance between uptake and reduction of this compound (LIU et al. 2014; BLOOM 2015). Nitrate reduction is linked with photorespiration and, then, any conditions that decrease this process can affect directly the assimilation of nitrate (BLOOM et al. 2010; WALKER et al. 2014). Previously, *Azospirillum brasilense* increased the concentration of nitrate in plants grown with N (CALZAVARA et al. 2019). Finally, this study has shown that PGPB increased plant biomass, chlorophyll and total N, and it suggest positive

influence of inoculation on photosynthesis, while that the photorespiration, probably, is operating in lower rates in these plants. In addition, the reduction in nitrate assimilation is associated to the translocation and accumulation of this compound in vacuoles, and the plants use this strategy to maintain a favorable water status in their tissues (WANG et al. 2014).

5.5 Conclusion

PGPB influence positively the biological N fixation and N metabolism in maize and sorghum, even when plants were grown with N. It indicates that PGPB can provide N to maize and sorghum, through BNF, and stimulate the plant growth. Positively, IPACC07, IPACC08, IPACC10, IPACC38 and IPACC55 presented potential to be indicated as PGPB in maize and sorghum. This study suggests that these PGPB may be useful to improve N nutrition, biomass and yield in maize and sorghum, and further studies should be done under field conditions.

5.6 References

- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 1-9, 2003.
- ANTUNES, J. E. L. et al. Sugarcane inoculated with endophytic diazotrophic bacteria: effects on yield, biological nitrogen fixation and industrial characteristics. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, 2019.
- ANTUNES, J. E. L. et al. Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Genetics and Molecular Research**. v. 16, n. 2, 2017.
- AQUINO, J. P. A. et al. Plant growth-promoting endophytic bacteria on maize and sorghum1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, p. e56241-e56241, 2019.
- BASSI, D.; MENOSSI, M.; MATTIELLO, L. Nitrogen supply influences photosynthesis establishment along the sugarcane leaf. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.
- BERGENSEN, F. J. et al. Studies of natural populations and mutants of Rhizobium in the improvement of legume inoculants. **Plant and Soil**, v. 35, n. 1, p. 3-16, 1971.
- BLOCH, S. E. et al. Biological nitrogen fixation in maize: optimizing nitrogenase expression in a root-associated diazotroph. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 15, p. 4591-4603, 2020.
- BLOOM, A. J. The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. **Current opinion in plant biology**, v. 25, p. 10-16, 2015.
- BLOOM, A. J. et al. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and Arabidopsis. **Science**, v. 328, n. 5980, p. 899-903, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

- BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. Salicylic acid-thiosulphate modification of Kjeldahl method to include nitrate and nitrite. **Agronomy**, v. 9, p. 621-622, 1982.
- BROCKWELL, J.; HELY, F. W.; NEAL-SMITH, C. A. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 6, n. 23, p. 365-370, 1966.
- BRUIJN, F. J. Biological nitrogen fixation. In: Lugtenberg B (eds) Principles of Plant-Microbe Interactions. **Principles of Plant-Microbe Interactions**. Springer, Cham, p. 215-224. 2015.
- CALZAVARA, A. K. et al. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. **Plant Biology**, v. 20, n. 5, p. 870-878, 2018.
- CATALDO, J. M. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.
- COLLINO, D. J. et al. Biological nitrogen fixation in soybean in Argentina: Relationships with crop, soil, and meteorological factors. **Plant and Soil**, v. 392, n. 1-2, p. 239-252, 2015.
- COMPANT, S. et al. A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of advanced research**, v. 19, p. 29-37, 2019.
- DE LA TORRE-RUIZ, N. et al. Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 587-596, 2016.
- DONG, C. J. et al. Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. **PloS One**, v. 14, n. 11, p. e0223847, 2019.
- GOOD, A. G.; BEATTY, P. H. Fertilizing nature: a tragedy of excess in the commons. **PLoS Biology**, v. 9, n. 8, p. e1001124, 2011.
- HAO, T.; CHEN, S. Colonization of wheat, maize and cucumber by *Paenibacillus polymyxa* WLY78. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0169980, 2017.
- LADHA, J. K. et al. Global nitrogen budgets in cereals: A 50-year assessment for maize, rice, and wheat production systems. **Science Report**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016.
- LI, C. F. et al. Increased grain yield with improved photosynthetic characters in modern maize parental lines. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 9, p. 1735-1744, 2015.
- LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, n. 5, p. 591-592, 1983.
- LIMA, E. F. et al. Varieties of lima bean shows different growth responses when inoculated with *Bacillus* sp., a plant growth-promoting bacteria. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 5, p. 1221-1233, 2016.
- LIU, X. et al. *Paenibacillus* strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth. **PeerJ**, v. 7, p. e7445, 2019.

- LIU, X. Y. et al. Nitrate dynamics in natural plants: insights based on the concentration and natural isotope abundances of tissue nitrate. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 355, 2014.
- LU, C.; TIAN, H. Net greenhouse gas balance in response to nitrogen enrichment: perspectives from a coupled biogeochemical model. **Global change biology**, v. 19, n. 2, p. 571-588, 2013.
- LU, C. C.; TIAN, H. Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance. **Earth System Science Data**, v. 9, p. 181, 2017.
- MARTINS, L. M. V. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, n. 6, p. 333-339, 2003.
- MONTEIRO, R. A. et al. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 932-937, 2008.
- ORMENO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: ROSENBERG, E. et al. (eds) *The prokaryote*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, v.1, pp. 427-451, 2013.
- PERIN, L. et al. Diazotrophic burkholderia species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3103-3110, 2006.
- RIBAUDO, C. M. et al. Effect of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation on maize nitrogen metabolism. **Maydica**, v. 51, n. 3, p. 481-485, 2006.
- RIBEIRO, K. O. et al. Characterization and proposal of potential use in foods of coproducts from waxy maize wet milling. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 315-320, 2019.
- RUMJANEK, N. G. et al. Fixação biológica de nitrogênio. In: Freire Filho FR, Lima JAA, Ribeiro VQ (ed.). *Feijão-caupi: Avanços tecnológicos*. Brasília: Embrapa, v. 8, p. 279-335, 2005.
- SALVAGIOTTI, F. et al. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. **Field Crops Research**, v. 108, n. 1, p. 1-13, 2008.
- SCHLEMPER, T. R. et al. Effect of *Burkholderia tropica* and *Herbaspirillum frisingense* strains on sorghum growth is plant genotype dependent. **PeerJ**, v. 6, p. e5346, 2018.
- SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 289-302, 1981.
- SILVA, M. L. S. et al. Growth and photosynthetic parameters of saccharine sorghum plants subjected to salinity. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 41, p.e42607, 2019.
- SOUZA, R. D.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and molecular biology**, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.

SUN, J. et al. Nitrogen can improve the rapid response of photosynthesis to changing irradiance in rice (*Oryza sativa* L.) plants. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

TIAN, D.; NIU, S. A global analysis of soil acidification caused by nitrogen addition. **Environmental Research Letters**, v. 10, n. 2, p. 024019, 2015.

WALKER, B. J. et al. The response of cyclic electron flow around photosystem I to changes in photorespiration and nitrate assimilation. **Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 453-462, 2014.

WANG, M. et al. New insight into the strategy for nitrogen metabolism in plant cells. In: Kwang, W. J. (ed) **International Review of Cell and Molecular Biology**. Vol. 310, New York: Academic Press, p.1-37, 2014.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.

YEMM, E. W.; COCKING, E. F. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-209, 1955.

ZEFFA, D. M. et al. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **PLoS One**, v. 14, n. 4, p. e0215332, 2019.

6. CAPÍTULO III - Produtividade de milho verde e sorgo sacarino submetidos a inoculação com bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada

6.1 Introdução

Após a revolução verde, os fertilizantes minerais têm sido utilizados intensivamente na agricultura como mecanismo para aumentar a produtividade das culturas, buscando atender à demanda mundial de alimentos de uma população crescente. Dentre os nutrientes requeridos, o nitrogênio é fundamental à maioria das culturas e necessita ser absorvido em grandes quantidades. Uma das formas de suprir a necessidade de N das plantas é através da adubação nitrogenada. No entanto, seu uso indiscriminado pode afetar as propriedades do solo, em que a lixiviação pode provocar a contaminação da água (RASHMI et al., 2020). Nesse contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) é considerado um dos métodos mais promissores para melhorar o manejo de fertilizantes nitrogenados e aumentar a produtividade agrícola (DELLAGI et al., 2020).

O uso de BPCP pode propiciar à planta a redução no aporte externo de fertilizantes, uma maior eficiência no uso do N e a redução da lixiviação de nitrato através do perfil do solo, evitando, assim, a poluição da água e a contaminação dos mananciais. Existem vários efeitos positivos atribuídos às BPCP, como a promoção do crescimento vegetal, controle biológico de pragas e doenças, fixação biológica de nitrogênio (FBN), conversão de fosfatos insolúveis em formas assimiláveis pelas plantas (PATHAK et al., 2017), indução de resistência sistêmica (HALLMANN, 1997), produção de sideróforos e produção de antibióticos (GLICK, 2012). Nesse contexto, Moreira e Siqueira (2006) já admitiam que a utilização dessas bactérias seria provavelmente uma das táticas mais importantes para o aumento da produção agrícola na atualidade devido à demanda emergente em diminuir a dependência de fertilizantes minerais e a necessidade de desenvolvimento de uma agricultura sustentável.

Os estudos com inoculação de BPCP iniciaram há mais de 70 anos no Brasil (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Porém, o uso da tecnologia em Poaceas é baixo, pois o mercado direcionou a produção de inoculantes comerciais para as culturas de leguminosas com destaque para a soja, que é a cultura referência de aplicação de microrganismos no cultivo (MARTINS et al., 2018). Os estudos com Poaceas têm

sido realizados com menor interesse econômico, pois os resultados demonstram respostas menores que as leguminosas.

As Poaceas tais como milho, cana-de-açúcar, arroz, trigo, sorgo destacam-se entre as espécies não leguminosas, devido ao seu potencial econômico. Atualmente, os estudos têm se voltado para pesquisas com prospecção de estirpes para essas culturas, pois poucos são os inoculantes comercializáveis para as Poaceas. A cultura do milho se destaca nesse setor, pois já estão disponíveis no mercado inoculantes produzidos por seis empresas no Brasil e registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Além disso, existe uma lista com microrganismos recomendados para a produção de inoculantes no Brasil para milho e trigo (INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 24 DE MARÇO DE 2011). Entretanto, até 2018, a única espécie que possuía registro e se fazia presente na lista de recomendados era a *Azospirillum brasilense*, possivelmente por ser a mais estudada mundialmente para esse grupo.

Recentemente, em 2020, foram apresentados estudos de viabilidade técnica e econômica do Biomaphos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas Culturas de Milho e Soja (OLIVEIRA et al. 2020). Embora pesquisas com outras BPCP em Poaceas tenha mostrado respostas eficientes (SANTOS et al., 2017; SCHLEMPER et al., 2018; AQUINO et al., 2019; AHMED et al., 2020; CARLSON et al., 2020; ROSA et al., 2020), poucos produtos comerciais são encontrados no mercado. É possível observar diferentes resultados mostrando a necessidade de estudos com uma gama maior de isolados, direcionado à sua especificidade com cada cultura que interage. Além disso, são necessários estudos a campo com o foco na produtividade. Neste sentido, objetivou-se com esse estudo avaliar o crescimento morfofisiológico, a produtividade em duas Poaceas, milho verde e sorgo sacarino, em dois ciclos de cultivo na região de Teresina-PI.

6.2 Material e Métodos

O desempenho produtivo das culturas em resposta à inoculação foi avaliado utilizando-se os seis melhores isolados bacterianos do experimento anterior que foram testados na condição de campo nas safras 2018/19 e 2019/20, nas culturas do milho verde e sorgo sacarino, em condições de sequeiro. O trabalho foi desenvolvido em área experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade

Federal do Piauí – UFPI, sendo que nos dois ciclos a mesma parcela recebeu o mesmo tratamento (Figura 1).

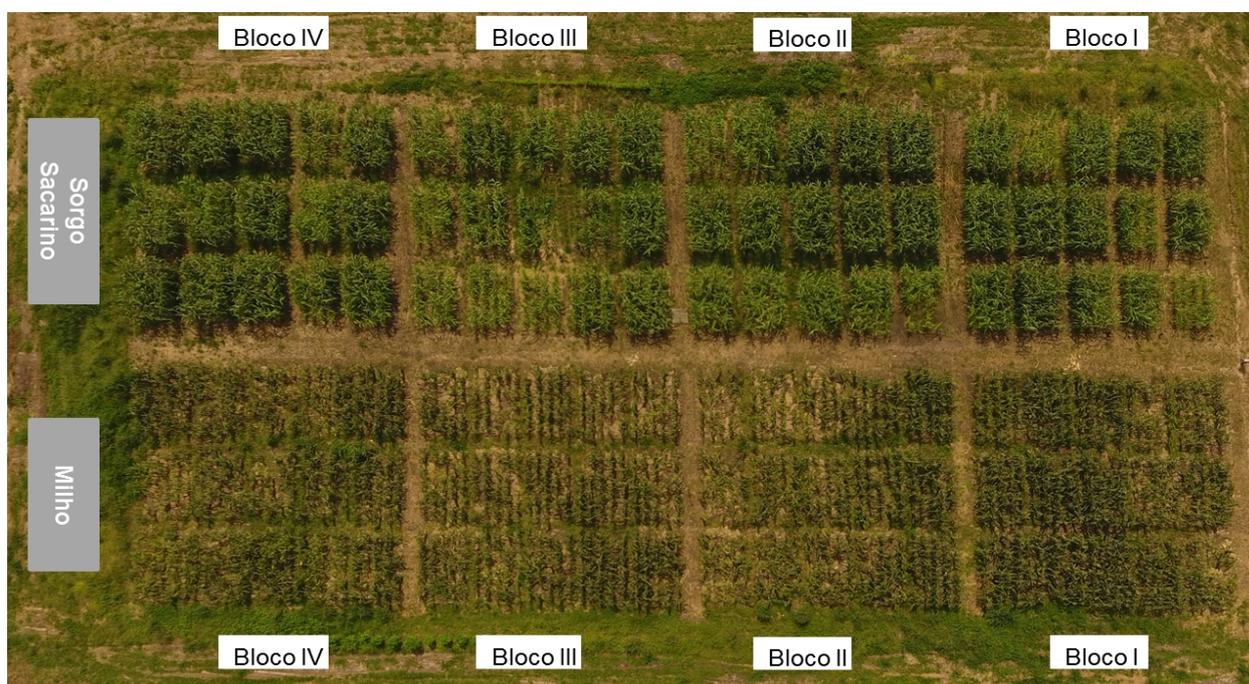


Figura 1. Área experimental utilizada para o cultivo de sorgo sacarino e milho, nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em esquema fatorial (7x2) + 1 que consistiu na combinação de sete tratamentos, sendo os seis isolados (Tabela 1), mais uma parcela não inoculada e duas doses de N (sem adubação com N ou adubação com 50% do N exigido pelas plantas). O tratamento adicional consistiu na adubação nitrogenada total.

Tabela 1. Isolados de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) usadas no estudo

BPCP	Gênero ^a	Ácido indol-3-acético (mg L ⁻¹) ^b	Atividade redutora do acetileno (nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹) ^c
IPACC07	<i>H. seropedicae</i>	0.21	7.88
IPACC10	<i>Burkholderia</i> sp.	3.93	5.16
IPACC26	<i>B. subtilis</i>	2.99	7.10
IPACC29	<i>B. subtilis</i>	1.41	5.03
IPACC38	<i>Paenibacillus</i> sp.	1.13	7.10
IPACC55	<i>Paenibacillus</i> sp.	0.68	7.66

^a Identificado de acordo com o NCBI, ^b AIA: ácido indol-3-acético e ^c ARA: atividade redutora do acetileno, por Antunes (2016) e por Antunes et al. (2017).

Na cultura do milho verde, cada parcela teve cinco fileiras de 5,0 m de comprimento por 2,8 m de largura, com o espaçamento entre linha de 0,70 m e espaçamento entre plantas de três plantas por metro linear. Contendo 16 plantas por linha e 5 linhas de cultivo, totalizaram-se 80 plantas por parcela em uma área de 14

m². O experimento possuiu uma área total de 840 m², sendo que cada bloco teve 210 m² e a área útil foi de 5,6 m² por parcela. Para a cultura do sorgo sacarino, devido a população de plantas recomendadas ser diferente, utilizou-se cinco fileiras de 4,0 m de comprimento por 2,8 m de largura, com o espaçamento entre linha de 0,70 m. Foram cultivadas sete plantas por metro linear, sendo 28 por linha. Utilizou-se 5 linhas de cultivo, perfazendo 140 plantas por parcela, onde cada parcela teve 11,2 m² e cada bloco 168 m². Além disso, como a distância foi de 1,00 m entre as parcelas, a área total de experimento cultivado foi de 672 m², com área útil de 4,2 m² por parcela (Figura 1).

Antes da implantação dos experimentos, foram coletadas as amostras de solo das áreas experimentais nas profundidades de 0,00-0,20 m. Estas foram encaminhadas para avaliações químicas e granulométricas do solo no Laboratório de Análises de Solo (LASO) da UFPI. A partir dos resultados obtidos (Tabela 2), realizou-se calagem e adubação, seguindo a recomendação de Sousa e Lobato (2004). A calagem ocorreu três meses antes do semeio, apenas no primeiro ciclo e foi realizada com 300 kg ha⁻¹ de calcário dolomítico, com PRNT de 91% que foi incorporado ao solo na profundidade de 20 cm, visando corrigir o pH para 6,5.

Tabela 2. Caracterização química do solo da área experimental

Amostras (m)	pH H ₂ O	P ---- mg dm ⁻³ ----	K ⁺	Na ⁺	Mg ⁺²	Ca ⁺²	Al ⁺³	H+Al cmol c dm ⁻³	SB	CTC	V %	Granulometria (%)		
												Areia	Silte	Argila
0,0 – 0,2	5,7	0,4	14,0	3,5	0,8	1,3	0,1	1,1	2,2	3,4	66,0	83	11	6

CTC = capacidade de troca catiônica. SB = soma da base. V = saturação de base.

A adubação de fundação foi realizada com a aplicação de fósforo e potássio, sendo o cloreto de potássio aplicado de forma parcelada (30% em fundação e 70% aos 30 dias após a semeadura dos tratamentos). Utilizou-se para milho verde e sorgo sacarino, respectivamente, 285 e 235 kg ha⁻¹ de superfosfato triplo e 230 e 260 kg ha⁻¹ de cloreto de potássio. Realizou-se ainda a adubação nitrogenada de acordo com o tratamento, de maneira que alguns deles receberam 50% da adubação nitrogenada recomendada e a testemunha nitrogenada recebeu os 100% da dose, que corresponde a 150 e 100 kg de N por hectare, 750 e 500 kg de sulfato de amônio por hectare, nas culturas do milho verde e sorgo sacarino, respectivamente.

Os isolados foram crescidos em Erlenmeyers contendo 50 mL de meio líquido (TSB – Caldo Triptona de Soja) e incubados em agitador rotatório tipo shaker (200 rpm; 31 °C) por 72 h até a turvação do meio de cultura. O crescimento bacteriano foi verificado pela densidade óptica (absorbância) no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro, sendo considerados aptos para inoculação os que atingiram 10^8 UFC mL⁻¹. Antes do semeio, as sementes foram submetidas à desinfestação com álcool a 70%, hipoclorito de sódio a 2 - 2,5% e água destilada autoclavada (VINCENT, 1970). Posteriormente, foram secas em papel toalha autoclavado. Depois de secas, as sementes foram imersas no inoculante líquido onde permaneceram por cerca de 60 min e, em seguida, foram semeadas. Aos dez dias após a semeadura (DAS), foi realizado o replantio e a reinoculação a partir da pulverização do inoculante líquido diluído em água na proporção 5:1 sobre o solo próximo às plantas.

Ao longo do ciclo das culturas, foram coletadas informações climáticas: precipitação, obtida com pluviômetros instalados na própria área, temperatura e umidade relativa do ar, coletadas por meio de equipamento termo-higrômetro, instalado nas proximidades das parcelas (Figura 2). Dessa forma, foi possível acompanhar, durante o desenvolvimento das plantas, as alterações climáticas nos dois ciclos.

As plantas permaneceram o ciclo completo de cada cultura, 69 e 110 dias para milho verde e sorgo sacarino, respectivamente, para que fosse avaliada a produtividade. Aos 60 (milho verde) e 80 (sorgo sacarino) dias após a emergência (DAE), foram escolhidas ao acaso cinco plantas dentro da área útil de cada parcela onde foram coletadas as folhas índices, sendo na cultura do milho verde a 1ª folha fisiologicamente madura, oposta e abaixo da espiga, e para o sorgo sacarino a folha “mais três”. As folhas foram desinfestadas superficialmente em solução 0,1% de detergente, lavadas com água destilada, secas em estufa com circulação de ar forçada a 65 °C. Após atingirem massa constante durante a secagem, foram conduzidas ao moinho Wiley (com peneiras de 20 mesh) e analisadas com relação ao conteúdo de N total pelo método semimicro-Kjeldahl, utilizando-se a metodologia descrita por Bremner; Mulvaney (1982).

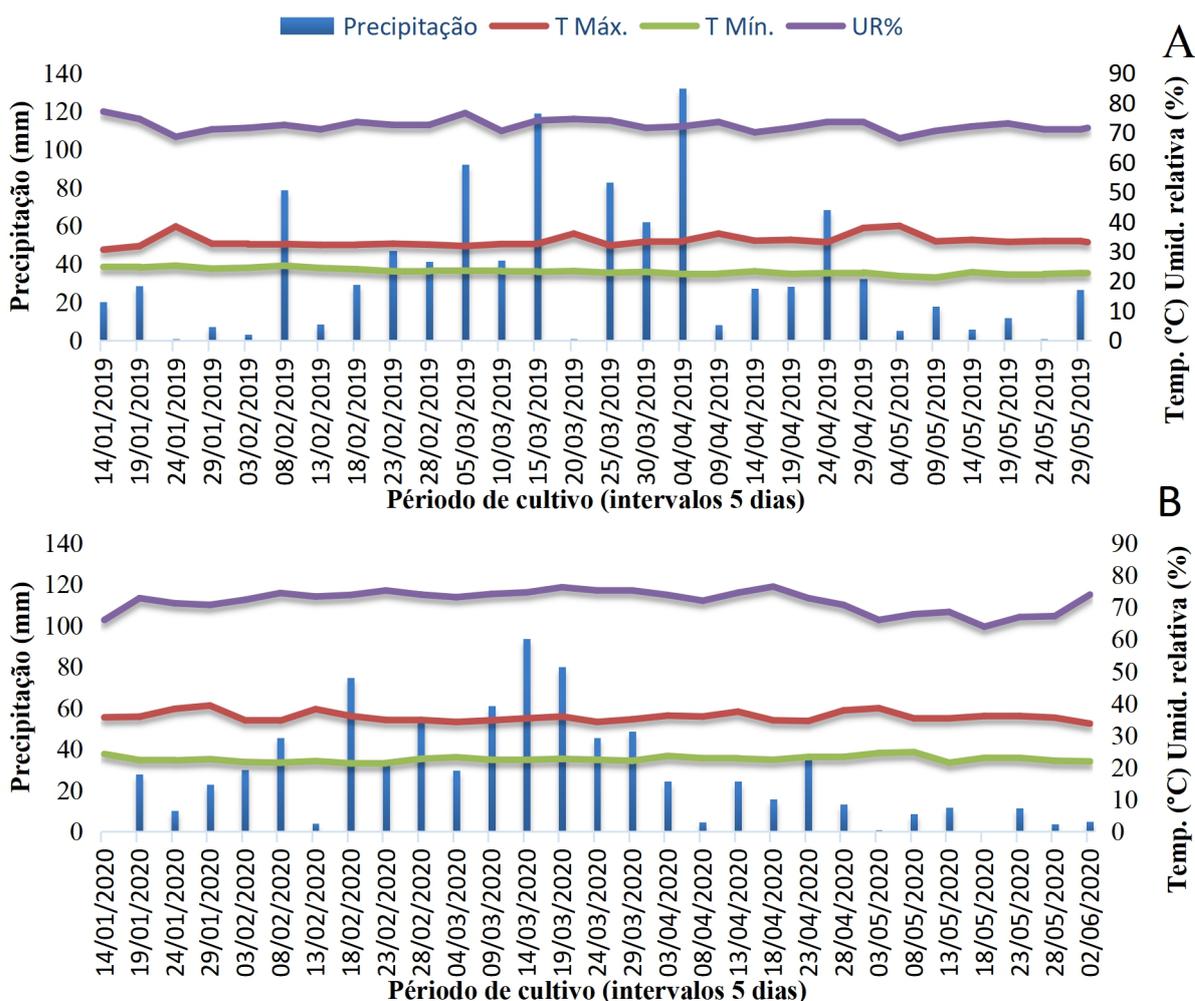


Figura 2. Precipitação pluviométrica, temperatura máxima (T Máx.), mínima (T Mín.) e Umidade relativa do ar, com intervalo de cinco dias, registradas na área de cultivo durante o período dos experimentos com milho verde e sorgo sacarino, nas safras 2018/19 (A) e 2019/20 (B). Teresina, PI, 2021

Para a colheita do milho verde, foram realizadas amostragens em que todas as espigas da área útil de cada parcela foram retiradas quando mais de 50% das espigas estavam no estágio R3, grão leitoso verde. As amostras foram pesadas com palhada e, em seguida, 10 foram selecionadas ao acaso e pesadas sem a palhada. Foram avaliados os seguintes índices ou variáveis: Peso total de espigas (PTE) e peso de espigas comerciais (PEC): peso total das espigas da área útil de cada parcela; Peso médio de espigas despalhadas (PECD): peso total de 10 espigas selecionadas ao acaso; Comprimento médio de espigas comerciais em cm (CESPC): foi considerado da base da espiga até o ápice; Diâmetro médio de espigas comerciais em cm (DESPC); Número de fileiras por espiga (NFE) e número de grãos por fileira (NGF); Número total de espigas comerciais (NTEC); Número total de espigas (NTE): número de espigas na área útil da parcela; Produtividade de espigas,

totais e comerciais, porcentagem de espigas comerciais (%ESPC). Foram consideradas espigas comerciais empalhadas aquelas com tamanho superior a 25 cm, conforme Silva et al. (2003) e com diâmetro superior a 5 cm. As despalhadas foram aquelas com tamanho superior a 15 cm, conforme Paiva Junior et al. (2001) e com diâmetro superior a 3,5 cm, bem granadas e isentas de pragas e doenças, adequadas à comercialização.

Após a colheita das espigas, aos 75 DAE, foi realizada a colheita das plantas para determinação da produtividade de biomassa seca total, onde se realizou o corte e a pesagem de todas as plantas da área útil de cada parcela. Com a biomassa fresca de cada parcela, retirou-se uma amostra, a qual foi picada em forrageira, sendo que se retirou uma amostra do material picado que foi pesado ainda fresco para determinação da massa úmida. Posteriormente, o material foi acondicionado em estufa à 65 °C até atingir a massa seca constante, onde determinou-se a biomassa seca total, em Mg ha⁻¹. Esta metodologia também foi adotada no sorgo sacarino, com a diferença que sua colheita ocorreu aos 110 DAE.

A colheita do sorgo sacarino foi realizada na área útil das parcelas, quando os grãos estavam na maturidade fisiológica, momento em que os grãos atingiram aspecto farináceo, ponto no qual se tem a maior concentração de açúcar no colmo. Foi mensurada a biomassa seca total em Mg ha⁻¹. Após a pesagem para a produtividade, foram selecionados aleatoriamente 10 colmos da área útil de cada parcela. Estes foram levados ao laboratório da Usina COMVAP para realização das avaliações tecnológicas, conforme normas técnicas do Conselho de Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de Pernambuco (CONSECANA/PE, 2007). Foram mensurados: Sólidos solúveis totais do caldo (BRIX %), porcentagem de pol do colmo de sorgo sacarino, pureza do caldo, teor de fibra, açúcares redutores do caldo (ARC) e açúcar total recuperável (ATR).

Após a verificação da normalidade ($p > 0,05$) e a constatação da homogeneidade das variâncias, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Na comparação entre médias de tratamento foi utilizado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância de erro. As análises foram realizadas utilizando o programa computacional Genes (Cruz, 2013). Visando realizar comparações múltiplas entre as médias dos tratamentos e da testemunha nitrogenada, fez-se o contraste pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa computacional R Core Team (2020).

6.3 Resultados e Discussão

Mais de 90% dos parâmetros biométricos avaliados nas espigas obtiveram interação significativa entre os fatores inoculação e adubação nitrogenada. Apenas para número de grãos por fileiras, nos dois ciclos, não houve interação significativa ($p>0,05$) e no ciclo 2018/19 para comprimento de espiga empalhada e a relação de peso (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo das análises de variância para os parâmetros biométricos das espigas colhidas: Diâmetro, comprimento e peso das espigas com e sem palha, e a relação entre as espigas despalhadas e empalhadas para o milho verde nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

	Espigas de Milho Verde 2018/19 (Quadrados Médios)						CV (%)
	Fonte de variação						
	Inoculação (IN)	Nitrogênio (NT)	Interação (IN x NT)	Tratamento Adicional x Fatorial	Bloco	Erro	
Diâmetro empalhada	156,86**	52,21 ^{ns}	98,60**	29,89 ^{ns}	312,27**	20,71	7,74
Diâmetro despalhada	106,50**	170,50**	67,18**	13,46 ^{ns}	294,53**	15,91	8,05
Relação diâmetro	85,57**	33,02 ^{ns}	91,11**	1,32 ^{ns}	125,05**	28,14	6,31
Comprimento empalhada	48,05**	22,80*	5,10 ^{ns}	1,32 ^{ns}	11,55 ^{ns}	5,04	7,84
Comprimento despalhada	22,36**	31,11*	38,46**	15,68*	147,63**	4,90	10,86
Relação comprimento	250,17**	2,18 ^{ns}	353,12**	125,55 ^{ns}	2273,63**	69,54	11,68
Peso empalhada	40846,49**	107919,77**	23098,22**	7413,71 ^{ns}	82501,27**	4860,58	17,82
Peso despalhada	21676,93**	70987,54**	14625,02**	5296,60*	63295,60**	2515,71	18,98
Relação peso	216,81**	52,21 ^{ns}	55,89 ^{ns}	16,96 ^{ns}	222,67**	45,27	9,99
Número de fileiras	17,23**	9,25 ^{ns}	1,41 ^{ns}	0,72 ^{ns}	9,40*	2,48	10,66
Número de grãos na fileira	57,57**	39,11 ^{ns}	37,21*	10,90 ^{ns}	36,13 ^{ns}	17,45	10,34
Espigas de Milho Verde 2019/20 (Quadrados Médios)							
Diâmetro empalhada	158,70**	64,46 ^{ns}	162,09**	12,69 ^{ns}	531,20**	18,71	8,33
Diâmetro despalhada	77,33**	107,18**	77,55**	8,13 ^{ns}	449,00**	13,89	8,67
Relação diâmetro	95,06**	3,77 ^{ns}	103,35**	0,02 ^{ns}	39,97 ^{ns}	31,75	6,80
Comprimento empalhada	114,03**	0,11 ^{ns}	39,56**	0,71 ^{ns}	389,91**	8,85	9,75
Comprimento despalhada	91,78**	24,44 ^{ns}	30,14**	31,72**	246,95**	6,68	11,90
Relação comprimento	793,44**	48,02 ^{ns}	195,56*	263,09*	2711,13**	75,08	12,13
Peso empalhada	49691,17**	62350,50**	25373,46**	3524,19	20835,88**	4083,33	18,56
Peso despalhada	23158,66**	26620,21**	18153,22**	4138,79*	11123,15**	1945,87	19,60
Relação peso	347,70**	4,64 ^{ns}	166,14*	48,66 ^{ns}	163,31 ^{ns}	76,37	13,32
Número de fileiras	26,39**	14,14*	4,96 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,51 ^{ns}	2,42	10,68
Número de grãos na fileira	90,20**	137,01**	93,93**	13,07 ^{ns}	42,20 ^{ns}	16,14	10,02
Grau de liberdade	6	1	6	1	3	543	-

*Significativo ($p<0,05$); ** Significativo ($p<0,01$); ^{ns} não significativo ($p>0,05$) pelo teste F.

Nesses casos, o estudo das médias foi realizado sobre os fatores isolados quando apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$ ou $p > 0,01$). Da mesma forma, na comparação entre a combinação dos fatores com o tratamento adicional, a testemunha nitrogenada, em mais de 90% destes parâmetros, não exibiu diferença significativa (Tabela 3).

A inoculação com as BPCP aumentou o diâmetro das espigas, com e sem palha, nos dois ciclos de cultivo quando comparadas ao controle tanto na presença de adubação nitrogenada, quanto na ausência. Entretanto, pode-se observar que na ausência de adubação nitrogenada todas as BPCP proporcionam diâmetros estatisticamente superiores ao controle. De modo geral, também é possível verificar que, numericamente, o segundo ciclo apresentou diâmetros inferiores, mas as relações entre as espigas foram bastante semelhantes (Tabela 4).

Tabela 4. Desdobramento da interação para as médias* de diâmetro da espiga com e sem palha e a relação entre com e sem palha para o milho verde nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

	Diâmetro de espiga 2018/19					
	Com Palha		Sem Palha		Relação	
	0% N	50% N	0% N	50% N	0% N	50% N
IPACC07	57,94 bA	61,04 aB	48,07 bB	50,76 aA	83,12 aA	83,47 aB
IPACC10	59,37 aA	59,13 aA	49,48 bA	51,42 aA	83,46 bA	87,06 aA
IPACC26	60,60 aA	59,78 aA	50,63 aA	49,41 aB	83,64 aA	82,73 aB
IPACC29	59,15 aA	59,73 aA	50,39 aA	50,84 aA	85,46 aA	85,44 aA
IPACC38	59,49 aA	56,56 bB	48,84 aB	48,16 aB	82,09 bA	85,27 aA
IPACC55	58,88 aA	59,78 aA	49,97 aA	50,51 aA	84,95 aA	84,68 aA
Controle	54,15 bB	57,80 aB	45,63 bC	49,38 aB	84,29 aA	81,92 aB
TN (100% N)	61,64		51,43		83,52	
	Diâmetro de espiga 2019/20					
IPACC07	49,89 bB	52,48 aA	41,70 bB	43,54 aA	83,79 aA	83,16 aA
IPACC10	51,45 bA	53,87 aA	42,52 bB	44,95 aA	83,05 aA	83,51 aA
IPACC26	52,84 aA	51,44 aB	43,77 aA	42,46 aB	82,98 aA	82,74 aA
IPACC29	53,03 aA	54,37 aA	42,98 bA	45,11 aA	81,20 aB	83,21 aA
IPACC38	53,47 aA	49,72 bB	42,17 aB	41,05 aB	78,87 bB	82,55 aA
IPACC55	53,12 aA	52,30 aA	44,51 aA	43,52 aA	83,91 aA	83,31 aA
Controle	47,09 bC	51,56 aB	40,29 bC	42,61 aB	85,53 aA	81,92 bA
TN (100% N)	53,75		44,49		82,93	

*Médias seguidas de mesma letra, para cada parâmetro, não diferem estatisticamente entre si, minúscula na linha e maiúscula na coluna, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

O diâmetro da espiga é um parâmetro muito importante na comercialização de espigas verdes, uma vez que os compradores sempre buscam espigas com maior diâmetro e comprimento de espiga. Neste estudo, no ciclo 2018/19, o

comprimento das espigas com palha não apresentou interação entre os fatores. Portanto, independente da presença ou ausência de adubação nitrogenada, a inoculação com o isolado IPACC26 proporcionou o maior comprimento de espigas. Além disso, todas as BPCP favoreceram o tamanho de espiga maior que o controle, sendo que a presença de adubação nitrogenada propiciou maior média de comprimento de espiga independente da inoculação. De modo geral, no ciclo 2019/20, a interação entre os fatores inoculação e adubação nitrogenada proporcionou maior comprimento de espiga com e sem palha, quando inoculada com o IPACC07 e submetida a 50% da adubação nitrogenada (Tabela 5).

Tabela 5. Desdobramento da interação para as médias* de comprimento da espiga com e sem palha e a relação entre com e sem palha para o milho verde nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

	Comprimento de espiga 2018/19					
	Com Palha		Sem Palha		Relação	
	0% N	50% N	0% N	50% N	0% N	50% N
	28,46 b	28,87 a				
IPACC07	28,32 C		21,23 aA	20,30 bA	76,77 aA	71,07 bA
IPACC10	28,20 C		20,00 aA	20,37 aA	72,00 aB	72,31 aA
IPACC26	29,81 A		20,43 aA	20,64 aA	69,48 aC	70,00 aA
IPACC29	29,16 B		21,12 aA	21,31 aA	72,61 aB	74,07 aA
IPACC38	28,88 B		18,89 bB	20,81 aA	66,92 bC	71,47 aA
IPACC55	28,90 B		20,85 aA	19,79 bA	73,53 aB	68,40 aA
Controle	27,38 D		18,37 bB	20,02 aA	68,13 bC	73,11 aA
TN (100% N)		29,15		22,41		77,22
	Comprimento de espiga 2019/20					
IPACC07	30,78 aB	31,46 aA	24,01 aA	22,96 aA	78,42 aA	73,42 bA
IPACC10	30,44 aB	28,84 bB	22,54 aB	21,44 aB	74,27 aB	74,86 aA
IPACC26	32,59 aA	32,66 aA	21,89 aA	22,29 aB	67,49 aC	68,78 aB
IPACC29	31,77 aA	29,87 bB	21,87 aA	22,15 aB	69,55 bC	74,76 aA
IPACC38	30,25 aB	30,58 aB	20,15 aB	20,87 aC	67,04 aC	69,01 aB
IPACC55	28,52 bC	30,64 aB	19,76 bB	20,81 aC	69,72 aC	68,35 aB
Controle	28,91 aC	29,67 aB	18,55 bC	20,01 aC	70,38 aC	70,11 aB
TN (100% N)		30,94		24,65		79,84

*Médias seguidas de mesma letra, para cada parâmetro, não diferem estatisticamente entre si, minúscula na linha e maiúscula na coluna, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Além do comprimento e diâmetro de espigas, a massa é altamente importante para a comercialização da espiga *in natura*. Para este parâmetro, nos dois ciclos de cultivo, na ausência de adubação nitrogenada, a inoculação com as BPCP apresentou superioridade estatística em comparação ao controle, tanto para espigas com palha, quanto para sem palha. Entretanto, na presença de 50% da adubação

nitrogenada, apenas a inoculação de alguns isolados proporcionaram valores superiores ao controle, sendo no ano agrícola 2018/19 a inoculação com IPACC07, IPACC10, IPACC29 e IPACC55 e em 2019/20 apenas a inoculação com o IPACC29 para as espigas com palha e a inoculação com IPACC07 e IPACC29 para as sem palha (Tabela 6).

Tabela 6. Desdobramento da interação para as médias* de massa da espiga com e sem palha e a relação entre com e sem palha, para o milho verde nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

	Massa de espiga 2018/19					
	Com Palha		Sem Palha		Relação	
	0% N	50% N	0% N	50% N		
IPACC07	365,72 bB	421,60 aA	239,19 bB	282,04 aA	66,37 C	
IPACC10	382,93 aB	411,56 aA	263,71 bA	293,39 aA	70,39 A	
IPACC26	419,14 aA	393,21 aB	279,04 aA	261,69 aB	66,55 C	
IPACC29	403,58 aA	426,62 aA	269,29 bA	293,03 aA	67,94 B	
IPACC38	377,26 aB	379,57 aB	249,22 aA	246,25 aB	65,31 C	
IPACC55	384,33 bB	416,46 aA	263,90 aA	282,33 aA	68,10 B	
Controle	307,34 bC	386,17 aB	205,61 bC	268,95 aB	66,80 C	
TN (100% N)		435,67		301,78	69,50	
	Massa de espiga 2019/20					
	0% N	50% N	0% N	50% N	0% N	50% N
IPACC07	330,92 bB	364,92 aB	208,04 bC	245,09 aA	63,22 bB	67,66 aA
IPACC10	335,17 bB	365,41 aB	226,90 aB	236,69 aB	67,98 aA	65,72 aA
IPACC26	363,52 aA	342,41 aC	252,50 aA	228,49 bB	69,09 aA	66,79 aA
IPACC29	370,26 bA	400,32 aA	235,83 bB	260,56 aA	64,06 aB	65,87 aA
IPACC38	338,09 aB	326,11 aC	211,33 aC	191,37 bC	63,44 aB	59,81 aB
IPACC55	337,57 aB	339,75 aC	216,03 aC	224,45 aB	64,35 aB	65,95 aA
Controle	260,41 bC	344,85 aC	176,77 bD	237,21 aB	67,87 aA	66,94 aA
TN (100% N)		374,99		258,39		69,23

*Médias seguidas de mesma letra, para cada parâmetro, não diferem estatisticamente entre si, minúscula na linha e maiúscula na coluna, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Nem sempre uma boa relação de diâmetro (Tabela 4), comprimento (Tabela 5) e massa (Tabela 6) entre a espiga com palha e a sem palha é algo positivo. Embora a interação entre o controle e ausência de adubação nitrogenada tenha exibido resultados iguais e até superiores estatisticamente em relação aos demais tratamentos, a biometria da espiga sem palha sempre apresentou o menor valor desse parâmetro. Dessa forma, a inoculação com as BPCP IPACC07, IPACC10, IPACC29 e IPACC55 foram superiores nos dois ciclos de cultivo para a maioria dos parâmetros biométricos das espigas, mesmo em interação aos 50% de adubação nitrogenada.

Diferentemente dos demais parâmetros biométricos da espiga para número de grãos por fileira, não é possível separar uma interação superior, apenas confirma que o uso de BPCP melhora essa característica da mesma forma que o uso de apenas 50% da adubação nitrogenada. Observou-se também que esse parâmetro foi bastante fixo, pois seu resultado se manteve nos dois ciclos. Para o número de fileiras de grãos na espiga, não houve interação em ambos os ciclos e no primeiro ano de cultivo não houve diferença entre o uso ou não da adubação nitrogenada em 50% do recomendado. Em relação a esse parâmetro, destacaram-se a inoculação com os isolados IPACC10, IPACC26, IPACC29, IPACC38 e IPACC55 que obtiveram em média mais 15 fileiras de grãos por espiga. É importante salientar que nos dois ciclos os controles na ausência de N e com 50% de N apresentaram um número inferior de fileiras, demonstrando que a inoculação pode gerar espigas de maior qualidade visual (Tabela 7).

Tabela 7. Desdobramento da interação para as médias* do número de grãos por fileira e de fileiras de grãos da espiga, para o milho verde nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

	Número de grãos por fileira da espiga			
	2018/19		2019/20	
	0% N	50% N	0% N	50% N
IPACC07	40,7 aA	41,3 aA	40,7 aA	41,3 aA
IPACC10	40,5 aA	41,1 aA	40,6 aA	40,6 aA
IPACC26	40,7 aA	39,7 aA	40,7 aA	39,7 aA
IPACC29	40,7 aA	41,7 aA	40,4 aA	41,8 aA
IPACC38	39,4 aA	40,1 aA	39,4 aA	40,1 aA
IPACC55	41,4 aA	40,4 aA	40,3 aA	40,1 aA
Controle	37,3 aB	40,5 aA	35,2 bB	41,0 aA
TN (100% N)		42,1		42,0
	Número de fileiras de grãos na espiga			
			14,43 b	14,75 a
IPACC07	14,51 B		14,52 A	
IPACC10	15,03 A		14,84 A	
IPACC26	14,84 A		14,83 A	
IPACC29	15,40 A		15,18 A	
IPACC38	14,72 A		14,54 A	
IPACC55	15,08 A		14,82 A	
Controle	13,95 C		13,38 B	
TN (100% N)	15,20		15,10	

*Médias seguidas de mesma letra, para cada parâmetro, não diferem estatisticamente entre si, minúscula na linha e maiúscula na coluna, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os parâmetros biométricos das espigas são de fundamental importância tanto para a produção de grãos, como de espigas verdes. Nesse sentido, é possível encontrar pesquisas que usam tais parâmetros para avaliar as espigas (produto final), após serem submetidas ao uso de resíduos como compostos orgânicos ou biofertilizantes (BREDA et al., 2018; DRIENOVSKY et al., 2019). Isso demonstra a importância desses parâmetros para as pesquisas científicas e para os produtores. No mercado de espigas verdes, a venda depende muito da aparência do produto. Oliveira et al. (2015), trabalhando com inoculação de BPCP associado a doses de fósforo, observaram que os parâmetros biométricos das espigas não sofreram alterações com a utilização dos tratamentos, divergindo do presente estudo. Entretanto, Zucareli et al. (2011), utilizando inoculação de BPCP, conseguiram verificar que o diâmetro da espiga da planta inoculada superou a do tratamento sem inoculação. Ehteshami et al. (2007) e Oliveira et al. (2012) também observaram efeitos positivos nos parâmetros biométricos das espigas quando inoculadas com BPCP, corroborando os resultados obtidos neste estudo.

O uso das bactérias promotoras de crescimento demonstrou ser uma alternativa viável no auxílio a uma agricultura com menor uso de fertilizantes minerais. Nos parâmetros biométricos da espiga, que estão relacionados à sua qualidade visual, os isolados bacterianos propiciaram nos dois ciclos de cultivo um crescimento superior ao controle e semelhante ao tratamento adicional. Isso demonstra que o uso de BPCP na cultura do milho verde pode possibilitar a redução de 50% na quantidade de N aplicado e, mesmo assim, ter espigas iguais aos padrões alcançados pelo uso da adubação completa. Tal fato, possivelmente, decorre de um crescimento morfofisiológico adequado das plantas gerado por mecanismos próprios das BPCP que tendem a estimular o crescimento das plantas, produzindo metabólitos promotores, tais como: 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, ácido indol-3-acético (AIA), sideróforos, bem como fosfato solubilizante, a síntese de fitohormônios e a fixação biológica de nitrogênio (SOUZA et al. 2015 e RAJKUMAR et al., 2017).

Alguns estudos relatam o melhor desenvolvimento das plantas de milho quando inoculadas com BPCP. Calzavara et al. (2018), inoculando cepas de BPCP como *Bacillus sp.* e outros, obtiveram bons resultados na promoção do crescimento do milho, independente da presença da adubação nitrogenada. A inoculação com os isolados IPACC07 (*H. seropedicae*), IPACC10 (*Burkholderia sp.*), IPACC55

(*Paenibacillus* sp.) e IPACC29 (*Bacillus subtilis*) possibilitaram os melhores resultados para a maioria das características biométricas avaliadas nas espigas, tanto em 2018/19, como em 2019/20. Estudos com bactérias do gênero *Paenibacillus* sp. apontam que elas conseguem sobreviver a condições adversas e prolongar sua vida útil, possibilitando seu uso como biofertilizante. Com isso, podem atuar como um bom substituto para o fertilizante biológico, promovendo a sustentabilidade agrícola (LI et al., 2017). As estirpes de *Bacillus subtilis*, em vários estudos, estão associadas à inoculação de silagem e de outras rações para uso na alimentação animal, mas também estão sendo trabalhadas com a finalidade agrícola, como na pesquisa de Ferreira et al. (2017), na qual relatam que a inoculação de estirpes de *Bacillus subtilis* promove o crescimento de plantas de milho, até mesmo em condições de estresse.

Na cultura do milho verde foram avaliados os parâmetros produtivos: nitrogênio total - NT, produtividade de biomassa total - PBT, porcentagem de espigas comerciais - %EC, produtividade de espigas totais - PET e produtividade de espigas comerciais - PEC (Tabela 8).

Tabela 8. Resumo das análises de variância para nitrogênio total - NT, produtividade de biomassa total - PBT, porcentagem de espigas comerciais - %EC, produtividade de espigas totais - PET e produtividade de espigas comerciais - PEC para a cultura do milho verde nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

Milho Verde 2018/19 (Quadrados Médios)							
	Fonte de variação						CV (%)
	Inoculação (IN)	Nitrogênio (NT)	Interação (IN x NT)	Tratamento Adicional x Fatorial	Bloco	Erro	
NT	654,9**	200,6**	308,9**	1483,45**	17,10 ^{ns}	24,9	9,65
PBT	24,58**	0,16 ^{ns}	12,03**	32,08**	1,01 ^{ns}	2,74	15,25
%EC	490,4**	2379,0**	291,0**	551,59**	22,20 ^{ns}	30,5	8,09
PET	190030255,3**	26066043,5 ^{ns}	123908356,5*	919261463,1**	34084560,9 ^{ns}	49010455,8	16,49
PEC	210274455,0**	585418711,5**	78052348,3*	1147368350,4**	48794851,0 ^{ns}	23751017,1	16,82
Milho Verde 2019/20 (Quadrados Médios)							
NT	691,2**	1716,0**	242,1**	2154,97**	11,30 ^{ns}	18,1	7,29
PBT	26,30**	34,57*	4,32 ^{ns}	34,83*	41,28 ^{ns}	6,83	24,08
%EC	662,8**	665,1**	117,4*	197,61*	45,30 ^{ns}	36,3	8,93
PET	177230184,9**	177369885,1**	161293067**	1448317181,8**	10906442,4 ^{ns}	14479189,6	9,33
PEC	313183420,3**	381592448,6**	121048747**	1135749527,8**	4861588,8 ^{ns}	7373212,5	9,34
G. L	6	1	6	1	3	39	-

*Significativo ($p < 0,05$); ** Significativo ($p < 0,01$); ^{ns} não significativo ($p > 0,05$) pelo teste F.

Em quase todos os parâmetros avaliados, houve interação significativa ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$) entre os fatores inoculação e adubação nitrogenada nos dois

ciclos de cultivo. Apenas para produtividade de biomassa total no ano agrícola 2019/20 não houve interação significativa ($p < 0,05$), mas ocorreu diferença significativa para os fatores isolados. Na comparação entre os tratamentos e a testemunha adicional, houve diferença estatística significativa para todos os parâmetros produtivos, enquanto isso, para bloco não houve diferença significativa para nenhum deles (Tabela 8).

Na cultura do sorgo sacarino, os parâmetros produtivos envolvem a produtividade de nitrogênio total e de biomassa total. Além destes, existem os parâmetros tecnológicos, que apresentam as características de qualidade da planta relacionadas ao setor sucroalcooleiro, tais como: sólidos solúveis totais do caldo - BRIX %, porcentagem de pol da cana - POL%, pureza aparente do caldo - Pureza, teor de fibra - F, açúcares redutores do caldo - ARC e açúcar total recuperável - ATR (Tabela 9).

Tabela 9. Resumo das análises de variância para nitrogênio total - NT, produtividade de biomassa total - PBT e os parâmetros tecnológicos (sólidos solúveis totais do caldo - BRIX %, porcentagem de pol da cana - POL%, pureza aparente do caldo - Pureza, teor de fibra - F, açúcares redutores do caldo - ARC e açúcar total recuperável - ATR) do colmo de sorgo sacarino nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

Sorgo Sacarino 2018/19 (Quadrados Médios)							
	Fonte de variação						CV (%)
	Inoculação (IN)	Nitrogênio (NT)	Interação (IN x NT)	Tratamento Adicional x Fatorial	Bloco	Erro	
NT	219,57**	193,14**	53,68**	867,07**	30,40*	8,21	7,48
PBT	149,65**	216,07**	42,90 ^{ns}	11,74 ^{ns}	24,90 ^{ns}	18,75	25,80
BRIX %	3,48**	4,57**	0,82**	0,07 ^{ns}	0,69*	0,24	4,26
POL%	0,72**	0,16 ^{ns}	1,20**	0,34**	0,11 ^{ns}	0,10	7,48
Pureza	65,70**	2,16 ^{ns}	78,07**	12,24*	0,30 ^{ns}	2,26	4,08
F	2,86**	1,14 ^{ns}	2,22**	10,33**	0,07 ^{ns}	0,46	4,62
ACR	0,0297**	0,0058**	0,0658**	0,0465**	0,0003 ^{ns}	0,0021	3,43
ATR	110,90**	92,57**	52,07**	4,13 ^{ns}	5,83 ^{ns}	5,12	3,00
Sorgo Sacarino 2019/20 (Quadrados Médios)							
NT	451,73**	311,14**	46,55*	922,11**	3,90 ^{ns}	15,45	9,31
PBT	97,89**	236,16**	10,45 ^{ns}	5,26 ^{ns}	29,01*	7,47	18,56
BRIX %	3,19**	0,28 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,65	6,93
POL%	1,14**	2,57**	0,82**	0,08 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,20	10,35
Pureza (%)	66,14**	185,78**	69,61**	17,45 ^{ns}	4,97 ^{ns}	11,02	9,00
F	6,54**	12,07**	3,36**	11,86**	0,40 ^{ns}	0,76	6,13
ACR	0,40**	0,28 ^{ns}	0,45**	0,02 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,09	13,94
ATR	80,48**	1,14 ^{ns}	18,22*	30,44*	5,35 ^{ns}	7,44	3,69
G.L	6	1	6	1	3	39	-

*Significativo ($p < 0,05$); ** Significativo ($p < 0,01$); ^{ns} não significativo ($p > 0,05$) pelo teste F.

Para a maioria dos parâmetros produtivos do sorgo sacarino, houve interação significativa ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$). Apenas a produtividade de biomassa total nos dois ciclos e os sólidos solúveis totais do caldo, no ano agrícola 2019/20, não apresentou interação significativa ($p > 0,05$), nestes o comparativo das médias é realizado nos fatores de forma isolada, quando o fator apresentar diferença significativa (Tabela 9).

Nos dois ciclos de cultivo e nas culturas de milho verde e sorgo sacarino, o teor de N mensurado na matéria seca das plantas inoculadas com algumas BPCP foi superior ao controle, tanto com as submetidas aos 50% da recomendação de adubação nitrogenada, como na sua ausência. Na cultura do milho verde, o tratamento inoculado com IPACC29, submetido aos 50% do N recomendado na adubação, foi o tratamento que apresentou maior percentual de nitrogênio total, superando todos os demais tratamentos. Também é possível observar que, no ano agrícola 2019/20, os tratamentos que receberam os 50% de N obtiveram superioridade aos que não receberam, diferentemente do que ocorreu no primeiro ciclo. Esse resultado provavelmente ocorreu devido à presença do N remanescente do primeiro ciclo (Figura 3a).

Diferente do milho verde, o sorgo sacarino não teve apenas um isolado que foi superior aos demais e os ciclos apresentaram comportamentos diferentes. De modo geral, a inoculação com o isolado IPACC55 destacou-se na cultura, pois se manteve superior estatisticamente aos demais, tanto na ausência quanto na presença de 50% da adubação recomendada nos dois ciclos de cultivo. Juntamente com os tratamentos inoculados com IPACC55, a inoculação com o isolado IPACC10, na ausência de adubação nitrogenada no primeiro ciclo, a inoculação com o isolado IPACC07, submetido aos 50% da adubação recomendada em ambos os ciclos e a inoculação com o isolado IPACC38, submetido aos 50% de N na adubação no segundo ciclo, propiciaram à cultura do sorgo sacarino os maiores teores de N total (Figura 3b).

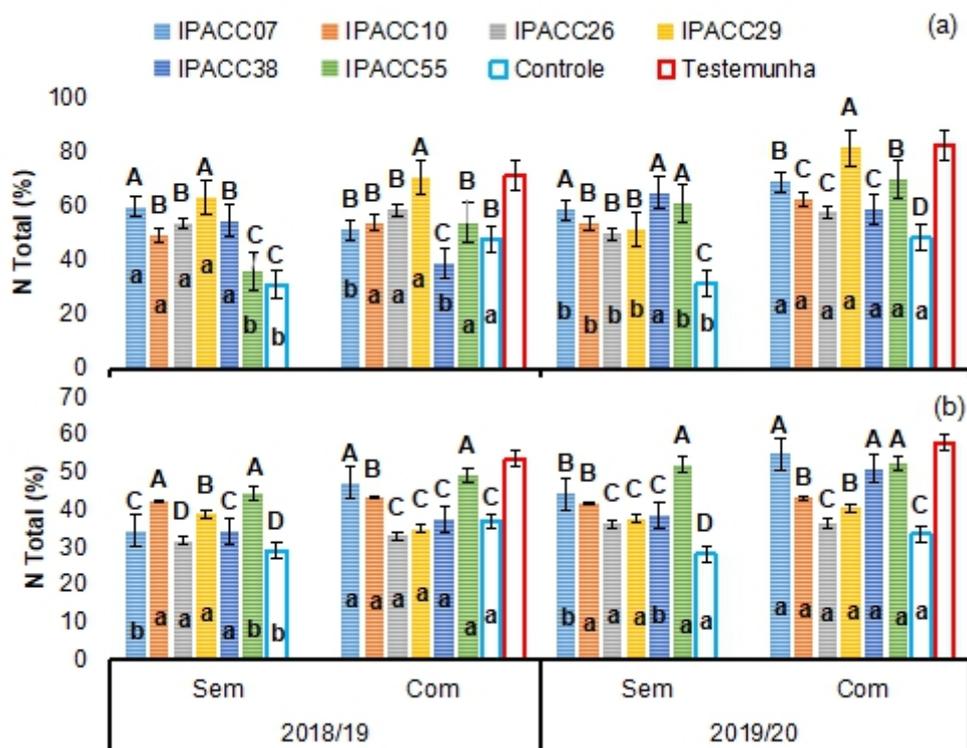


Figura 3. Desdobramento da interação para as médias* de nitrogênio total, em porcentagem, das plantas de milho verde (a) e sorgo sacarino (b) nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. As diferentes letras minúsculas dentro das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre presença e ausência de adubação nitrogenada para cada tratamento e diferentes letras maiúsculas acima das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos inoculados.

Os resultados de N total evidenciam a FBN promovida pelas BPCP, pois a inoculação com os isolados propiciou valores superiores aos controles. Pelo teste de Dunnett foi possível verificar que existe igualdade entre alguns tratamentos e a testemunha nitrogenada, que corresponde a um tratamento que recebeu a adubação nitrogenada total recomendada para as culturas. Na cultura do milho verde, no primeiro ciclo de cultivo, a inoculação com o isolado IPACC29, na ausência e na presença dos 50% da adubação nitrogenada, obteve resultados iguais estatisticamente ($p < 0,05$) à testemunha nitrogenada (Figura 4A). No segundo ciclo, a inoculação com o isolado IPACC29 com a adubação de 50% N também se igualou à testemunha nitrogenada (Figura 4B).

Excepcionalmente na cultura do sorgo sacarino, não foi apenas uma BPCP que se destacou quando comparada à testemunha nitrogenada. No primeiro ciclo, apenas a inoculação com IPACC55 com os 50% da adubação nitrogenada

recomendada se igualou ao TN (Figura 4C). Entretanto, no segundo ciclo, além da inoculação com o isolado IPACC55, na ausência e presença de adubação, a inoculação com os isolados IPACC07 e IPACC38, com a suplementação de 50% da adubação nitrogenada recomendada, propiciaram porcentagem de N total igual à testemunha nitrogenada (Figura 4D).

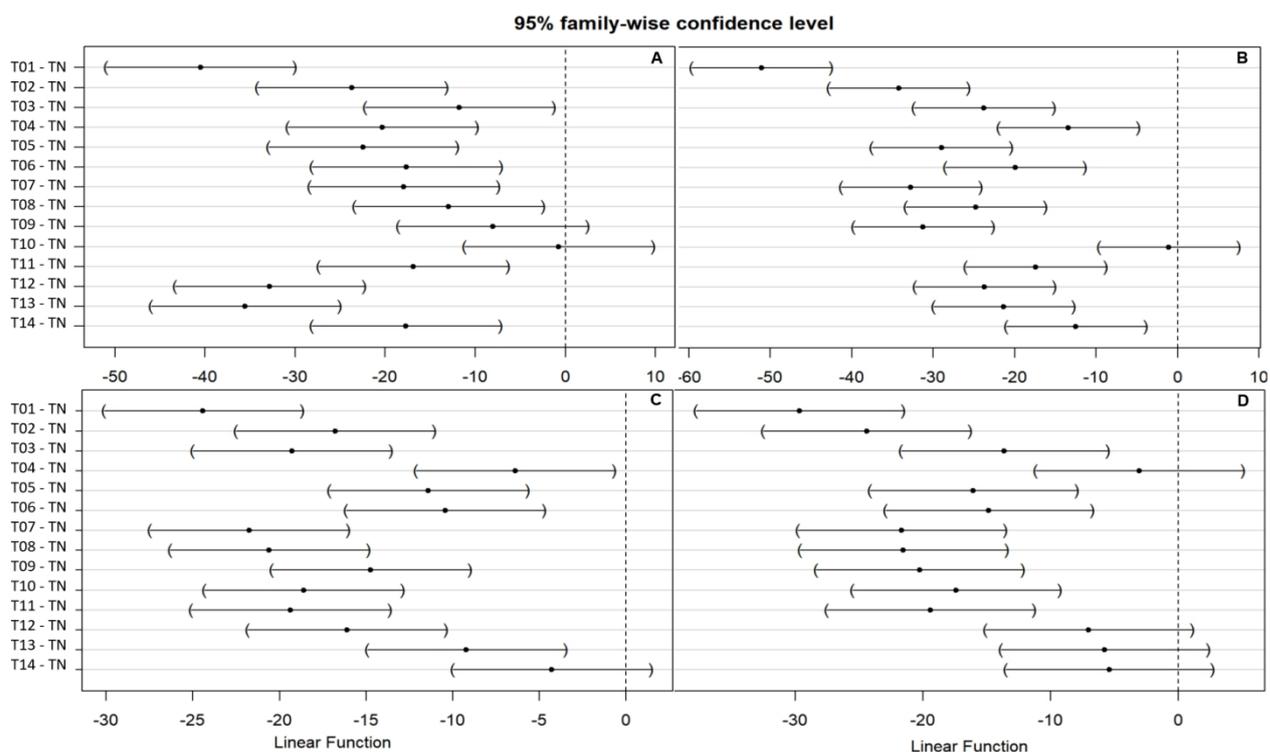


Figura 4. Comparações múltiplas de médias: Contrastes de Dunnett para nitrogênio total das plantas de milho verde (A e B) e sorgo sacarino (C e D) nas safras 2018/19 e 2019/20, respectivamente. Teresina, PI, 2021

*Eixos horizontais, referentes aos contrastes do tratamento com a testemunha, que estão em perpendicularidade com linha tracejada vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

**TN = testemunha nitrogenada (100% da adubação nitrogenada), T1 = Controle N-, T2 = Controle N50%, T3 = IPACC07, T4 = IPACC07 + N50%, T5 = IPACC10, T6 = IPACC10 + N50%, T7 = IPACC26, T8 = IPACC26 + N50%, T9 = IPACC29, T10 = IPACC29 + N50%, T11 = IPACC38, T12 = IPACC38 + N50%, T14 = IPACC55, T15 = IPACC55 + N50%.

Para a produtividade de biomassa, é possível salientar que a inoculação com BPCP favoreceu os maiores valores devido à promoção de crescimento, uma vez que proporcionou maior acúmulo de biomassa da parte aérea nas duas culturas nos tratamentos inoculados. Na cultura do milho verde, no primeiro ciclo, a interação entre os fatores inoculação e adubação nitrogenada foi significativa onde, na ausência de adubação nitrogenada, a inoculação com o IPACC07 se igualou à inoculação com IPACC26, IPACC38 e IPACC55 em superioridade com maiores valores de biomassa. Entretanto, na presença dos 50% da adubação nitrogenada,

as plantas inoculadas com o IPACC07 se igualaram ao controle e foram inferiores a todos os demais tratamentos, mostrando, possivelmente, uma influência negativa da introdução da adubação nitrogenada (Figura 5a). Diferentemente, no segundo ciclo da cultura do milho verde e nos dois ciclos do sorgo sacarino não houve interação significativa. Dessa forma, o estudo das médias foi realizado nos fatores de forma isolada.

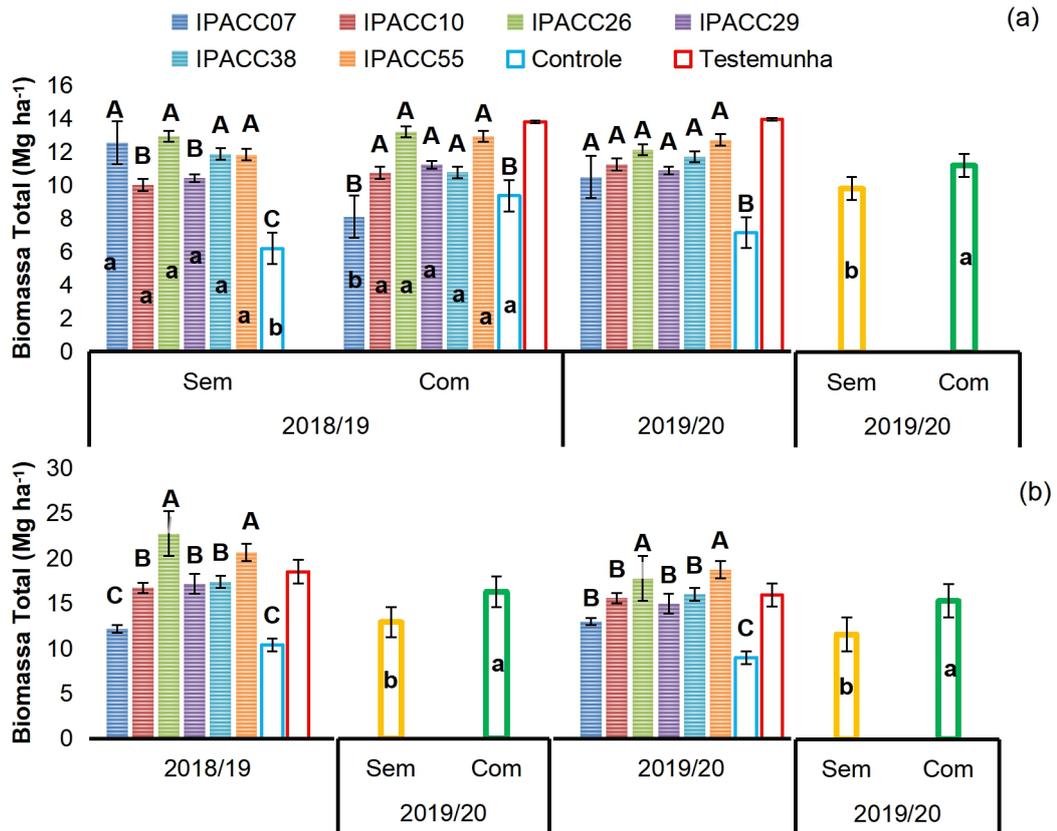


Figura 5. Desdobramento da interação e comparação das médias* de biomassa total, em Mg ha⁻¹, das plantas de milho verde (a) e sorgo sacarino (b) nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. As diferentes letras minúsculas dentro das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre presença e ausência de adubação nitrogenada para cada tratamento e diferentes letras maiúsculas acima das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos inoculados.

No segundo ciclo do milho verde e nos dois de sorgo sacarino, a presença dos 50% da adubação nitrogenada recomendada foi superior à ausência. Para o fator inoculação, nos dois ciclos de sorgo sacarino, a inoculação com os isolados IPACC26 e IPACC55 propiciaram às plantas maior produção de biomassa, sendo

que, no segundo ciclo, todos os BPCP atingiram valores de biomassa superiores ao controle (Figura 5b).

Quando comparados com a testemunha nitrogenada, é possível observar que, no primeiro ciclo, para a cultura do milho verde (Figura 6A), alguns tratamentos se igualaram ao padrão, com destaque para a inoculação com os isolados IPACC26, IPACC38 e IPACC55, que se igualaram à TN na presença e ausência da adubação nitrogenada. Diferentemente, no segundo ciclo, todos os tratamentos, exceto o controle na ausência de adubação nitrogenada, se igualaram à testemunha nitrogenada (Figura 6B).

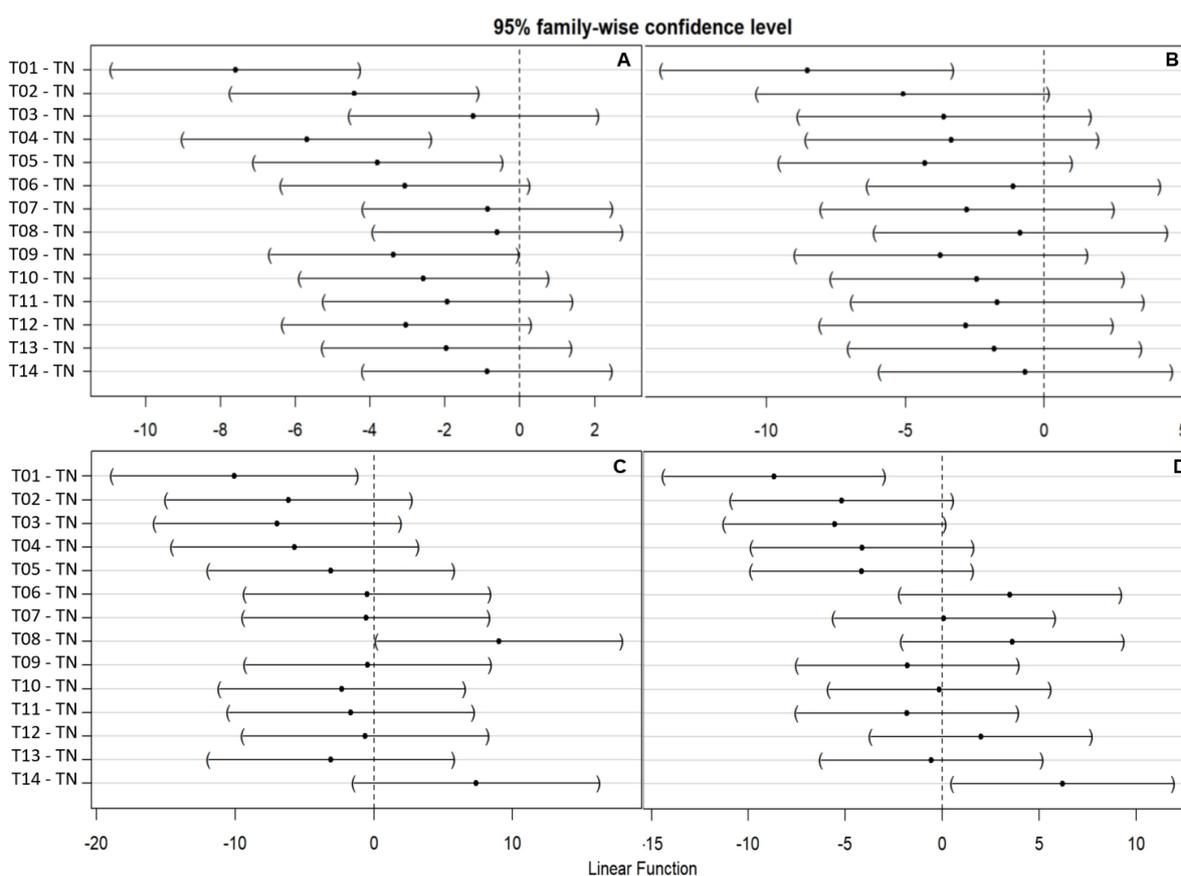


Figura 6. Comparações múltiplas de médias: Contrastes de Dunnett para biomassa total das plantas de milho verde (A e B) e sorgo sacarino (C e D) nas safras 2018/19 e 2019/20, respectivamente. Teresina, PI, 2021

*Eixos horizontais, referentes aos contrastes do tratamento com a testemunha, que estão em perpendicularidade com linha tracejada vertical se igualam estatisticamente a testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

**TN = testemunha nitrogenada (100% da adubação nitrogenada), T1 = Controle N-, T2 = Controle N50%, T3 = IPACC07, T4 = IPACC07 + N50%, T5 = IPACC10, T6 = IPACC10 + N50%, T7 = IPACC26, T8 = IPACC26 + N50%, T9 = IPACC29, T10 = IPACC29 + N50%, T11 = IPACC38, T12 = IPACC38 + N50%, T14 = IPACC55, T15 = IPACC55 + N50%.

Para os dois ciclos da cultura do sorgo sacarino, os resultados foram semelhantes aos do segundo ciclo do milho. Entretanto, no sorgo sacarino, dois tratamentos propiciaram biomassa estatisticamente ($p < 0,05$) superior ao TN onde,

no primeiro ciclo, temos a inoculação com o isolado IPACC26 (Figura 6C) e, no segundo ciclo, com o isolado IPACC55 (Figura 6D), ambos suplementados com os 50% da adubação nitrogenada recomendada.

Esse aumento pode ser devido à capacidade de promover a FBN, o que melhora a nutrição das plantas favorecendo o crescimento, resultando, assim, em maiores valores de biomassa. Outro aspecto importante é a síntese do fitohormônio AIA, responsável pela maior parte da promoção do crescimento vegetal gerado pelas BPCP (DUCA et al., 2014). Segundo Taiz; Zeiger (2013), as auxinas e giberelinas atuam diretamente no crescimento e alongamento de caules, folhas e raízes, induzem alterações na expansão, divisão e alongamento celular das regiões meristemáticas, onde ocorre o crescimento das plantas. O aumento na biomassa seca da planta é de grande relevância na alimentação animal e, também, na qualidade vegetal. Sua importância como matéria-prima para biocombustíveis mereceu um estudo de cinco anos por Michael et al. (2017), no qual fizeram comparativo entre milho e sorgo sacarino com foco na produção de biomassa e sua qualidade. Concluíram que o sorgo sacarino apresentou maior potencial de produção de etanol e de biomassa seca.

Dentre as características produtivas da cultura do milho verde, o número de espigas produzidas é altamente importante, sendo que a planta produz espigas de variados tamanhos e pesos. Neste estudo, separamos produtividade total de espigas de produtividade de espigas comerciais. Os resultados de produtividade total de espigas nos dois ciclos de cultivo, que estão representados na figura 7, demonstram que a produtividade de espigas totais para os tratamentos submetidos à inoculação com bactérias diazotróficas foram superiores ao controle sem adubação nitrogenada, apresentando valores acima de 40 mil espigas por hectare. O uso de BPCP propiciou produtividade total superior aos controles nos dois ciclos, sendo que a inoculação com alguns isolados, tais como IPACC07 e IPACC10, se destacaram na ausência de adubação nitrogenada nos dois ciclos. Na presença dos 50% da adubação nitrogenada recomendada, os dois se mantiveram superiores junto com as plantas inoculadas com o IPACC29 e IPACC38 nos dois ciclos de cultivo.

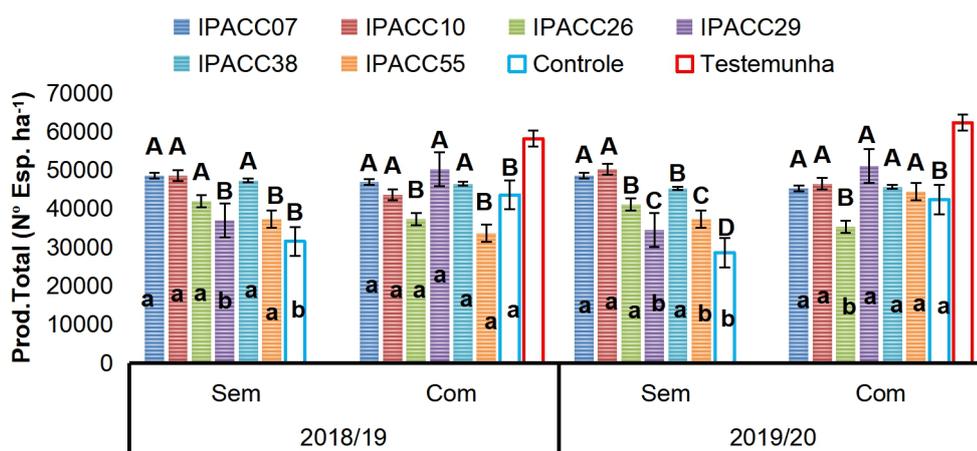


Figura 7. Desdobramento da interação para as médias* de produtividade total de espigas, em número de espigas por hectare, das plantas de milho verde nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. As diferentes letras minúsculas dentro das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre presença e ausência de adubação nitrogenada para cada tratamento e diferentes letras maiúsculas acima das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos inoculados.

O número de espigas totais engloba todas as espigas colhidas, mas pensando em comercialização *in natura*, as espigas com padrão de mercado tendem a ter maior valorização. Nesse contexto, os resultados demonstram que a inoculação favoreceu uma maior porcentagem de espigas comerciais nos dois ciclos de cultivo (Figura 8). É possível salientar que a presença da adubação nitrogenada, mesmo que em 50% do recomendado, favoreceu e aumentou a distância entre os tratamentos inoculados e o controle nos dois ciclos de cultivo. A inoculação com os isolados IPACC10 e IPACC55, em condição de complementação com 50% da adubação nitrogenada, destacou-se obtendo percentuais acima de 80% de espigas comerciais, valores semelhantes à testemunha nitrogenada.

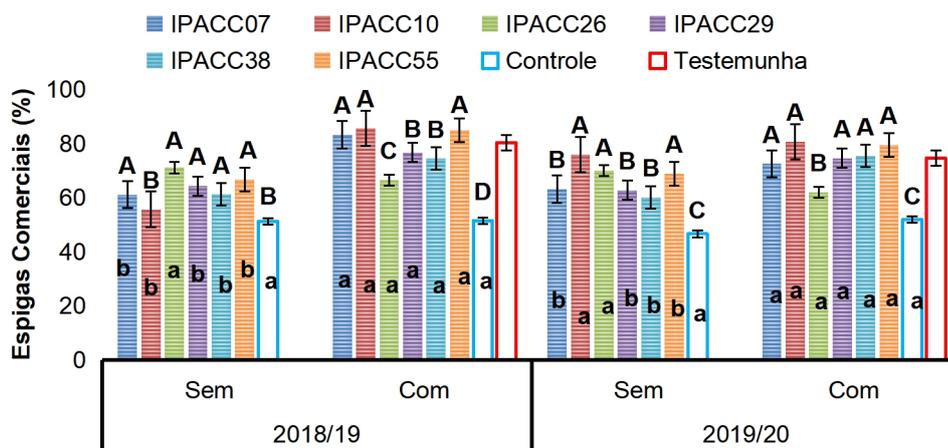


Figura 8. Desdobramento da interação para as médias* de porcentagem de espigas comerciais, em %, das plantas de milho verde nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. As diferentes letras minúsculas dentro das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre presença e ausência de adubação nitrogenada para cada tratamento e diferentes letras maiúsculas acima das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos inoculados.

A maior porcentagem de espigas comerciais reflete o aumento do número das mesmas em plantas inoculadas com BPCP nos dois anos de cultivo, sendo superiores às plantas controle e exibindo valores acima de 25 mil espigas comerciais por hectare. Na ausência de adubação nitrogenada, todos os tratamentos inoculados com BPCP exibiram superioridade ao controle, em que, no ano agrícola de 2019/20, apenas a inoculação com o isolado IPACC10 foi superior aos demais tratamentos. Na presença dos 50% da adubação nitrogenada recomendada, a inoculação com o isolado IPACC26 se igualou ao controle com as menores quantidades de espigas comerciais nos dois ciclos. Também é possível destacar a inoculação com os isolados IPACC10 e IPACC29 que nos dois ciclos se mantiveram superiores aos demais tratamentos, com produtividade de aproximadamente 38 mil espigas com padrão de mercado por hectare (Figura 9).

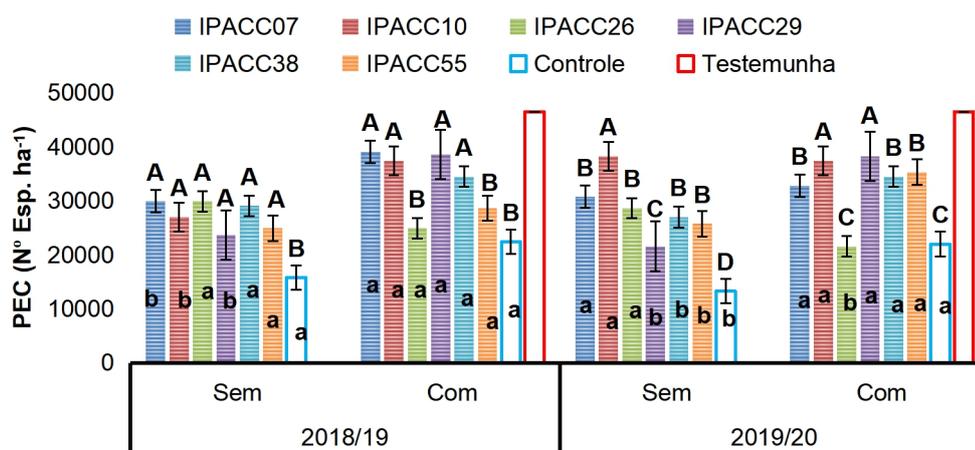


Figura 9. Desdobramento da interação para as médias* da produtividade de espigas comerciais, número de espigas por hectare, das plantas de milho verde, nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. As diferentes letras minúsculas dentro das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre presença e ausência de adubação nitrogenada para cada tratamento e diferentes letras maiúsculas acima das barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos inoculados.

Quando comparados à testemunha nitrogenada pelo teste de Dunnett, observou-se que, no primeiro ciclo (Figura 10A), as plantas inoculadas com os isolados IPACC07, IPACC10 e IPACC29 e submetidas aos 50% da adubação nitrogenada recomendada se igualaram estatisticamente ($p < 0,05$) à testemunha nitrogenada. Diferentemente, no segundo ciclo (Figura 10B), apenas as plantas inoculadas com o isolado IPACC29, com os 50% de adubação nitrogenada, se igualaram à testemunha nitrogenada. Isso demonstra que a inoculação de BPCP na cultura do milho verde tem grande potencial em melhorar a qualidade das espigas comerciais produzidas, usando metade do nitrogênio fertilizante e atingindo o mesmo patamar. Assim, a metade do N recomendado associada à inoculação do isolado IPACC29, que é um *Bacillus subtilis*, conseguiu proporcionar o número de espigas comerciais equivalente estatisticamente à testemunha nitrogenada que recebeu 100% da adubação recomendada nos dois ciclos de cultivo, demonstrando ser uma alternativa bastante viável na redução dos custos de produção de milho verde.

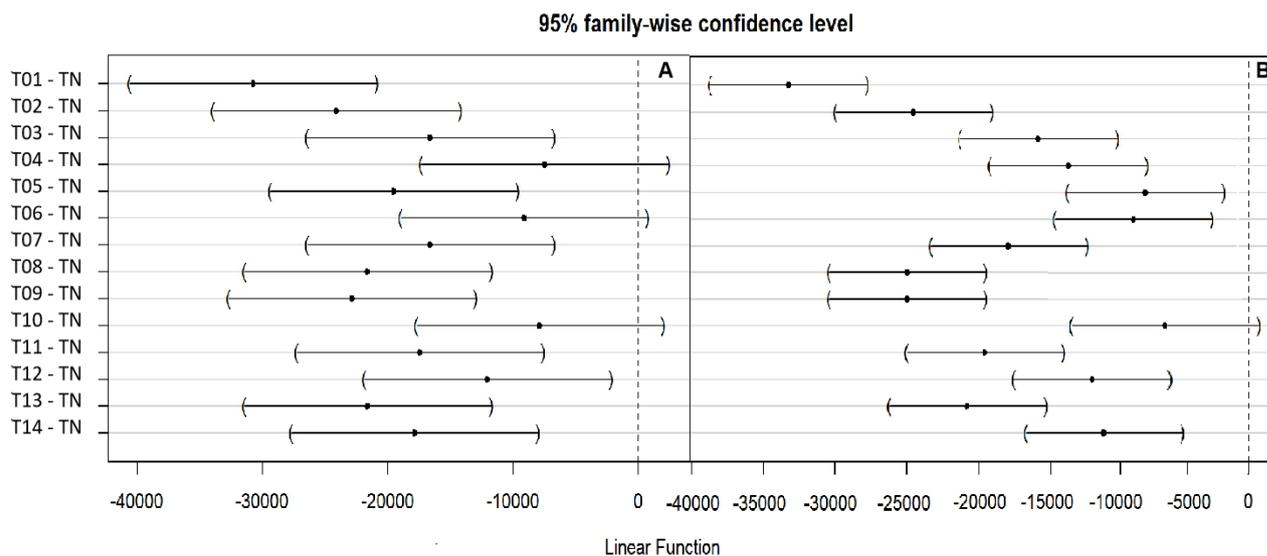


Figura 10. Comparações múltiplas de médias: Contrastes de Dunnett para produtividade de espigas comerciais das plantas de milho verde nas safras 2018/19 (A) e 2019/20 (B). Teresina, PI, 2021

*Eixos horizontais, referentes aos contrastes do tratamento com a testemunha, que estão em perpendicularidade com linha tracejada vertical, se igualam estatisticamente à testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

**TN = testemunha nitrogenada (100% da adubação nitrogenada), T1 = Controle N-, T2 = Controle N50%, T3 = IPACC07, T4 = IPACC07 + N50%, T5 = IPACC10, T6 = IPACC10 + N50%, T7 = IPACC26, T8 = IPACC26 + N50%, T9 = IPACC29, T10 = IPACC29 + N50%, T11 = IPACC38, T12 = IPACC38 + N50%, T14 = IPACC55, T15 = IPACC55 + N50%.

Neste sentido, a inoculação de bactérias diazotróficas, associadas a uma suplementação com 50% de nitrogênio, possibilita a obtenção de produtividades iguais às obtidas por plantas que recebem a adubação nitrogenada completa. Em estudos atuais, verificou-se que a inoculação aumenta a produtividade de grãos na cultura do milho (PEREIRA et al., 2020), em que o uso de BPCP pode propiciar aumento na absorção de fósforo e consequente elevação da produtividade.

Singh et al. (2016) acreditam que a maneira mais promissora de aumentar a produtividade é através do uso de microrganismos, seja no controle de doenças, por meio de agentes de biocontrole, ou com a utilização das BPCP, que podem auxiliar as plantas em diferentes condições de estresse tais como: condições de pH, temperatura, salinidade, seca e inibição de diversos patógenos. A maioria dos estudos verifica que as melhorias morfofisiológicas resultam em melhor produção e, com isso, maior produtividade. Com a importância devida da adubação nitrogenada para a cultura do milho, Ladha et al. (2016) defendem que existam duas estratégias promissoras para reduzir a dependência desse fertilizante químico no cultivo dessa cultura. A primeira consiste no desenvolvimento de cultivares com maior eficiência de uso de N e a segunda é a aplicação de bactérias diazotróficas associativas para melhorar a fixação de N não simbiótico.

Os estudos com foco na produtividade se restringem a investigações em nível de produção de grãos (NOVAKOWISKI et al. 2011; OLIVEIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al. 2015; SCHAEFER et al., 2019) e, atualmente, muitos visam a mitigação de efeitos dos estresses usando, em sua maioria, *Azospirillum brasilense*. Matsumura et al. (2015), em estudo com a inoculação de *A. brasilense* na cultura do milho, obtiveram resultados positivos em menores quantidades de N. Relataram, ainda, que plantas inoculadas com BPCP diazotróficas, em cultivo com baixas quantidades de adubação nitrogenada, foram capazes de melhorar eficientemente a produtividade. Schaefer et al. (2019), estudando o efeito da inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasilense* sob diferentes níveis de N, obtiveram, por meio da inoculação, o aumento do crescimento das plantas, da massa de 100 grãos e de seu rendimento quando comparados com a ausência de N.

Olanrewaju e Babalola (2019) acreditam que, no cultivo de milho, o uso de BPCP pode reduzir a baixa fertilidade do solo por meio de atividades sideróforas, fixação de N e a solubilização de fosfato, entre outros fatores. Dessa forma, o uso dessa tecnologia é muito viável para os pequenos e médios produtores de milho verde que não possuem o emprego de grandes tecnologias e que são muito comuns na região da grande Teresina.

Na cultura do sorgo sacarino, são os parâmetros tecnológicos que denotam a valorização do produto. No estudo, os resultados tecnológicos exibiram grande variação entre as diferentes BPCP e os controles. Segundo a literatura, é comum tais variações na cultura, uma vez que dependem de vários fatores como a densidade populacional (EFENDI et al. 2018), os aspectos gerais da colheita (COSTA et al., 2018), adubação (OLUGBEMI; ABIOLA ABABYOMI, 2016). Mathur et al. (2017) acreditam que o preparo do solo, juntamente com o uso de fertilizantes, também podem afetar significativamente o rendimento final do cultivo de sorgo sacarino.

Independente de variações, os resultados para os dois ciclos conseguem transmitir boas informações destes parâmetros. Para os sólidos solúveis totais, no ano agrícola de 2018/20 (Tabela 10), a cultivar de sorgo sacarino submetido à inoculação com os isolados IPACC38, na ausência de adubação nitrogenada e IPACC10, na presença dos 50% de adubação nitrogenada, obteve os maiores valores de grau Brix e dentro do referenciado pela literatura. Segundo Shukla et al. (2017), este conteúdo deve estar entre 12 a 22% de açúcar. Freita et al. (2014)

indicam que a variação no Brix está entre 7 e 14%, quando colhido entre 100 e 120 dias após a semeadura. Como no estudo a colheita foi realizada dentro deste período, com 110 dias após o semeio, este se encaixa na literatura.

Tabela 10. Desdobramento da interação para as médias* dos parâmetros tecnológicos (sólidos solúveis totais do caldo - BRIX %, porcentagem de pol da cana - POL%, pureza aparente do caldo - Pureza, teor de fibra - F, açúcares redutores do caldo - ARC e açúcar total recuperável - ATR) do colmo de sorgo sacarino nas safras 2018/19 e 2019/20. Teresina, PI, 2021

	BRIX %				POL%			
	2018/19		2019/20		2018/19		2019/20	
	0% N	50% N			0% N	50% N	0% N	50% N
IPACC07	11,73 aC	11,41 aB	12,25 A		4,27 bB	4,47 aA	4,34 aB	3,59 bB
IPACC10	12,35 aB	12,56 aA	12,50 A		5,38 aA	4,13 bB	5,36 aA	4,50 bA
IPACC26	11,37 aC	10,51 bC	11,00 B		4,52 aB	4,05 aB	4,51 aB	4,08 aB
IPACC29	11,36 aC	10,62 aC	11,37 B		4,16 bB	4,53 aA	4,22 aB	4,60 aA
IPACC38	12,71 aA	11,66 bB	12,38 A		5,22 aA	4,05 bB	5,30 aA	4,13 bB
IPACC55	11,68 aC	10,79 bC	11,25 B		3,61 aB	3,86 aB	3,64 aB	3,82 aB
Controle	11,25 aC	11,06 aC	11,24 B		3,51 bC	4,01 aB	4,33 aB	4,01 aB
TN (100% N)		11,36	11,99			3,97		4,17
	Fibras				Pureza aparente (%)			
	0% N		50% N		0% N		50% N	
	0% N	50% N	0% N	50% N	0% N	50% N	0% N	50% N
IPACC07	14,63 aB	14,68 aB	13,94 aB	13,67 aB	36,45 bC	39,16 aB	35,71 aB	29,42 bB
IPACC10	14,84 aB	14,21 aB	13,77 aB	13,78 aB	43,57 aA	32,93 bD	45,28 aA	35,12 bB
IPACC26	15,03 aB	13,94 aB	14,75 aB	13,26 bB	39,81 aB	38,61 aB	40,08 aA	37,72 aA
IPACC29	14,70 aB	13,82 aB	14,12 aB	12,81 aB	36,69 bC	42,66 aA	36,52 aB	41,50 aA
IPACC38	14,77 aB	14,86 aB	14,49 aB	13,40 bB	41,04 aB	34,76 bC	42,20 aA	32,94 bB
IPACC55	14,07 bB	15,96 aA	13,81 aB	14,74 aA	30,98 bD	35,83 aC	31,56 aB	35,24 aB
Controle	17,13 aA	15,38 bA	17,99 aA	14,73 bA	31,19 aD	33,45 aD	33,06 aB	34,23 bB
TN (100% N)		13,20		12,45		35,13		34,74
	ARC				ATR			
	0% N		50% N		0% N		50% N	
	0% N	50% N	0% N	50% N	0% N	50% N	0% N	50% N
IPACC07	1,93 aB	1,86 aA	2,11 bB	2,32 aA	75,97 aB	74,92 aA	72,93 aB	69,80 aB
IPACC10	1,73 bC	2,05 aA	1,78 aC	2,13 aC	83,84 aA	78,57 bA	77,78 aA	79,91 aA
IPACC26	1,83 aB	1,90 aA	1,96 aB	2,04 aC	77,39 aB	72,18 bB	74,84 aB	73,13 aB
IPACC29	1,92 aB	1,79 bC	2,08 aB	1,81 aD	74,56 aB	75,26 aA	72,06 aB	70,75 aB
IPACC38	1,80 aB	1,97 aA	1,88 bB	2,20 aB	85,01 aA	74,91 bA	79,12 aA	77,06 aA
IPACC55	2,11 aA	1,90 bB	2,25 aA	2,12 bC	72,32 aC	69,50 aB	72,20 aB	70,86 aB
Controle	1,99 aA	1,98 aA	1,99 aB	2,36 aA	68,99 bC	70,00 aB	70,73 bB	71,04 aB
TN (100% N)		2,02		2,14		74,55		71,23

*Médias seguidas de mesma letra, para cada parâmetro, não diferem estatisticamente entre si, minúscula na linha e maiúscula na coluna, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ciclo, a interação entre os fatores inoculação e adubação nitrogenada não ocorreu, bem como não houve diferença no fator adubação nitrogenada. Assim, dentro do fator inoculação, é possível observar que, além dos dois isolados anteriormente citados, a inoculação com o IPACC07 foi superior estatisticamente em relação aos demais tratamentos, sendo que a inoculação com

os três proporcionaram valores médios de grau brix dentro do padrão encontrado na literatura.

Para o parâmetro POL% do caldo da cultivar de sorgo sacarino, independente do ciclo, a inoculação com os isolados IPACC10 e IPACC38, na ausência de adubação nitrogenada, exibiram os maiores valores de POL%. Na presença dos 50% da adubação nitrogenada recomendada, a inoculação com o isolado IPACC29 proporcionou os maiores valores nos dois ciclos, juntamente com as plantas inoculadas com IPACC07, no primeiro ciclo, e IPACC10, no segundo ciclo, sendo superiores aos demais inóculos e ao controle. O único parâmetro tecnológico onde o controle obteve superioridade estatística aos tratamentos inoculados com BPCP foi na porcentagem de fibras, na qual, segundo Heredia-Olea et al. (2013), o teor de fibra tem grande potencial em cogeração de energia. No entanto, a maior quantidade de fibras proporciona maior depreciação do maquinário usado no processo de moagem. Isso ocasiona alterações no sistema de moagem, o que exige ajustes constantes e eleva o custo de produção (REIN, 2016).

Decorrente dos percentuais de POL e Brix, a pureza do caldo é bastante importante, pois o valor da pureza influencia diretamente no cálculo de ATR. Nos dois ciclos, as plantas controle foram inferiores à maioria dos tratamentos, sendo que no primeiro ciclo, na presença e ausência da adubação nitrogenada, respectivamente, a inoculação com o isolado IPACC29 e IPACC07 propiciaram as maiores porcentagens de pureza aparente do caldo. Já no segundo ciclo, foram as inoculações com IPACC10, IPACC26 e IPACC38, na ausência de N, com IPACC26 e IPACC29, na presença de 50% da adubação nitrogenada, que foram superiores estatisticamente.

Da mesma forma que as fibras, valores menores de açúcares redutores do caldo são o desejável, pois em concentrações baixas indicam menos contaminação ou deterioração desses carboidratos e, conseqüentemente, propicia aumento da eficiência da fermentação dos mesmos em etanol (RAO et al., 2013). Neste sentido, a inoculação com os isolados IPACC10, na ausência de adubação nitrogenada e com IPACC29 na presença dos 50% da adubação nitrogenada recomendada, ambos nos dois ciclos, proporcionaram os menores valores de ARC. A análise de açúcares totais recuperáveis, dentre os parâmetros tecnológicos, é considerada uma das mais importantes. É realizada pelas usinas brasileiras de açúcar e álcool para basear o pagamento dos produtores de cana-de-açúcar, devendo esse padrão ser

seguido para os produtores de sorgo sacarino (COSTA et al., 2018). Em nosso estudo, a inoculação com os isolados IPACC10 e IPACC38, tanto na ausência, como na presença de adubação nitrogenada, exibiram valores estatisticamente superiores a todos os demais tratamentos, inclusive o controle, nos dois ciclos de cultivo.

O cultivo de sorgo sacarino, nas condições do estudo, obteve valores que variaram entre 68 e 85 kg t⁻¹ de açúcares totais recuperáveis. Estes valores estão entre os encontrados na pesquisa de Costa et al. (2018) que, estudando diferentes sistemas de colheita, observaram valores entre 40 a 90 kg t⁻¹. No entanto, Bolonhezi et al. (2015), ao estudarem os açúcares totais recuperáveis de diferentes genótipos de sorgo sacarino, observaram valores entre 80 e 132 kg t⁻¹. Nesse patamar de valores, em nosso estudo, apenas os tratamentos inoculados IPACC10 e 38 no primeiro ciclo, sem adubação nitrogenada, se enquadraram.

Açúcares totais recuperáveis dos tratamentos inoculados e dos controles, quando comparados à testemunha nitrogenada, demonstraram equivalência na grande parte dos tratamentos (Figura 11).

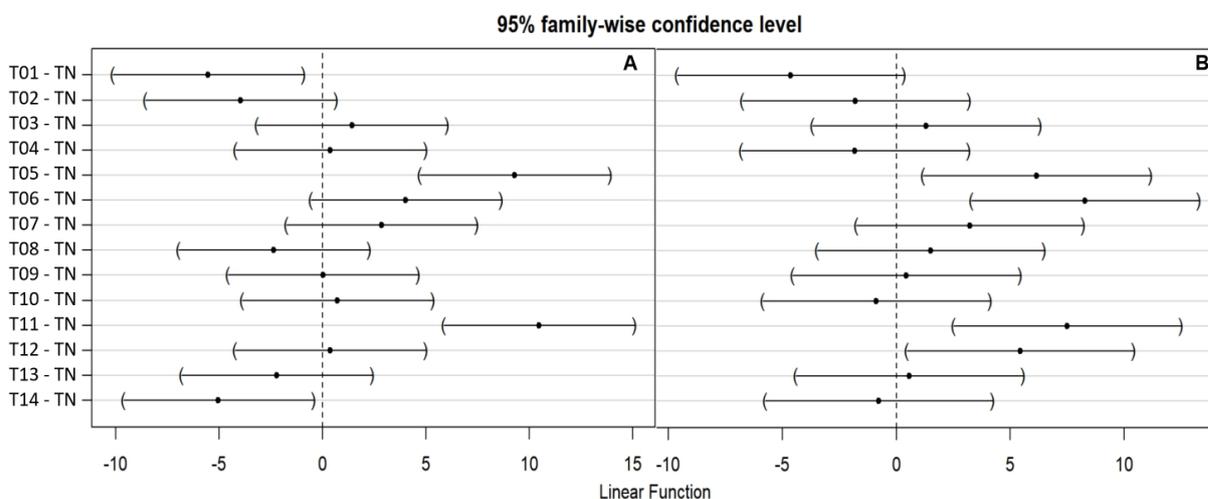


Figura 11. Comparações múltiplas de médias: Contrastes de Dunnett para açúcares totais recuperáveis das plantas de sorgo sacarino nas safras 2018/19 (A) e 2019/20 (B). Teresina, PI, 2021

*Eixos horizontais, referentes aos contrastes do tratamento com a testemunha, que estão em perpendicularidade com linha tracejada vertical se igualam estatisticamente a testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

**TN = testemunha nitrogenada (100% da adubação nitrogenada), T1 = Controle N-, T2 = Controle N50%, T3 = IPACC07, T4 = IPACC07 + N50%, T5 = IPACC10, T6 = IPACC10 + N50%, T7 = IPACC26, T8 = IPACC26 + N50%, T9 = IPACC29, T10 = IPACC29 + N50%, T11 = IPACC38, T12 = IPACC38 + N50%, T14 = IPACC55, T15 = IPACC55 + N50%.

Foi observada nos dois ciclos a presença de tratamentos que se diferenciaram da testemunha de forma positiva, uma vez que foram superiores

estatisticamente. Dessa forma, a inoculação com os isolados IPACC10 e IPACC29, acrescida dos 50% da adubação nitrogenada recomendada no primeiro ciclo, e a inoculação com os mesmos isolados na ausência e presença de N no segundo ciclo foram superiores à testemunha nitrogenada (Figura 11).

Os estudos com a inoculação BPCP em sorgo sacarino têm trabalhado a questão da promoção de crescimento (AQUINO et al., 2019; MAREQUE et al., 2015), a superação de estresse salino (NASCIMENTO et al. 2014), a mitigação dos efeitos da seca (SANTANA et al., 2020) e alguns visam a redução da adubação nitrogenada (SANTOS et al., 2017). Santos et al. (2017), em estudo com diferentes cultivares de sorgo sacarino, associados à inoculação de BPCP com e sem adubação nitrogenada, observaram que a inoculação aumentou a FBN em 4%, a recuperação da eficiência de fertilizantes em 28,9% e a produtividade do sorgo, a massa seca e o teor de N, em comparação com a ausência de inoculação. Os mesmos autores observaram que o tratamento que não recebeu fertilizante nitrogenado, a inoculação obteve 22% do N acumulado na biomassa oriundo da FBN.

Neste sentido, em nosso estudo, possivelmente, a inoculação dos isolados IPACC10 e 38 que são, respectivamente, *Burkholderia sp.* e *Paenibacillus sp.*, geraram uma boa quantidade de N advindo da FBN. Segundo Olugbemi; Abiola Ababyomi (2016), a cultura do sorgo sacarino demanda apenas 40 kg N ha⁻¹ para apresentar um desempenho razoável, especialmente em condições ambientais favoráveis. Os processos de solubilização de nutrientes como ferro, enxofre, fosfatos inorgânicos e insolúveis, a produção de fitohormônios e, até mesmo, uma associação dos diversos mecanismos diretos e indiretos (SANTOYO et al., 2016) realizados pelas BPCP podem ter favorecido a melhoria dos parâmetros tecnológicos.

Em aspectos gerais, o uso de BPCP aumentou a viabilidade econômica, principalmente, quando se pensa nos principais parâmetros de produção de cada cultura. Na cultura do milho verde, a inoculação com o isolado IPACC29, *Bacillus subtilis*, juntamente com 50% da adubação nitrogenada, igualou o número de espigas de padrão comercial ao da testemunha nitrogenada nos dois ciclos de cultivo. Dessa forma, o produtor que usar a inoculação pode ter uma redução de 50% do fertilizante nitrogenado e o mesmo rendimento em espigas, gerando, economicamente, uma redução de mais de dois mil reais por hectare, caso o saco de 20 kg do sulfato de amônio custe R\$ 120,00.

Resultados semelhantes foram observados para a cultura do sorgo sacarino, na qual muitos isolados exibiram valores de açúcares totais recuperáveis iguais à testemunha nitrogenada. Nessa cultura, o destaque foi para a inoculação com os isolados IPACC10 e IPACC29, respectivamente, *Burkholderia sp.* e *Bacillus subtilis*, acrescidos dos 50% da adubação nitrogenada recomendada. Ambos apresentaram superioridade estatística em relação à testemunha nitrogenada nos dois ciclos de cultivo, demonstrando enorme viabilidade econômica, onde se teve uma redução no gasto com o fertilizante nitrogenado em torno de R\$ 1.500,00 por hectare.

6.4 Conclusão

A inoculação com as BPCP melhorou substancialmente a produtividade das plantas de milho verde e sorgo sacarino em comparação ao não uso e aos 50% de N-fertilizante, conseqüentemente, reduzindo o custo de produção. No cultivo do milho verde e sorgo sacarino, a inoculação com o isolado IPACC29, *Bacillus subtilis*, acrescida de 50% do N recomendado, demonstrou os melhores resultados para os parâmetros produtivos das culturas.

6.5 Referências

- ANTUNES, J. E. L. et al. Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, p. gmr16029662, 2017.
- AQUINO, J. P. A. et al. Plant growth-promoting endophytic bacteria on maize and sorghum1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019.
- BAZZICALUPO, M; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Springer, Dordrecht, p. 409-410. 2000.
- BÉCQUER, C. J. et al. Selection of rhizobium strains, inoculated in corn (*Zea mays*, L.), in field conditions in cattle ecosystems of Sancti Spiritus, **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 45, n. 4, 2011.
- BERGENSEN, F.J. et al. Studies of natural populations and mutants of Rhizobium in the improvement of legume inoculants. **Plant and Soil**, v.46, p.3-16, 1971.
- BLOCH, S. E. et al. Harnessing atmospheric nitrogen for cereal crop production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 62, p. 181-188, 2020.
- BREDA C.C. et al. Nutritional status and productive components of maize fertilized with sewage sludge. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 6, p. 86-98, 2018.

- BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. **Nitrogen – Total**, p.595-624, In: PAGE, A. L. et al. *Methods of soil analysis, part 2 – Chemical and microbiological properties*, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, 1982.
- BROCKWELL, J.; HELY, F.W.; NEAL-SMITH, C. A. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. **Australian Journal of Experimental Agriculture, Husbandry**, v. 6, p. 365-370, 1966.
- CALZAVARA, A. K. et al. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. **Plant Biology**, v. 20, n. 5, p. 870-878, 2018.
- CASSETARI, A. S.; SILVA, M. C. P.; CARDOSO, E. J. B. N. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica. In: ANDREOTE, F. D.; CARDOSO, E.J.B.N. (2ª ed.) **Microbiologia do Solo**, Piracicaba: ESALQ, cap. 8, p. 111-132, 2016.
- CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira grãos**. v. 1, 2016.
- CONSECANA, CONSELHO DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE PERNAMBUCO. **Normas operacionais do sistema de pagamento de cana-de-açúcar**. 30p, 2007.
- COSTA, G. H. G. et al. Effects of Sweet Sorghum Harvest Systems on Raw Material Quality. **Sugar Tech**, v. 20, n. 6, p. 730-733, 2018.
- DELLAGI, A.; QUILLERE, I.; HIREL, B. Beneficial soil-borne bacteria and fungi: a promising way to improve plant nitrogen acquisition. **Journal of Experimental Botany**, 2020.
- DRIENOVSKY, R.; ANGHEL, A.; SALA, F. Model for corn kernels weight estimating based on mature corn ears dimensional parameters. **Research Journal of Agricultural Science**, v. 51, n. 4, 2019.
- DU, N. et al. Proteomic Analysis Reveals the Positive Roles of the Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium NSY50 in the Response of Cucumber Roots to *Fusarium Oxysporum f. sp. Cucumerinum* Inoculation. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1859, 2016.
- EFENDI, R. et al. Evaluation of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L.[Moench]) on several population density for bioethanol production. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 012032, 2018.
- FERREIRA, N. C. et al. *Bacillus subtilis* improves maize tolerance to salinity. **Ciência Rural**, v. 48, n. 8, 2018.
- FONSECA BREDA, F. A.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Produtividade de milho na presença de doses de N e de inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 1, p. 45-52, 2016.

- FREITA, L. A. Chemico-technological parameters and maturation curves of sweet sorghum genotypes for bioethanol production. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 50, p. 3638-3644, 2014.
- FREITAS, P. A. F. et al. Salt acclimation in sorghum plants by exogenous proline: physiological and biochemical changes and regulation of proline metabolism. **Plant cell reports**, v. 38, n. 3, p. 403-416, 2019.
- GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**. doi: 10.6064/2012/963401. 2012.
- HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.
- HEREDIA-OLEA, E.; PÉREZ-CARRILLO, E.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Production of ethanol from sweet sorghum bagasse pretreated with different chemical and physical processes and saccharified with fiber degrading enzymes. **Bioresource technology**, v. 134, p. 386-390, 2013.
- HUNGRIA, M et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.
- HUSSAIN, A. et al. Integrated application of organic amendments with *Alcaligenes* sp. AZ9 improves nutrient uptake and yield of maize (*Zea mays*). **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-16, 2020.
- JAMES, E. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research** v. 65, p. 197- 209, 2000.
- KLEINGESINDS, C. K. **Efeito da inoculação de uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio (*Acinetobacter* sp. IC117) no desenvolvimento da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. variedade SP791011)**. Dissertação (Mestrado) - Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- KURAMAE, E. E. et al. Promoção do crescimento do sorgo por *Paraburkholderia tropica* e *Herbaspirillum frisingense*: mecanismos putativos revelados pela genômica e metagenômica. **Microrganismos**, v. 8, n. 5, p. 725, 2020.
- LA TORRE-RUIZ, De et al. Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 3, p. 587-596, 2016.
- LADHA, J. K. et al. Global nitrogen budgets in cereals: A 50-year assessment for maize, rice and wheat production systems. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016.
- LI, H. Q.; JIANG, X. W. Inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) improves salt tolerance of maize seedling. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 64, n. 2, p. 235-241, 2017.

- LI, S.; LIANG, C.; SHANGGUAN, Z. Effects of apple branch biochar on soil C mineralization and nutrient cycling under two levels of N. **Science of the Total Environment**, v. 607, p. 109-119, 2017.
- LI, Y. et al. Colonization and maize growth promotion induced by phosphate solubilizing bacterial isolates. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1253, 2017.
- LIN, Y et al. Influência de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas no crescimento de milho sob diferentes fontes de fertilidade. **Comunicações em Ciência do Solo e Análise de Plantas**, v. 49, n. 10, p. 1239-1255, 2018.
- LIU, S. et al. Response of soil carbon dioxide fluxes, soil organic carbon and microbial biomass carbon to biochar amendment: a meta-analysis. **Gcb Bioenergy**, v. 8, n. 2, p. 392-406, 2016.
- LU, C.; TIAN, H. Net greenhouse gas balance in response to ni- trogen enrichment: perspectives from a coupled biogeochemical model, **Glob. Change Biol.**, 19, 571–588, 2013.
- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**: Metabolismo microbiano. Artmed Editora, p.73-107, 2016.
- MANIRAKIZA, E. et al. Nitrogen mineralization and microbial biomass carbon and nitrogen in response to co-application of biochar and paper mill biosolids. **Applied Soil Ecology**, v. 142, p. 90-98, 2019.
- MAREQUE, C. et al. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Annals of microbiology**, v. 65, n. 2, p. 1057-1067, 2015.
- MATHUR, S. et al. Sweet sorghum as biofuel feedstock: recent advances and available resources. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 146, 2017.
- MATSUMURA, E. E. et al. Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Annals of microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2187-2200, 2015.
- MAW, M. J. W. et al. Maize, sweet sorghum, and high biomass sorghum ethanol yield comparison on marginal soils in Midwest USA. **Biomass and Bioenergy**, v. 107, p. 164-171, 2017.
- MOREIRA, F.M.S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n. 2, p. 74 – 99, 2010.
- MORETTI, L. G. et al. Efeitos de bactérias promotoras de crescimento na atividade das raízes da soja, no desenvolvimento das plantas e no rendimento. **Revista de Agronomia** , v. 112, n. 1, p. 418-428, 2020.
- NAIMAN, A. D. et al. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and culturable rhizosphere microflora. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 44-51, 2009.

- NASCIMENTO, M. A. et al. Selection of plant growth-promoting bacteria in sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) under the effects of salinity. In: **BMC proceedings**. BioMed Central, p. P113, 2014.
- NOVAKOWISKI, J. H. et al. Residual effect of nitrogen fertilization and *Azospirillum brasilense* inoculation in the maize culture. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 32, n. suplemento 1, p. 1687-1698, 2011.
- OLANREWAJU, O. S.; BABALOLA, O. O. Bacterial Consortium for Improved Maize (*Zea mays* L.) Production. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, p. 519, 2019.
- OLIVEIRA, M. A. de et al. Adubação fosfatada associada à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desempenho agrônomico do milho. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 18-25, 2015.
- OLIVEIRA, M. A. de et al. Desempenho agrônomico do milho sob adubação mineral e inoculação das sementes com rizobactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 10, p. 1040-1046, 2012.
- OLIVER, R.; SILVA, M. A. Interaction between diazotrophic bacteria and N-fertilizer doses on sugarcane crop. **Journal of Plant Nutrition**, v. 41, n. 6, p. 722-736, 2018.
- OLUGBEMI, O.; ABIOLA ABABYOMI, Y. Effects of nitrogen application on growth and ethanol yield of sweet sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] varieties. **Advances in Agriculture**, v. 2016, 2016.
- PEDRAZA, R. O. et al. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. **Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 11, n. 2, 2010.
- PEREIRA, N. C. M. et al. Corn Yield and Phosphorus Use Efficiency Response to Phosphorus Rates Associated With Plant Growth Promoting Bacteria. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, p. 40, 2020.
- PEREIRA, W. et al. Sugarcane productivity as a function of nitrogen fertilization and inoculation with diazotrophic plant growth-promoting bacteria. **Sugar Tech**, v. 21, n. 1, p. 71-82, 2019.
- RASHMI, I. et al. Organic and Inorganic Fertilizer Contaminants in Agriculture: Impact on Soil and Water Resources. In: **Contaminants in Agriculture**. Springer, Cham, p. 3-41, 2020.
- R Core Team (2020). R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- REIN, P. **Cane sugar engineering**. Verlag Dr. Albert Bartens KG, 2016.
- RIBEIRO, K. de O. et al. Characterization and proposal of potential use in foods of coproducts from waxy maize wet milling. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 315-320, 2019.

- RÍOS-RUIZ, W.F. et al. inoculação do consórcio bacteriano aumenta a produção de arroz (*Oryza sativa* L.), reduzindo as aplicações de fertilizantes nitrogenados na região de San Martin, Peru. **Rizosfera**, 100200. 2020.
- ROSA, P. A. L. et al. Inoculation with growth-promoting bacteria associated with the reduction of phosphate fertilization in sugarcane. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, p. 32, 2020.
- ROSALES, M. A. et al. Chloride improves nitrate utilization and NUE in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 442, 2020.
- SANTANA, S. R. A. et al. Inoculation of plant growth-promoting bacteria attenuates the negative effects of drought on sorghum. **Archives of Microbiology**, p. 1-10, 2020.
- SANTOS, C. L. R. et al. Contribution of a mixed inoculant containing strains of *Burkholderia* spp. and *Herbaspirillum* ssp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 96-106, 2017.
- SANTOS, S. G. et al. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p. 12-23, 2019.
- SANTOYO, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological research**, v. 183, p. 92-99, 2016.
- SCHAEFER, P. E. et al. Inoculação com *Azospirillum brasilense* na produção e nos componentes de produção de milho em um sistema integrado lavoura-pecuária. **Acta Scientiarum. Agronomia**, v. 41, 2019.
- SCHLEMPER, T. R. et al. Effect of *Burkholderia tropica* and *Herbaspirillum frisingense* strains on sorghum growth is plant genotype dependent. **PeerJ**, v. 6, p. e5346, 2018.
- SHUKLA, S. et al. The relationship between plant height and sugar accumulation in the stems of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Field Crops Research**, v. 203, p. 181-191, 2017.
- SILVA, P. R. A. et al. Selection and evaluation of reference genes for RT-qPCR expression studies on *Burkholderia tropica* strain Ppe8, a sugarcane-associated diazotrophic bacterium grown with different carbon sources or sugarcane juice. **Antonie van Leeuwenhoek** 109(11):1493-1502, 2016.
- SINGH, D. P. et al. (Ed.). **Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity**. New York: Springer, 2016.
- SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E. **Cerrado: Correção do solo e adubação**. 2.ed. Brasília, Embrapa Cerrados, 416p. 2004.
- SOUZA, R. D.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and molecular Biology**, 38 401-419. 2015.

SPOLAOR, L. T. et al. Bactérias promotoras de crescimento associadas a adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônômico de milho pipoca. **Bragantia**, Campinas v. 75, n. 1, p.33-40, 2016

TAIZ, L., ZEIGER, T. **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 888, 2017.

VINCENT, J M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. IBP Handbook No. 15, Black Well Scientific Publications. 1970.

7. Considerações finais

Em nossa pesquisa foi possível observar que as bactérias endofíticas de cana-de-açúcar favorecem o maior desenvolvimento das plantas de milho e sorgo, onde no capítulo um foi perceptível que as plantas submetidas a inoculação, mesmo em condição estéril, conseguiam ter crescimento inicial acelerado sendo superior aos controles. Na cultura do sorgo até os primeiros 15 dias era bastante visível essa diferença, sendo que logo após isso as testemunhas com a adubação nitrogenada superavam as demais plantas.

No segundo capítulo, com o solo da área de cultivo, as plantas de ambas as culturas apresentaram crescimento adequado, semelhante as do controle nitrogenado e em alguns casos superiores, mostrando que na presença do solo de cultivo com sua matéria orgânica e seus nutrientes, os inoculados foram favorecidos e propiciaram melhores resultados, com plantas visivelmente bem nutridas, dando indicio de que a biomassa das plantas era bastante favorecida com a inoculação.

O experimento em campo, relativo ao terceiro capítulo, foi fundamental para mostrar que as bactérias selecionadas nos experimentos anteriores podem favorecer a produção das culturas, melhorando a produtividade. Pois o uso destas bactérias diazotróficas endofíticas de cana-de-açúcar como inoculante nas culturas do sorgo sacarino e do milho verde proporciona produtividades adequadas, melhora a qualidade do produto final e garante redução no uso de fertilizante mineral, favorecendo uma agricultura sustentável. É importante salientarmos que as estirpes usadas em nossa pesquisa ainda necessitam de outros estudos avaliando sua viabilidade como produto biológico para que enfim possam chegar os agricultores, pois em nossa pesquisa a inoculação foi realizada de maneira experimental, que possui baixa eficiência em maiores áreas de cultivo.