

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**RIZÓBIOS EFICIENTES EM LOTUS COMO PROMOTORES DE  
CRESCIMENTO EM ARROZ IRRIGADO**

**Benjamin Dias Osorio Filho**  
**Tese de doutorado**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**RIZÓBIOS EFICIENTES EM LOTUS COMO PROMOTORES DE  
CRESCIMENTO EM ARROZ IRRIGADO**

BENJAMIN DIAS OSORIO FILHO  
Engenheiro Agrônomo (UFSM)  
Mestre em Ciência do Solo (UFSM)

Tese de doutorado apresentada como um dos requisitos para obtenção do  
Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil  
Outubro de 2009

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO

Biblioteca Setorial da Faculdade de Agronomia da UFRGS

BENJAMIN DIAS OSORIO FILHO  
Engenheiro Agrônomo (UFSM)  
Mestre em Ciência do Solo (UFSM)

**TESE**

Submetida como parte dos requisitos  
para a obtenção do Grau de

**DOUTOR EM CIÊNCIA DO SOLO**

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em:  
Pela Banca Examinadora

Homologado em:  
Por

ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ  
Professor Orientador  
PPG-Ciência do Solo/UFRGS

FLÁVIO OLIVEIRA CAMARGO  
Coordenador do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência do Solo

SIU MUI TSAI  
CENA-USP

LEANDRO SOUZA DA SILVA  
PPG Ciência do Solo/UFSM

PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de Agronomia

FLÁVIO OLIVEIRA CAMARGO  
PPG-Ciência do Solo/UFRGS

*Aos meus familiares e amigos*

Yo tengo tantos hermanos  
Que no los puedo contar  
En el valle, en la montaña,  
en la pampa y en el mar  
Cada cual con sus trabajos  
Con sus sueños cada cual  
Con la esperanza delante,  
con los recuerdos detrás  
Yo tengo tantos hermanos  
Que no los puedo contar

Gente de mano caliente  
Por eso de la amistad  
Con un lloro pa' llorarlo  
Con un rezo pa' rezar  
Con un horizonte abierto  
Que siempre esta mas allá  
Y esa fuerza pa' buscarlo  
Con tezon y voluntad.

Cuando parece más cerca  
Es cuando se aleja más  
Yo tengo tantos hermanos  
Que no los puedo contar.  
Y asi seguimos andando  
Curtidos de soledad  
Nos perdemos por el mundo  
Nos volvemos a encontrar.

Y asi nos reconocemos  
Por el lejano mirar  
Por las coplas que mordemos  
Semillas de inmensidad.  
Yo tengo tantos hermanos  
Que no los puedo contar

Y asi seguimos andando  
Curtidos de soledad  
Y en nosotros nuestros muertos  
Pa' que nadie quede atrás.

Yo tengo tantos hermanos  
Que no los puedo contar  
Y una hermana muy hermosa  
Que se llama libertad

*Atahualpa Yupanqui*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me regalado a vida, e por me manter nela, com saúde e paz.

Durante estes três anos e meio de doutorado, pessoas entraram, outras passaram, e outras ainda, saíram de minha vida... a todas elas, eu agradeço.

Em especial, agradeço:

Ao meu orientador, professor Enilson Luiz Saccol de Sá, por ter me acolhido, confiado em mim, e ter me ensinado tantas coisas sobre rizóbios e sobre a própria vida! Agradeço a ele por ser um grande amigo, e um grande mestre;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, por terem me aceito com aluno;

Ao Jader, secretário do PPGCS, pela eficiência e atenção;

Aos professores do PPGCS e demais programas, onde cursei disciplinas, pelos ensinamentos e amizade, em especial aos professores Pedro Selbach, Flavio Camargo, Ana Paula Frazon, Sueli Van der Sand e Fábio Beck.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado durante o primeiro ano de curso;

À CAPES por ter me concedido a bolsa de estágio doutoral, durante seis meses no México;

Aos colegas do PPGCS e PPGMAA, pela amizade e companheirismo, em especial à André do Amaral, Andrea Franco, Andressa Silveira, Bruno Lisboa, Cátia Passos, Fabíola Lopes, Flávio Oliveira, Graciele Sarante Santana, Jeane Portela, Josiléia Zanatta, Henrique Debiase, Luiz França (Lula), Luiz Chaves, Luiza Escobar, Lucélia Cabral, Madalena Boemi, Marquiel Jones, Mirla Andrade, Michely Tomazi, Osmar Conte, Patrícia Quadros, Robson Andrezza, Rodrigo Schoenfeld, Regilene Souza e Ricardo Bergamo.

À colega de graduação, mestrado e doutorado, Rosane Martinazzo, por compartilhar a paixão pelo solo, pela amizade e toda a força nos momentos de maior demanda;

Aos bolsistas Andréia Binz e Rafael Lima, pela amizade, pelo mutualismo no trabalho, e pelas horas descontraídas na casa de vegetação e no laboratório;

À Adriana Giongo, pela orientação extra-oficial, pela amizade e pelas ajudas;

Aos companheiros do laboratório, pela confraternização diária e a amizade, em especial a Marcio Frizzo, Marcio Silveira, Brenda Tonon, Ricardo Fonotoura, Camile Granada, Marcos Stroschein, Diego Sevastian, Marcelo Wallau, Marlo Markus, Rafael Machado, Gleidson Gimenes, Raquel Damasceno e Thais Cabral, e ao Luiz Antônio Silveira (Tonho), mesmo sendo de outro laboratório;

Ao Dr. Jesus Caballero-Mellado, por ter me aceitado em seu laboratório, no Centro de Ciências Genômicas, Universidade Nacional Autónoma de México, para realização do estágio de doutorado, e pela sua atenção e amizade;

Aos colegas e funcionários do laboratório de Ecologia Genômica/UNAM, pelo companheirismo e atenção, em especial à Lulu Martinez, Augusto Ramirez, Nicolás Gomez e à Lucy.

À Professora Siu Mui Tsai, por ter me acolhido em um breve estágio de biologia molecular em seu laboratório no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em Piracicaba. Agradeço também ao José Elias Gomes, pela atenção e ensinamentos.

À Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, por ter me permitido conciliar doutorado e docência, em especial aos colegas professores de Cachoeira do Sul, pela amizade, companheirismo, força, e fraternidade, Tatiana Duarte, Marilise Mesquita, Ana Paula Rovedder, Celson Canto, Andréia Teixeira, Marinês Ribas, Gisele Guimarães e Rosângela Lunardi, e aos alunos, por me estimularem a querer continuar essa magia de ensinar e aprender;

Aos amigos, pela presença constante e fundamental, mesmo que apenas em alguma época deste doutorado. Agradeço a Adriano Maixner, Alessandra Kieling, Aline Fogaça, Átila Cardinal, Cândice Machado, Clarissa Cogo, Cintya Valerio, Everardo Rodriguez, Felipe Graichen, Grazielle Feltrin Dias, German Rojas, Jair Giacomini, Jasmin Reyes, Joana Balardin, Juliana Burin, Julio Bacchin, Laura Inêz Cuervo, Lúcia Kliemann, Luciana Burin, Luciane Azevedo, Luiz Fernando Siqueira, Marcelo Stefani da Costa, Maria Alice Santos, Melissa Itandegui, Mônica e Ana Luiza Refatti, Paula Machado, Paula Marchetti, Perla Dorneles, Rafael Hoss, Rosana Meneguetti, Rosana Moraes, Silvia Melisa Ávila Lombo e Zilah Cheuiche.

E àquele grupo de pessoas, com quem convivo desde que nasci, e que amo muito: a minha família. Agradeço em especial à minha mãe Ana Loiraci, pelo amor incondicional, ao meu pai Benjamin (*in memoriam*), pelo exemplo de vida, à minha irmã Elvira Luiza, meu cunhado Luiz, e meus sobrinhos Ana Maria e Matheus, pelo estímulo e pela convivência.

Agradeço também a extensão porto-alegrense da minha família, que me acolhe sempre, com filho e irmão: meus tios Bento, Arlete e Gleci, e meus primos-irmãos de sangue e de coração Denise (Deni), Sandra (Mosa), Daniel (Dani) e Charles.

A todos às mulheres e homens que foram meus professores, iniciando pela minha mãe, que me alfabetizou. Muito obrigado por todo estímulo de querer aprender sempre!



# RIZÓBIOS EFICIENTES EM LOTUS E PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM ARROZ IRRIGADO<sup>1</sup>

Autor: Benjamin Dias Osorio Filho

Orientador: Prof. Enilson Luiz Saccol de Sá

## RESUMO

Em áreas de várzeas, os rizóbios podem formar nódulos em leguminosas hibernais, adaptadas a condições de estresse hídrico, fixar nitrogênio, e colonizar as plantas de arroz, em sistema de rotação. Recentes estudos têm mostrado que os rizóbios podem colonizar raízes, caules e folhas de gramíneas, como o arroz, promovendo o crescimento da planta. A produção de fito-hormônios, principalmente ácido indol acético (AIA), é possivelmente o principal mecanismo de promoção de crescimento de arroz por rizóbios. Os objetivos deste trabalho foram estudar a resistência da simbiose entre rizóbios e *Lotus* a alagamento e deficiência hídrica; verificar a resposta de diferentes cultivares de arroz à inoculação com rizóbios; avaliar a interação entre a adubação nitrogenada e a promoção de crescimento por rizóbios em arroz; estudar o padrão de colonização de plantas de arroz e leguminosas por rizóbios e estudar geneticamente a biossíntese de auxinas por rizóbios. Foram realizados vários experimentos, em casa de vegetação e em laboratório, com plantas das espécies de leguminosas *L. corniculatus* (variedade São Gabriel) e *L. uliginosus* (variedade Maku) e com plantas arroz, inoculadas com diferentes rizóbios. As plantas de *L. uliginosus* toleraram o alagamento, mostrando potencial para utilização em áreas de várzea, em rotação com arroz. Entre as cultivares de arroz testadas, IRGA 424 mostrou-se mais responsiva à inoculação com rizóbios. A inoculação estimulou o crescimento das plantas e este incremento foi proporcional às doses de nitrogênio aplicado. Além disso, a inoculação com rizóbios permitiu maior eficiência no uso do nitrogênio absorvido do solo. A marcação dos rizóbios com o gene Gus permitiu confirmar a colonização em arroz. Os rizóbios testados são capazes de produzir AIA e há indícios de que a biossíntese ocorra pela rota do indol-3-acetonitrilo (IAN).

---

<sup>1</sup> Tese de doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (97 p.) Novembro, 2009. Trabalho realizado com apoio financeiro da Capes e do CNPq.

# EFFICIENCY OF RHIZOBIA IN LOTUS AND IN PROMOTION OF GROWTH IN RICE<sup>2</sup>

Author: Benjamin Dias Osorio Filho

Adviser: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

## ABSTRACT

In lowland areas, the rhizobia can form nodules in legumes, when adapted to conditions of water stress, fix nitrogen and colonize the rice plants in rotation. Recent studies have shown that rhizobia can colonize roots, stems and leaves of grasses, such as rice, promoting plant growth. The production of phytohormones, mainly indole acetic acid (IAA) is possibly the main mechanism of growth promotion of rice by rhizobia. The objectives were to study the resistance of the symbiosis between rhizobia and Lotus to flooding and drought; check the response of different rice cultivars to inoculation with rhizobia and to evaluate the interaction between nitrogen and the promotion of growth by indigenous rice; to study the colonization pattern of rice plants by rhizobia and legumes and to study genetically the biosynthesis of auxin by rhizobia. Several experiments were conducted in the greenhouse and laboratory, with plants of the legume species *L. corniculatus* (var. São Gabriel) and *L. uliginosus* (var. Maku) and rice plants inoculated with different rhizobia. *L. uliginosus* plants tolerate flooding, showing potential for their use in floodplain areas, in rotation with rice. Among the rice cultivars tested, IRGA424 proved to be more responsive to inoculation with rhizobia. Inoculation with rhizobia tested stimulated the growth of plants, and this increase was proportional to the doses of nitrogen applied. Furthermore, inoculation with rhizobia allowed more efficient use of nitrogen absorbed from the soil. The marking of rhizobia with the Gus gene, confirmed the colonization of rice. The rhizobia tested are able to produce IAA, and there is evidence that the biosynthesis occurs by the route of indole-3-acetonitrile (IAN).

---

<sup>2</sup> Doctoral thesis in Soil Science. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (p. 97) November, 2009. Work performed with financial support from Capes and CNPq.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Os rizóbios e a simbiose com leguminosas.....	4
2.2. A simbiose rizóbios / plantas do gênero Lotus.....	6
2.3. Rizóbios como organismos promotores de crescimento de plantas.....	7
2.4. Rizóbios promotores de crescimento em arroz.....	10
2.5. Rizóbios em sistemas de rotação de arroz irrigado com leguminosas hibernais.....	12
<b>3. ESTUDO I - Eficiência de rizóbios em <i>Lotus corniculatus</i> e <i>L.uliginosus</i> sob diferentes condições hídricas, e como promotores de crescimento de arroz irrigado.....</b>	<b>14</b>
<b>4. ESTUDO II - Respostas de cultivares de arroz à inoculação com rizóbios nativos do sul do Brasil.....</b>	<b>31</b>
<b>5. ESTUDO III - Promoção de crescimento de arroz por rizóbios em diferentes níveis de adubação nitrogenada.....</b>	<b>51</b>
<b>6. ESTUDO IV - Produção de ácido indol acético e colonização de plantas de lótus (<i>Lotus corniculatus</i>), trevo vesiculoso (<i>Trifolium vesiculosum</i>) e arroz (<i>Oryza sativa</i>) por rizóbios nativos do sul do</b>	

<b>Brasil.....</b>	<b>63</b>
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>84</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>86</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>88</b>
<b>10. RESUMO BIOGRÁFICO.....</b>	<b>97</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

3.1. Matéria seca da parte aérea de plantas de <i>Lotus corniculatus</i> , inoculadas com rizóbios, em três condições de umidade do solo.....	20
3.2. Matéria seca da parte aérea de plantas de <i>Lotus uliginosus</i> , inoculadas com rizóbios, em três condições de umidade do solo...	22
3.3. Perfilhamento, produção de matéria seca da parte aérea e eficiência relativa em arroz (cultivar IRGA424) em função da inoculação com rizóbios.....	26
4.1. Estirpes de rizóbios utilizadas .....	34
4.2. Germinação inicial e final de sementes de quatro cultivares de arroz, inoculadas com seis isolados de rizóbios nativos do sul do Brasil.....	38
4.3. Produção de matéria seca da parte aérea e da raiz de plantas de quatro cultivares de arroz, cultivadas em vasos com substrato esterilizado, inoculadas com rizóbios nativos do sul do Brasil.....	40
4.4. Produção de matéria seca da parte aérea e perfilhamento de plantas de quatro cultivares de arroz, cultivadas em vasos com solo, inoculadas com rizóbios nativos do sul do Brasil.....	42

4.5. Incrementos percentuais na germinação, na parte aérea, no sistema radicular e no perfilhamento de plantas de quatro cultivares de arroz inoculadas com rizóbios nativos do Rio Grande do Sul.....	44
6.1. Isolados de rizóbios utilizados no estudo IV.....	66
6.2. Oligonucleotídeos empregados, sequência, tamanho do fragmento da amplificação, proteína e organismo de origem.....	74

## RELAÇÃO DE FIGURAS

3.1. Nitrogênio total acumulado na parte aérea de plantas de <i>Lotus corniculatus</i> (A) e <i>Lotus uliginosus</i> (B), inoculadas com isolados de rizóbios e submetidas a três níveis de umidade do solo.....	24
3.2. Eficiência relativa das simbioses entre rizóbios e plantas de <i>Lotus corniculatus</i> e <i>Lotus uliginosus</i> em condições adequadas de umidade .....	25
4.1. Efeito da inoculação com rizóbios na germinação de sementes de arroz das cultivares IRGA 409, IRGA 417, IRGA 422 e IRGA 424.....	37
4.2. Eficiência relativa de isolados de rizóbios nativos do sul do Brasil em promover o acúmulo de matéria seca da parte aérea de plantas de arroz da cultivar IRGA 424, aos sessenta dias após a semeadura, em vasos com solo, em casa de vegetação.....	43
5.1. Matéria seca da parte aérea de plantas de arroz (cultivar IRGA424), sem inoculação e inoculadas com os rizóbios UFRGS-Lc336 (A), UFRGS-Lc348(B), UFRGS-Lc398 (C), UFRGS-LG111 (D), UFRGS-Ls36 (E), EEL1183 (F), UFRGS-VP16 (G) e UFRGS-1TV(H), em doses crescentes de nitrogênio.....	55

5.2. Perfilhamento de arroz (cultivar IRGA424), sem inoculação e inoculadas com os rizóbios UFRGS-Lc336 (A), UFRGS-Lc348 (B), UFRGS-Lc398 (C), UFRGS-LG111 (D), UFRGS-Ls36 (E), EEL1183(F), UFRGS-VP16 (G) e UFRGS-1TV(H) em doses crescentes de nitrogênio.....	57
5.3. Quantidade acumulada de nitrogênio, fósforo e potássio do solo pela parte aérea de plantas de arroz (cultivar IRGA 424), sem inoculação e inoculadas com isolados de rizóbios, em doses crescentes de nitrogênio.....	58
6.1. Cromatogramas da produção de índoles por rizóbios na ausência e na presença de triptofano. A) <i>Bradyrhizobium japonicum</i> UFRGS-Lc336 sem triptofano; B) <i>B. japonicum</i> UFRGS-Lc336 com triptofano; C) <i>Mesorhizobium amorphae</i> UFRGS-Lg111 sem triptofano; D) <i>M. amorphae</i> UFRGS-Lg111 com triptofano; E) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> UFRGS-1TV sem triptofano, F) <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> UFRGS-1TV com triptofano.....	72
6.2. Placa de petri com colônias de rizóbios. As colônias azuis correspondem às bactérias que receberam o plasmídeo contendo o gene Gus.....	75
6.3. FIGURA 6.3. Colonização de <i>Mesorhizobium amorphae</i> UFRGS-Lg111 em plantas de <i>Lotus corniculatus</i> , (A) raiz contendo nódulo e primórdio nodais, (B) detalhe de nódulo, (C) raízes e folhas.....	75
6.4. Colonização de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> UFRGS-1TV em plantas de <i>Trifolium repens</i> (A) raízes e folha; (B, C) detalhe do nódulo.....	76



- 6.5. Colonização de plantas de arroz por *Mesorhizobium amorphae* UFRGS-Lg111 (A) semente, caule e raízes, (B) detalhe de raiz secundária, (C, D) raiz primária com raízes secundárias..... 77
- 6.6. Colonização de plantas de arroz por *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UFRGS-1TV (A) semente, raiz e caule; (B, C) raiz principal com raízes secundárias, (D) folha, (E) nervuras da folha, (F) primórdio foliar..... 78

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os rizóbios são bactérias conhecidas pelos profissionais das ciências agrárias e biológicas e por muitos agricultores, devido à capacidade que estes microrganismos possuem em fixar o nitrogênio atmosférico, quando em simbiose com plantas da família das leguminosas. A enzima nitrogenase, responsável pela fixação do gás nitrogênio ( $N_2$ ) da atmosfera, está presente em apenas alguns procariotos, entre eles os rizóbios. Graças a essas bactérias, culturas agrícolas de grande importância econômica, como a soja, são cultivadas no Brasil sem aplicação de nenhuma forma de adubação nitrogenada. O uso da inoculação com rizóbios, específicos para cada planta, tem despertado cada vez mais atenção dos agricultores, pois reduz consideravelmente os custos de produção devido à redução e, até mesmo, a suspensão da aplicação de adubação nitrogenada. Outra grande vantagem da fixação biológica de nitrogênio está relacionada com a questão ambiental. A redução da aplicação de nitrogênio no solo também diminui a poluição dos recursos hídricos, principalmente com nitrato. Além disso, a fabricação de fertilizantes nitrogenados industriais é energeticamente muito dispendiosa, pois depende da queima de combustíveis fósseis, para a obtenção de elevadas pressões e temperaturas.

O nitrogênio fixado pelas bactérias fará parte de aminoácidos, proteínas e outros compostos nitrogenados dos vegetais e, uma vez consumido pelos herbívoros, seguirá na cadeia trófica. A produção animal é, de forma indireta, beneficiada pela ação dos microrganismos diazotróficos, entre os quais se destacam os rizóbios. Leguminosas forrageiras são importantes fontes de proteína para os animais, e o nitrogênio destas plantas pode ser totalmente oriundo da fixação biológica, ao invés de aplicações de fertilizantes.

Na última década, em diferentes partes do mundo, surgiram alguns estudos mostrando que os rizóbios podem também se associar com plantas de outras famílias, como as gramíneas. Neste tipo de associação, muitas vezes endofítica, não há formação de nódulos nem ocorre a fixação de nitrogênio, entretanto, outros mecanismos de promoção de crescimento permitem que a planta seja estimulada por estas bactérias. Os rizóbios são capazes de colonizar a rizosfera da gramínea, penetrando por fissuras radiculares, colonizando o interior da raiz e até mesmo, ascender para a parte aérea das plantas. No interior dos tecidos, estas bactérias secretam substâncias hormonais, como auxinas, que estimulam o crescimento de raízes, caules e folhas. Em consequência deste aumento de vigor da planta, são verificados aumentos nas taxas de absorção de nutrientes, na fotossíntese e no rendimento de grãos.

Entre as gramíneas estudadas em relação à colonização com rizóbios, o arroz tem recebido muita atenção. Pesquisas recentes realizadas com a cultura do arroz irrigado às margens do Rio Nilo, em sistema de rotação com trevo branco há centenas de anos, mostram a colonização de raízes e parte aérea com *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Durante o inverno este microrganismo realiza simbiose com plantas de trevo branco, e no verão passa a viver endofiticamente no arroz. Essa colonização promove benefícios ao arroz, como aumentos de produção de matéria seca, produção de grãos e maior eficiência na utilização dos nutrientes do solo, além de aumentar a quantidade total de proteína no grão.

No Estado do Rio Grande do Sul, a cultura do arroz irrigado ocupa aproximadamente um milhão de hectares, o que corresponde a mais de 70% da área cultivada com arroz no Brasil. As áreas de várzeas, onde o arroz irrigado é cultivado, concentram-se na metade sul deste Estado, região de grande importância, também, na produção de carne bovina e ovina. Nessas áreas de várzeas, a utilização de rizóbios pode trazer benefícios tanto para a cultura do arroz quanto para a produção de forrageiras, uma vez que a rotação entre essas duas atividades é muito comum. A utilização de plantas leguminosas forrageiras, apresentando eficiente simbiose com rizóbios aumentaria a produção de forragem no inverno e disponibilizaria nitrogênio para a cultura do arroz em sucessão. Os rizóbios da simbiose com a forrageira

permaneceriam no solo, colonizando as plantas de arroz e beneficiando diretamente a cultura, pela promoção de crescimento.

Para que essa integração entre lavoura e pecuária tenha êxito, alguns estudos necessitam ser realizados. Leguminosas forrageiras precisam ser testadas quanto à sua capacidade de resistir a períodos de alagamento, muito comuns em áreas de várzea durante o inverno, que é bastante chuvoso no Rio Grande do Sul. Algumas espécies do gênero *Lotus* resistem ao cultivo em áreas com alagamento e merecem um estudo mais criterioso. O rizóbio eficiente para a simbiose com essa planta de Lotus, em situação de estresse hídrico, também precisa apresentar um satisfatório desempenho em estimular o crescimento das cultivares de arroz mais utilizadas no Estado do Rio Grande do Sul. Os mecanismos bacterianos que estimulam o crescimento vegetal, como a produção de hormônios, precisam ser mais estudados. Necessita-se saber quais e em que proporções estas substâncias são produzidas e como atuam no vegetal. Além disso, necessita-se saber também como ocorre a colonização das plantas de arroz pelos rizóbios. Obtendo este conhecimento, será possível pensar e desenvolver uma metodologia adequada e eficiente para a inoculação de rizóbios em lavouras de arroz, bem como desenvolver produtos inoculantes a base de rizóbios promotores de crescimento em arroz irrigado.

O trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade de rizóbios em fixar nitrogênio em simbiose com plantas do gênero *Lotus*, em condições de estresse hídrico, e estimular o crescimento de plantas de arroz irrigadas por inundação. Especificamente, os objetivos são (a) avaliar a simbiose entre rizóbios e espécies de *Lotus* sob estresses hídricos; (b) verificar a resposta de cultivares de arroz à inoculação com diferentes rizóbios; (c) avaliar a interação entre adubação nitrogenada e promoção de crescimento por rizóbios em arroz; (d) caracterizar genotipicamente os rizóbios estudados; (e) verificar a colonização das plantas de arroz pelos rizóbios, e (f) estudar geneticamente a biossíntese de auxinas por rizóbios.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Os rizóbios e a simbiose com leguminosas

Os rizóbios são bactérias habitantes do solo, de vida livre, ou simbiontes com plantas da família das leguminosas, neste último caso, realizando a fixação biológica de nitrogênio, em estruturas radiculares conhecidas como nódulos. Estas bactérias são gram-negativas, aeróbias obrigatórias, em forma de bastonetes, não formadoras de endosporos, com tamanho variando entre 0,5-0,9 por 1,2-3,0 $\mu$ m. O número e a posição de flagelos dependem do gênero. São bactérias predominantemente quimiorganotróficas, com exceção para algumas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, que são quimiolitotróficas (Somasegaram & Hoben, 1994; Moreira & Siqueira, 2006).

Com os recentes avanços em biologia molecular e a descoberta de novas espécies, a taxonomia dos rizóbios tem se modificado. Os rizóbios foram inicialmente agrupados no gênero *Rhizobium* Frank 1889 (Kuykendall et al, 2005). Atualmente, o termo rizóbio é empregado para designar as bactérias capazes de formar nódulos e realizar a fixação de nitrogênio em simbiose com as leguminosas. Alguns autores tratam os rizóbios como bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) (Moreira & Siqueira, 2006). Estes procariotos pertencem ao filo alfa-proteobacteria, à ordem rizobiales, e, atualmente, se distribuem em sete famílias, dez gêneros e 49 espécies. A família Rhizobiaceae compreende os gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium*. Na família Bradyrhizobiaceae estão os gêneros *Bradyrhizobium* e *Blastobacter*. As famílias Phyllocateriaceae, Xanthobacteraceae, Hyphomicrobiaceae, Methylobacteraceae e Brucelaceae, possuem apenas um gênero de BFNNL cada, e compreendem, respectivamente, *Mesorhizobium*,

*Azorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium* e *Ochrobactrum*. Embora pertencentes ao filo beta-proteobacteria e à ordem Burkholderiaceae, algumas espécies do gênero *Bulkholderia* e *Ralstonia* também são capazes de formar nódulos em leguminosas e fixar nitrogênio, podendo também ser designadas como rizóbios (Rivas et al., 2002; Wolde-Meskel et al., 2005; Han et al., 2008).

A família das leguminosas é a terceira maior entre as famílias de plantas produtoras de flores. No Rio Grande do Sul, é a família com maior diversidade de espécies (Pereira et al., 1998). Das associações entre plantas e bactérias diazotróficas, a simbiose entre leguminosas e rizóbios é a mais eficiente na fixação biológica de nitrogênio. Dentre as subfamílias de Leguminosae, a papilionoideae, considerada família Fabaceae por alguns autores, representa o grupo mais numeroso e com maior número de espécies capazes de formar nódulos. Nesta família estão importantes plantas produtoras de grãos para alimentação humana e animal, como o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a ervilha (*Pisum sativum*) e a soja (*Glycine max*), para a produção de forragem, como a alfafa (*Medicago sativa*), os cornichões (*Lotus* spp.) e os trevos (*Trifolium* spp.), para a produção de adubos verdes como a mucuna (*Stizolobium* spp.), o guandu (*Cajanus cajan*) e a ervilhaca (*Vicia sativa*). Inúmeros outros exemplos podem ser citados e outros tipos de utilização podem ser dados às leguminosas, como produção de madeira, lenha, utilização como plantas ornamentais, etc.

Os teores de nitrogênio no tecido das leguminosas são maiores que em plantas de outras famílias (Moreira & Siqueira, 2006). Uma planta leguminosa sem associação com rizóbios, necessita que o nitrogênio esteja disponível no solo. No entanto, quando o rizóbio realiza uma simbiose eficiente com essa planta, o nitrogênio é fornecido pela bactéria suprimindo parcial ou totalmente as demandas da planta. A soja, por exemplo, cuja área de cultivo no Brasil ultrapassa os 20 milhões de hectares, quando devidamente inoculada com estirpes eficientes de *Bradyrhizobium*, dispensa totalmente o uso de fertilizantes nitrogenados (Alves et al., 2006), representando grande economia de recursos e diminuindo o potencial de poluição por nitrato.

## 2.2. A simbiose rizóbios / plantas do gênero *Lotus*

Os estudos sobre a introdução de espécies forrageiras têm destacado nas plantas pertencentes ao gênero *Lotus* o potencial forrageiro, a boa adaptação a solos de baixa fertilidade, a capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio e o elevado teor de taninos, que evita a ocorrência de timpanismo nos animais (Montes, 1988; Langer, 1990). Dentre as espécies forrageiras do gênero *Lotus* destacam-se *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subflorus* e *L. uliginosus*. No Rio Grande do Sul são comercializadas as sementes das espécies de *L. corniculatus* e *L. uliginosus*.

A espécie *Lotus corniculatus* L. é uma leguminosa forrageira perene hiberno-primaveril, de origem européia e mediterrânea (Soster et al., 2004), com excelente adaptação no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile, sendo largamente utilizada. No Rio Grande do Sul, foi desenvolvida uma cultivar denominada São Gabriel, a partir de pesquisas entre 1955 e 1965 na Estação Experimental deste município (Paim, 1988). Esse cultivar é caracterizado pelo rápido crescimento inicial, boa produtividade, elevada qualidade de forragem e boa ressemeadura natural, mas apresentando problemas de persistência, devido ao seu hábito de crescimento ereto, não suportando pastejo intenso.

A espécie leguminosa de *Lotus uliginosus* (*L. pedunculatus*) é uma planta perene estival, rizomatosa, originária do Mediterrâneo. É mais tolerante a solos ácidos e deficientes em fósforo, com elevada capacidade de estabelecimento em áreas úmidas. Na Nova Zelândia foi desenvolvida a cultivar tetraplóide Maku, introduzida no sul do Brasil (Paim & Riboldi, 1991). As plantas da espécie *L. uliginosus* apresentam tolerância à inundação, pois quando em deficiência de oxigênio, ativam mecanismos de tolerância como formação de aerênquimas e lenticelas, que permitem as trocas gasosas a partir das raízes e caules submersos (James & Crawford, 1998; James & Sprent, 1999). Além disso, as plantas de *L. uliginosus* podem formar nódulos eficientes na fixação de nitrogênio, tanto em raízes submersas, quanto em raízes adventícias oriundas de hipocótilos ou caules submersos, e a nodulação e a atividade da nitrogenase (estimada pela redução de acetileno) em condições de inundação são iguais ou até mesmo maiores que em condições de umidade adequada (James & Crawford, 1998).

Quando se deseja a introdução e o estabelecimento de leguminosas em novos ambientes, nem sempre se encontram populações de rizóbios efetivas na fixação de nitrogênio na microbiota do solo. Para contornar esta situação, utiliza-se a inoculação com estirpes de rizóbios eficientes, favorecendo o desenvolvimento e o rendimento das pastagens com leguminosas. As bactérias capazes de nodular as espécies de *Lotus* incluem tanto estirpes dos gêneros *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982; Jarvis *et al.*, 1997).

A variabilidade na simbiose de *Lotus* com rizóbios foi estudada por Baraibar *et al.* (1999), que obtiveram 50 isolados de solos uruguaios demonstrando especificidade para *Lotus corniculatus*. No Brasil, poucos trabalhos têm sido realizados visando o isolamento e seleção de estirpes para plantas do gênero *Lotus*. Existe uma carência de estirpes recomendadas eficientes para as plantas desse gênero. No entanto, trabalhos recentes isolaram rizóbios eficientes para *Lotus corniculatus* e *L. uiliginosus* (Frizzo, 2007) e para *L. glaber* e *L. subbiflorus* (Foutoura, 2007).

### **2.3. Rizóbios como organismos promotores de crescimento de plantas**

Os modos de ação dos organismos promotores de crescimento podem ser classificados em quatro grandes grupos: (I) aumento da disponibilidade de nitrogênio através da fixação biológica, (II) aumento da disponibilidade de fósforo, ferro e enxofre para a planta hospedeira, (III) produção de fito-hormônios, (IV) estímulo às interações da planta com outros microrganismos promotores de crescimento (Banerjee *et al.*, 2006). Outros autores (Dobbelaere *et al.*, 2003) também classificam os modos de ação dos organismos promotores de crescimento, como (a) fixação de nitrogênio, (b) produção de substâncias promotoras de crescimento, (c) síntese de enzimas moduladoras do crescimento, (d) aumento na absorção de nutrientes, (e) aumento na resistência ao estresse, (f) solubilização de fosfatos, (g) produção de vitaminas, (h) aumento na agregação do solo, (i) biocontrole, (j) interações com outros microrganismos.

Além de realizarem a bem elucidada fixação biológica de nitrogênio os rizóbios também podem, por outros mecanismos, estimular o crescimento e



o desenvolvimento de plantas de outras famílias, além das leguminosas. Os rizóbios podem viver no interior de raízes, caules e folhas de plantas, como gramíneas, e estimular o crescimento destes vegetais pela produção de substâncias hormonais, como o ácido indol acético (Biswas et al., 2000; Mantelin & Touraine, 2004; Chen et al., 2005), pela solubilização de fosfatos (Rodriguez & Fraga, 1999), e pela proteção das plantas contra patógenos (Mishra et al., 2006; Dutta et al., 2007).

Depois da fixação de nitrogênio, a produção de fito-hormônios talvez seja o mais importante modo de ação na promoção de crescimento de plantas por microrganismos. A síntese de auxina, particularmente o ácido indol acético (AIA), por microrganismos endofíticos, promove o crescimento das raízes e a proliferação de pêlos radiculares, melhorando a absorção de água e nutrientes do solo e, conseqüentemente, melhorando o desenvolvimento da planta (Caballero-Mellado, 2006).

Diferentes rotas metabólicas de biossíntese de ácido indol acético (AIA) já foram identificadas em bactérias (Spaepen et al., 2007). O triptofano é o principal precursor de AIA. A rota de indol-3-acetamida (IAM) é a mais bem caracterizada em bactérias. Nessa rota, o triptofano é convertido em IAM pela enzima triptofano monoxigenase (IaaH), e de IAM em AIA, pela enzima IAM-hidrolase. A enzima triptofano monoxigenase já foi identificada em *Agrobacterium tumefaciens* (Goodner et al., 2001; Wood et al., 2001). A rota indol-3-piruvato (IPyA) é a rota de síntese de AIA predominante nos vegetais. No entanto, esta rota já foi identificada em bactérias como *Bradyrhizobium* (Giraud et al., 2007), onde, pela ação de uma aminotransferase, o triptofano é convertido em indol-3-piruvato. Este composto é descarboxilado, convertendo-se em indol-3-acetaldeído. A descarboxilação ocorre pela ação de indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC). Finalmente, o indol-3-acetaldeído é oxidado a AIA. Outra rota de produção de AIA é a rota da triptamida (TAM) que consiste na transformação de triptofano pela ação da triptofano descarboxilase em TAM, que é diretamente convertida em indol-3-acetaldeído por uma amino-oxidase. A rota TAM ocorre principalmente em plantas, porém a atividade de triptofano descarboxilase foi identificada em *Mesorhizobium loti* (Kaneko et al., 2000). A rota do indol-acetonitrilo (IAN) não está ainda bem definida. É possível que o triptofano seja convertido em indol-3-indoldoxima ou indol-3-

glicobrassicin e estes compostos sejam convertidos em IAN, o qual pode ser convertido diretamente em AIA por ação de uma nitrilase ou transformado em indol-3-acetamida, por ação de uma enzima nitrilo hidratase. Em *Bradyrhizobium japonicum* foi identificada a enzima nitrilase (Kaneko, 2002). Enzimas nitrilo hidratases já foram identificadas em *Rhizobium etli* (Gonzalez et al., 2006), *Rhizobium leguminosarum* (Young et al., 2006), *Bradyrhizobium* sp. (Giraud et al., 2007) e *Sinorhizobium meliloti* (Capela et al., 2001; Galibert et al., 2001).

As citocininas têm recebido pouca atenção por serem compostos lábeis, de difícil identificação e quantificação. Este hormônio promove a divisão celular, o desenvolvimento de raízes e formação de pêlos radiculares (Frankenberger & Arshad, 1995). Mais de 80% dos microrganismos isolados da rizosfera são capazes de produzir compostos do grupo das citocininas, quando cultivados "in vitro" (Barea et al., 1976). Uma estirpe modificada de *R. leguminosarum*, mutante não produtor de adenosina, precursor de citocinina, não promoveu o crescimento de alface e canola quando comparada com a estirpe selvagem, sugerindo que a citocinina está envolvida na promoção do crescimento (Noel et al., 1996).

Os rizóbios também promovem o crescimento de plantas por aumentar a disponibilidade de fósforo solúvel para as plantas. O fósforo é um dos elementos essenciais para os vegetais, absorvido em grandes quantidades, por isso, denominado de macronutriente. No solo, a disponibilidade de fósforo é altamente influenciada pela quantidade e tipos de grupos funcionais da fração argila. Em solos com avançado grau de intemperismo, com elevados teores de óxidos de ferro, como os latossolos, o fósforo solúvel aplicado é rapidamente adsorvido por estes colóides (Sparks et al., 1995). O alto custo dos fosfatos solúveis, aliado à grande demanda deste elemento para as plantas, tem despertado muito interesse em pesquisas com fertilizantes fosfatados alternativos. O uso de fosfatos de baixa solubilidade, associado com inoculação com rizóbios solubilizadores de fosfato é uma alternativa para a liberação gradual do fósforo para as plantas. O microrganismo é capaz produzir ácidos orgânicos, sendo que o próton  $H^+$  ataca o mineral fosfatado. Conseqüentemente, o fósforo inorgânico é liberado do mineral pela substituição do cátion  $Ca^{+2}$  pelo próton  $H^+$ . Algumas estirpes de

*Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti* e *R. loti* foram capazes de liberar o fósforo da hidroxapatita insolúvel (Halder & Chakrabartty, 1993; Rodriguez & Fraga, 1999)

Outra forma de promoção de crescimento de plantas, com as quais algumas estirpes de rizóbios também estão envolvidas, é a proteção de plantas contra o ataque de patógenos. Um exemplo de biocontrole é a produção do antibiótico trifolitoxin (TFX) por *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, no controle de um elevado número de bactérias, incluindo patógenos de plantas e animais (Dobbelaere et al., 2003). Uma pesquisa com inoculação de rizóbios em arroz mostrou que esta prática proporcionou um rápido acúmulo de ácidos fenólicos, como mecanismo de defesa contra o ataque de *Rizoctonia solani* (Mishra et al., 2006). Um trabalho realizado por Dutta et al. (2007) mostrou o potencial de inoculações duplas de uma estirpe de rizóbio, com *Bacillus cereus*, e com *Pseudomonas aeruginosa*, no controle de *Fusarium udum* em guandu.

#### **2.4. Rizóbios promotores de crescimento em arroz**

Em um estudo de microscopia, com uma cultivar nativa de arroz africano (*Oryza breviligulata*), inoculada com uma estirpe de *Bradyrhizobium*, foram distinguidos dois estágios de colonização nas raízes desta planta (Chaintreuil et al., 2000). Inicialmente ocorreu a formação de um biofilme em torno dos ápices radiculares. Esta etapa caracterizou-se por uma rápida multiplicação bacteriana, cobrindo grandes áreas de superfície radicular. Posteriormente ocorreu a invasão intercelular das células epidérmicas, via fissuras radiculares, que se formam em virtude da emergência de raízes secundárias.

A abundância de células de *Sinorhizobium meliloti*, marcadas com o gene da proteína fluorescente *gfp*, em torno dos pontos de conexão entre raízes primárias e secundárias de arroz, foi observada em análises microscópicas (Chi et al., 2005). Estes mesmos autores observaram que as bactérias que penetram nas raízes de arroz seguem pelos espaços intercelulares, colonizando a epiderme (inclusive pêlos radiculares), córtex e tecidos vasculares. Além disso, as células que se disseminam pelo aerênquima e vasos condutores ascendem para o caule e folhas e algumas espécies e

estirpes de rizóbios podem persistir no interior dos tecidos de arroz até as fases reprodutivas da planta.

Há um consenso de que a entrada dos rizóbios em plantas de arroz se dá por aberturas radiculares que ocorrem em função da emissão de raízes secundárias. Este padrão de colonização também foi verificado por outras pesquisas (Reddy et al., 1997; Perrine-Walker et al., 2007). Os últimos autores também observaram curvaturas em pêlos radiculares de plântulas de arroz, em função da inoculação com células de *Rhizobium*, indicando que algumas das rotas de sinalização, envolvendo a formação de nódulos em leguminosas, podem estar presentes também no arroz.

Em arroz, os rizóbios não fixam nitrogênio e nem são capazes de formar nódulos radiculares. No entanto, as íntimas interações da bactéria com o cereal elevam os níveis de fitohormônios nos tecidos, produzindo uma variedade de benefícios, que são refletidos significativamente na fisiologia do crescimento das plantas de arroz (Chi et al., 2005). Estudos vêm demonstrando incrementos no crescimento e no desenvolvimento de plantas de arroz pela inoculação com estirpes de rizóbios. A inoculação com três isolados de rizóbios de *Rhizobium leguminosarum* incrementaram a produção de matéria seca de plantas de seis cultivars de arroz, em tubos de vidro (Yanni et al., 2001). Neste mesmo estudo, porém, em experimentos de campo, outras estirpes foram capazes de aumentar o volume radicular, a matéria seca da parte aérea, o rendimento de grãos de arroz e a eficiência no uso do nitrogênio. Esta eficiência no uso de nitrogênio pode estar relacionada com o aumento do volume radicular e, conseqüentemente, um maior volume de solo explorado pelas raízes. Em um estudo feito na Índia, a altura de plantas de arroz, o número de panículas de arroz, a matéria seca de raízes e da parte aérea, bem como o rendimento de grãos, aumentaram quando as plantas foram inoculadas com estirpes de rizóbios (Mishra et al., 2006).

Os benefícios da inoculação com rizóbios em arroz podem ser manifestados precocemente, desde a germinação e emergência até o rendimento de grãos na lavoura. Algumas estirpes de *Rhizobium* foram capazes de estimular o comprimento da radícula e do prófalo, além de incrementar a área foliar, a matéria seca da parte aérea, a absorção de nitrogênio, o número de panículas e o rendimento de grãos (Biswas et al.,

2000). Incrementos no crescimento de arroz, bem como no rendimento de grãos, pela inoculação com algumas estirpes de rizóbios, também foram observados por Chi et al, (2005). Além disso, estes autores evidenciaram que estas estirpes também incrementaram as taxas de fotossíntese, a condutância estomática, a velocidade de transpiração e a eficiência no uso da água absorvida pela planta de arroz.

## **2.5. Rizóbios em sistema de rotação de arroz irrigado com leguminosas forrageiras hibernais**

No Estado do Rio Grande do Sul, a cultura do arroz irrigado possui uma área superior a um milhão de hectares, o que corresponde a mais de 70% da área cultivada com arroz no Brasil. As áreas de várzeas, onde o arroz é cultivado, concentram-se na Metade Sul deste Estado, onde é muito comum a rotação do cereal com a criação de gado, na entressafra (Marchezan et al., 2002). Neste período, que coincide com o inverno, as precipitações são freqüentes, e o solo, que é de baixa permeabilidade, pode permanecer vários dias com excesso de umidade.

O excesso de água no solo baixa a disponibilidade de oxigênio para a respiração radicular. Nessas condições, a produção de ATP nos tecidos radiculares decai, sendo insuficiente para sustentar a absorção de nutrientes do solo, fundamental para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Taiz & Zeiger, 2004). Algumas espécies de plantas conseguem desenvolver mecanismos de tolerância a períodos de alagamento. Tais mecanismos permitem que as raízes destas plantas obtenham o oxigênio da parte aérea, para que todas as células possam respirar, além de impedirem que o oxigênio seja difundido para fora das raízes (Drew et al, 2000). Uma destas plantas é a leguminosa forrageira *Lotus uliginosus*, que além de tolerar solos alagados, é capaz de realizar simbioses eficientes com rizóbios nestas condições (James & Crawford, 1998; James & Sprent, 1999).

Trabalhos realizados no Egito mostram que rizóbios simbiotes com *Trifolium alexandrinum*, cultivado às margens do Rio Nilo, permanecem no solo e colonizam o arroz, cultivado em rotação. O arroz é beneficiado pelo nitrogênio, fixado durante o ciclo do trevo, e diretamente pelos rizóbios, que colonizam suas raízes, caules e folhas (Yanni et al, 1997; Yanni et al, 2001).

Este sistema de produção, existente há centenas de anos, permitiu o estabelecimento de um equilibrado banco de rizóbios no solo e exemplifica um sistema sustentável de produção agrícola.

A utilização de plantas leguminosas forrageiras, apresentando eficiente simbiose com rizóbios e adaptadas a solos de várzea, pode aumentar a produção de forragem no inverno e disponibilizar nitrogênio para a cultura do arroz em sucessão. Dependendo da produção de matéria verde da forrageira, a adubação de base pode até ser suprimida, necessitando aplicação de nitrogênio apenas em cobertura. Os rizóbios da simbiose com a forrageira permanecem no solo, colonizando as plantas de arroz e beneficiando diretamente a cultura, pela promoção de crescimento. Com o aumento da eficiência do uso do nitrogênio e demais nutrientes, pode haver uma economia no uso de fertilizantes e diminuição das contaminações ambientais nas áreas de várzeas e nos recursos hídricos adjacentes.

### 3. ESTUDO I

#### **Eficiência de rizóbios em *Lotus corniculatus* e *L.uliginosus* sob diferentes condições hídricas e como promotores de crescimento de arroz irrigado.**

##### **Introdução**

Os rizóbios são bactérias muito conhecidas pelos agricultores, devido à capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, quando em simbiose com plantas da família das leguminosas. Na produção animal, os rizóbios apresentam um papel muito importante, pois são simbiontes com forrageiras leguminosas, como as pertencentes dos gêneros *Trifolium* e *Lotus* (Krolow et al., 2004; Assmann et al., 2007). Com a inoculação de rizóbios em leguminosas forrageiras, pode-se substituir parcialmente, ou mesmo totalmente, a adubação nitrogenada, minimizando os custos com fertilizantes e a poluição ambiental.

Além de fixarem nitrogênio em leguminosas, os rizóbios desempenham outros papéis na promoção de crescimento de plantas, beneficiando também a plantas de muitas outras famílias, inclusive gramíneas. Estes outros mecanismos de promoção de crescimento têm despertado a atenção de muitos pesquisadores nos últimos anos. Os rizóbios são capazes de estimular a germinação e o crescimento vegetal (James et al., 2002). Estes estímulos ocorrem devido à capacidade destas bactérias em alterar os níveis hormonais no tecido vegetal (Biswas et al., 2000; Dobbelaere et al., 2003; Ona et al., 2003; Mantelin & Touraine, 2004; Chen et al., 2005; Singh et al., 2005;). Entre os hormônios vegetais produzidos pelos rizóbios, destaca-se o ácido indol acético (AIA), uma auxina envolvida na iniciação radicular, na divisão e no alongamento celular (Banerjee et al., 2006). Os rizóbios podem solubilizar fosfatos no solo, disponibilizando-os para as plantas (Halder & Chakrabarty,

1993; Rodriguez & Fraga, 1999). Ainda, algumas estirpes de rizóbios são capazes de realizar o controle de doenças de plantas (Nautiyal, 1997; Mishra et al., 2006; Dutta et al., 2007). Recentemente, tem sido demonstrado que a inoculação com rizóbios estimula a germinação, o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade do arroz (Biswas et al., 2000; Yanni et al., 2001; James et al., 2002).

Trabalhos realizados no Egito (Yanni et al., 1997; Yanni et al., 2001) mostram que rizóbios simbiotes com *Trifolium alexandrinum*, cultivado às margens do Rio Nilo, permanecem no solo e colonizam o arroz, cultivado em rotação. O arroz é beneficiado pelo nitrogênio, fixado durante o ciclo do trevo, e diretamente pelos rizóbios, que colonizam suas raízes, caules e folhas. Este sistema de produção, existente há centenas de anos, permitiu o estabelecimento de um equilibrado banco de rizóbios no solo, e exemplifica um sistema sustentável de produção agrícola.

No Estado do Rio Grande do Sul, a cultura do arroz se concentra em áreas baixas, de solos hidromórficos, de relevo plano, conhecidas como várzeas, onde este cereal é cultivado sob irrigação por inundação (Marchezan et al., 2002). Em muitas propriedades, o arroz é cultivado em rotação com a criação de bovinos. Na entressafra, que coincide com o inverno, as precipitações são freqüentes e o solo pode permanecer vários dias com excesso de umidade. O excesso de água no solo reduz drasticamente a disponibilidade de oxigênio para a respiração radicular. Em condições anóxicas ou hipóxicas, a produção de ATP nos tecidos radiculares decai, sendo insuficiente para sustentar processos fisiológicos, como a absorção de nutrientes do solo, fundamentais para o crescimento de caules e folhas (Taiz & Zeiger, 2004). Nestas condições, raras são as forrageiras que podem ser estabelecidas nas várzeas, agravando a falta de alimentos para os bovinos, ocasionando perdas de peso e até mesmo mortalidade de animais. Entretanto, trabalhos têm avaliado a produtividade de diferentes espécies de forrageiras em áreas de várzea, bem como a tolerância destas plantas a períodos de alagamento (Haddade et al., 2001; Marchezan et al., 2001). Algumas espécies de plantas conseguem desenvolver habilidades para suportar e tolerar períodos de alagamento. Os mecanismos de tolerância à inundação permitem que as raízes destas plantas consigam receber oxigênio, oriundo da parte aérea, para



que todas as células possam respirar, além de impedirem que o oxigênio seja difundido para fora das raízes (Drew et al., 2000).

Estudos sobre introdução de espécies forrageiras têm destacado nas plantas pertencentes ao gênero *Lotus*, o seu potencial forrageiro, sua boa adaptação a solos de baixa fertilidade, sua capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio e seu elevado teor de taninos, o que evita a ocorrência de timpanismo nos animais (Montes, 1988; Langer, 1990). A espécie *Lotus corniculatus* L. é uma leguminosa forrageira perene hiberno-primaveril, de origem européia e mediterrânea (Soster et al., 2004), com excelente adaptação no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile, sendo largamente utilizada. Essa espécie é caracterizada pelo rápido crescimento inicial, boa produtividade, elevada qualidade de forragem e boa ressemeadura natural.

A espécie de *Lotus uliginosus* (*L. pedunculatus*) é uma espécie leguminosa perene estival, rizomatosa, originária do Mediterrâneo. É mais tolerante a solos ácidos e deficientes em fósforo, com elevada capacidade de estabelecimento em áreas úmidas (Paim & Riboldi, 1991). Alguns trabalhos (James & Crawford, 1998; James & Sprent, 1999) têm mostrado que as plantas de *Lotus* apresentam tolerância ao alagamento. Segundo estes autores, os mecanismos de tolerância são as formações de aerênquimas e lenticelas, que permitem as trocas gasosas das raízes e caules submersos. As plantas de *Lotus uliginosus* podem formar nódulos eficientes na fixação de nitrogênio, tanto em raízes submersas, quanto em raízes adventícias oriundas de hipocótilos ou caules submersos (James & Crawford, 1998). Estes autores demonstraram que a nodulação e atividade da nitrogenase (estimada pela redução de acetileno) em condições de inundação, são iguais, ou até mesmo maiores do que em condições de umidade adequada para as plantas.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a resistência da simbiose entre rizóbios e plantas de *Lotus corniculatus* e *L. uliginosus* em situações de estresse hídrico como alagamento e deficiência hídrica e avaliar a eficiência destes mesmos rizóbios em promover o crescimento de plantas de arroz.

### **Material e Métodos**

Foram realizados dois experimentos na casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As

unidades experimentais constituíram-se de vasos de polietileno, contendo 2 kg de solo, peneirado em malha de 20 mm. O solo utilizado foi coletado na camada de 0 a 20 cm em área de várzea com pastagem nativa no município de Caçapava do Sul. O solo, antes de ser acondicionado nos vasos, foi misturado com super fosfato simples e cloreto de potássio, equivalendo a 45 e 25 mg kg<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e K<sub>2</sub>O, respectivamente, de acordo com o manual de recomendação de calagem e adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CQFS, 2004), considerando densidade do solo igual a um (1). Para ambos o experimentos, o delineamento empregado foi inteiramente casualizado, com três repetições. Os rizóbios utilizados foram a estirpe U512, recomendada oficialmente para *Lotus* no Uruguai, e os isolados UFRGS-Lc340, obtido de solo do município de Hulha Negra, RS (Frizzo, 2007); UFRGS-Lc247, isolado de solo de Eldorado do Sul, RS (Frizzo, 2007); EEL698 e EEL8084, do município de Lages, SC (Brose, 1992).

No primeiro experimento, foram cultivadas plantas de *Lotus corniculatus*, variedade São Gabriel e *L. uliginosus*, variedade Maku, em três níveis de umidade do solo (alagado, umidade adequada e deficiência hídrica). A irrigação foi realizada com água destilada. Nos vasos submetidos ao alagamento, a água era repostada diariamente, mantendo-se o nível de 5 cm acima no nível do solo, a partir do 15º dia após a semeadura. Nos tratamentos em que se considerou a umidade adequada, eram adicionados diariamente 200 mL de água, sendo que, como os vasos eram perfudados no fundo, o exesso de água era drenado. Nos tratamentos sob condição de deficiência hídrica, aplicava-se 100 mL de água quando as plantas apresentavam-se murchas. As plantas de *L. corniculatus* foram inoculadas com os rizóbios U512, EEL698 e EEL8084 e as de *L. uliginosus* com U512, UFRGS-Lc340 e UFRGS-Lc247. Para cada espécie e nível de umidade, foram utilizados dois tratamentos controles, sem inoculação, um com aplicação de nitrogênio (T+N) e outro sem (T-N). Nos controles com nitrogênio, foi adicionada solução de uréia (760 mg L<sup>-1</sup>) aplicando-se o equivalente a 100 kg de nitrogênio por hectare, quatro vezes, a cada 45 dias.

As sementes de *Lotus* foram tratadas para quebra de dormência, com o uso de lixas, desinfestadas e pré-germinadas em estufa a 28°C por 24

horas. Dez sementes pré-germinadas foram plantadas em cada vaso e posteriormente desbastadas, deixando-se quatro plantas por vaso.

A inoculação foi realizada sete dias após o plantio com 5 mL de caldo de cultura dos rizóbios, crescidos em 30 mL de meio levedura manitol líquido (YM) por 5 dias, sob agitação constante a 28°C. As plantas foram cortadas 5 cm acima da superfície do solo, aos 45, 97, 147 e 205 dias após o plantio. A parte aérea foi seca em estufa a 65°C por 72 horas e pesada em balança digital. A determinação do teor de nitrogênio total no tecido foi realizada de acordo com Tedesco et al. (1995). Após cada corte, a aplicação de nitrogênio foi repetida nos tratamentos controle e, após o segundo corte, foi reaplicada a metade da dose inicial de fósforo e potássio em todos os vasos. Os resultados foram submetidos à análise da variância e, quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro utilizando-se o programa Sysvar 4.6 (Ferreira, 2000). Também foi determinada a eficiência relativa da fixação de nitrogênio pelos rizóbios, utilizando-se o método de Brockwell et al. (1966).

No segundo experimento, em outros vasos, contendo solo, coletado e acondicionado da mesma forma que no primeiro experimento, foram cultivadas plantas de arroz da cultivar IRGA424, lançada recentemente para todas as regiões do Rio Grande do Sul e que se destaca pela alta produtividade e qualidade industrial de grãos, além de apresentar tolerância à toxidez por ferro e resistência à bruzone (Sosbai, 2007). As sementes de arroz foram desinfestadas e pré-germinadas em estufa a 28°C por 24 horas. Antes da semeadura, as sementes foram imersas por 10 a 15 minutos em caldo contendo os mesmos rizóbios do experimento anterior, com exceção dos tratamentos controle onde as sementes foram imersas em água destilada esterilizada. Utilizaram-se dois tratamentos controle não inoculados, um com adição de nitrogênio, equivalente a 40 kg ha<sup>-1</sup>, e outro com adição de 80 kg ha<sup>-1</sup>. Todos os tratamentos inoculados receberam aplicação de nitrogênio equivalente a 40 kg ha<sup>-1</sup>. A adubação nitrogenada foi parcelada em duas aplicações, na forma de solução de uréia. A metade da dose de nitrogênio foi aplicada 10 dias após a semeadura e a outra metade aos 30 dias após a semeadura. Junto com a primeira aplicação foi realizado o desbaste deixando-se duas plantas por vaso e, daí em diante, os vasos foram mantidos alagados,

sendo a água repostada periodicamente, mantendo-se o nível de 5 cm acima da superfície do solo. O número de perfilhos emitidos e a matéria seca da parte aérea foram avaliados 60 dias após a semeadura. Para a determinação da matéria seca da parte aérea, as plantas foram cortadas rente ao solo e secas em estufa a 65 °C até peso constante. Os resultados foram submetidos à análise da variância e, quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott com 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o software Sysvar 4.6 (Ferreira, 2000). Determinou-se também a eficiência relativa da inoculação dos rizóbios no crescimento da parte aérea das plantas de arroz, utilizando-se o método de Brockwell et al. (1966), modificado. Para determinar este parâmetro, utilizaram-se as matérias secas da parte aérea produzidas pela inoculação com o rizóbio e dos tratamentos controle. O valor foi obtido pelo quociente entre a diferença entre o tratamento inoculado ( $MSPA_{inoculação}$ ) e o controle com 40 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio ( $MSPA_{40N}$ ) e a diferença entre o controle com 80 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio ( $MSPA_{80N}$ ) e o controle com 40 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio ( $MSPA_{40N}$ ), de acordo com a equação 1.

$$Eficiência\ relativa\ (\%) = \left( \frac{MSPA_{inoculação} - MSPA_{40N}}{MSPA_{80N} - MSPA_{40N}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

### Resultados e Discussão

As plantas de *Lotus corniculatus* foram severamente afetadas pelo alagamento dos vasos (Tabela 3.1). No tratamento com o alagamento, as plantas foram mantidas em condições adequadas de umidade até o 15º dia após o plantio das sementes pré-germinadas. A partir de então as plantas de *L. corniculatus* começaram a sofrer o efeito da deficiência de oxigênio. Apenas, no primeiro e no segundo corte houve produção de matéria seca. A massa vegetal coletada no primeiro corte deve, em parte, ter sido produzida no período em que as plantas não sofreram os efeitos do alagamento. Por outro lado, as plantas não conseguiram se desenvolver novamente a partir do segundo corte, provavelmente devido à redução da disponibilidade de oxigênio que pode afetar as plantas de diversas maneiras (Taiz & Zeiger, 2000). Em situação hídrica adequada, as plantas de *L. corniculatus* cresceram satisfatoriamente.

**TABELA 3.1. Matéria seca da parte aérea de plantas de *Lotus corniculatus*, inoculadas com rizóbios, em três condições de umidade do solo.**

Rizóbio/ tratamento	Matéria seca da parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )				
	Corte 1	Corte 2	Corte 3	Corte 4	Total
.....Alagamento.....					
U512	0,095 <sup>ns</sup>	0,075 b*	0,000 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,169 b
EEL 698	0,108	0,062 b	0,000	0,000	0,170 b
EEL8084	0,134	0,089 b	0,000	0,000	0,223 b
T-N	0,106	0,151 b	0,004	0,000	0,261 b
T+N	0,117	0,270 a	0,039	0,000	0,426 a
CV	32,31	32,89	30,03	0	24,13
.....Condição adequada.....					
U512	0,667 <sup>ns</sup>	1,327 b	0,872 a	0,605 a	3,471 b
EEL 698	0,598	1,291 b	1,047 a	0,750 a	3,686 b
EEL8084	0,711	0,997 c	0,981 a	0,808 a	3,497 b
T-N	0,595	0,392 d	0,203 b	0,121 b	1,310 c
T+N	0,765	1,779 a	1,227 a	0,673 a	4,443 a
CV	20,16	10,78	13,93	20,51	6,80
.....Deficiência hídrica.....					
U512	0,172 <sup>ns</sup>	0,769 c	0,304 c	0,096 b	1,342 d
EEL 698	0,161	1,335 a	0,430 b	0,235 a	2,162 b
EEL8084	0,170	0,941 b	0,421 b	0,183 a	1,714 c
T-N	0,252	1,063 b	0,266 c	0,086 b	1,667 c
T+N	0,246	1,449 a	0,802 a	0,254 a	2,750 a
CV	27,62	8,51	11,15	31,19	8,09

\* médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade de erro; \*\*diferenças não significativas a 5% de probabilidade de erro.

A partir do segundo corte, as plantas dos tratamentos inoculados e do tratamento controle, que recebeu nitrogênio (T+N), passaram a produzir mais matéria seca que as do tratamento controle sem nitrogênio (T-N). Até o primeiro corte, possivelmente, o nitrogênio remanescente do solo tenha suprido as exigências do tratamento controle (T-N), não havendo diferenças entre os tratamentos. Em condições de deficiência hídrica, apenas a inoculação com o isolado EEL698 aumentou a produção de matéria seca da parte aérea das plantas de *L. corniculatus*, ao longo do período de experimento (Tabela 3.1).

As plantas de *Lotus uliginosus* apresentaram tolerância a condições de alagamento, concordando com os resultados obtidos por James & Crawford (1998) e James & Sprent (1999), que apontam a espécie *L. uliginosus* como tolerante ao alagamento. Por outro lado, nenhum dos rizóbios testados foi eficiente em aumentar o crescimento da parte aérea das plantas desta espécie, nesta condição hídrica (Tabela 3.2).

O isolado UFRGS-Lc340 proporcionou um aumento de 96% no crescimento da parte aérea de *L. uliginosus* em condições adequadas de umidade no solo. No entanto, as plantas inoculadas com a estirpe U512 e com o isolado UFRGS-Lc247 não diferiram das do tratamento controle sem nitrogênio. Em condições de deficiência hídrica, no quarto e último corte da parte aérea, o isolado UFRGS-Lc340 proporcionou uma maior produção de matéria seca (Tabela 3.2). No entanto, ao somar-se a matéria seca de *L. uliginosus*, coletada em todos os cortes, em condições de déficit hídrico, nenhum isolado diferenciou-se do controle sem nitrogênio (T-N).

Nos tratamentos com aplicação de nitrogênio no solo, as plantas cresceram significativamente mais do que as dos demais tratamentos, em cada nível de estresse hídrico (Tabelas 3.1 e 3.2). É possível que o suprimento de nitrogênio para as plantas permita melhorar a tolerância ao estresse hídrico.

**TABELA 3.2. Matéria seca da parte aérea de plantas de *Lotus uliginosus*, inoculadas com rizóbios, em três condições de umidade do solo.**

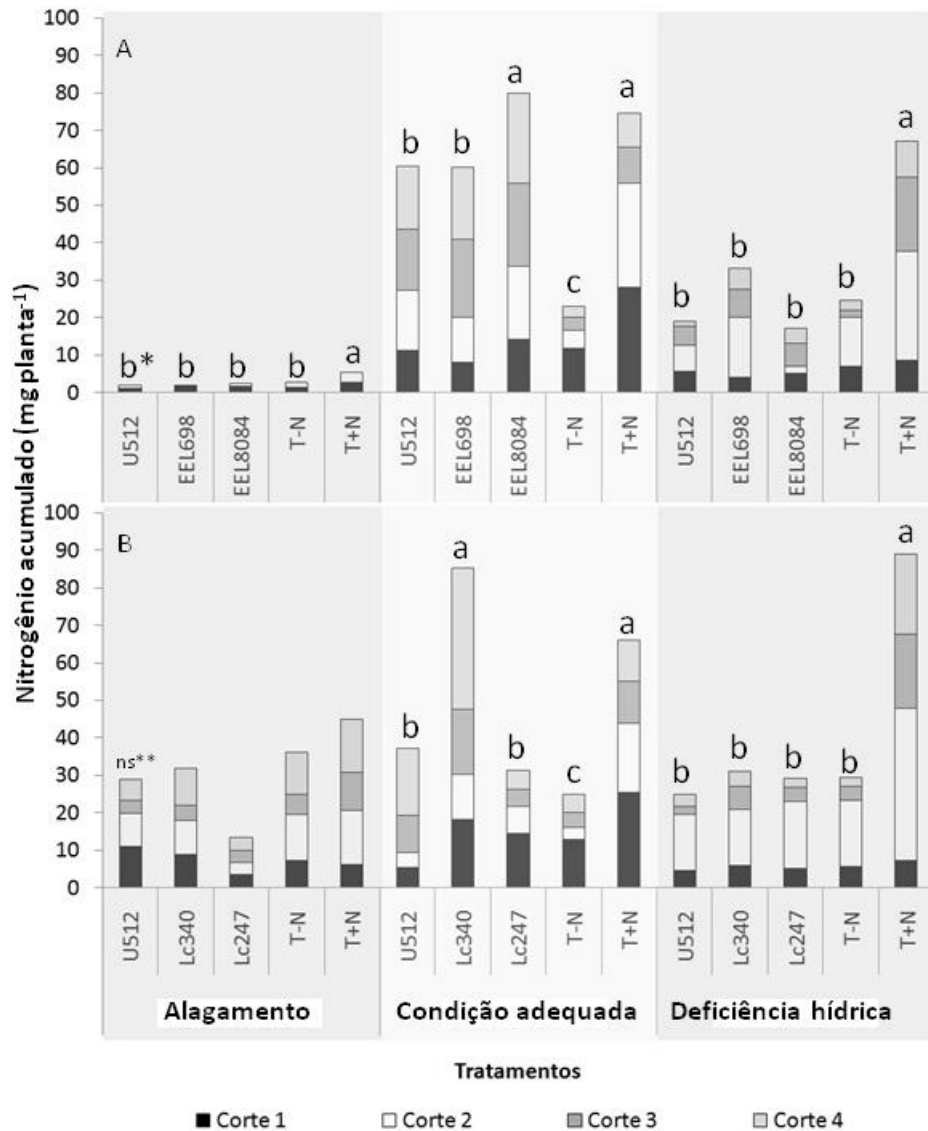
Rizóbio/ tratamento	Matéria seca da parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )				
	Corte 1	Corte 2	Corte 3	Corte 4	Total
.....Alagamento.....					
U512	0,784 a*	0,512 b	0,278 b	0,208 b	1,783 b
Lc340	0,377 b	0,369 b	0,369 b	1,300 a	2,415 b
Lc247	0,403 b	0,685 b	0,368 b	0,198 b	1,652 b
T-N	0,379 b	0,843 b	0,500 b	0,138 b	1,860 b
T+N	0,238 b	1,479 a	1,330 a	1,039 a	4,087 a
CV	38,86	26,45	34,30	64,53	22,41
.....Condição adequada .....					
U512	0,595 <sup>ns</sup>	0,609 b	0,398 c	0,592 b	2,193 c
Lc340	0,834	0,656 b	0,643 b	0,982 a	3,115 b
Lc247	0,643	0,490 b	0,312 c	0,296 c	1,741 c
T-N	0,552	0,472 b	0,308 c	0,255 c	1,586 c
T+N	0,822	1,534 a	0,825 a	0,625 b	3,806 a
CV	23,55	21,81	17,68	23,08	13,65
.....Deficiência hídrica.....					
U512	0,122 b	0,958 b	0,204 b	0,145 c	1,428 b
Lc340	0,110 b	0,972 b	0,295 b	0,368 b	1,746 b
Lc247	0,159 a	0,872 b	0,308 b	0,150 c	1,490 b
T-N	0,190 a	0,867 b	0,269 b	0,157 c	1,483 b
T+N	0,193 a	1,254 a	0,741 a	0,775 a	2,962 a
CV	16,03	12,12	14,97	14,24	9,79

\* médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade de erro; \*\*diferenças não significativas a 5% de probabilidade de erro.

Devido ao crescimento reduzido da parte aérea das plantas de *L. corniculatus* sob inundação, a quantidade de nitrogênio acumulada por planta foi muito pequena, embora se observe uma diferença entre o tratamento com nitrogênio e os demais (Figura 3.1A). Observa-se também que a quantidade de nitrogênio acumulada em cada planta de *L. corniculatus* inoculada com os rizóbios, em condições adequadas de umidade (Figura 3.1A), foi superior à acumulada pela que não foi inoculada, nem recebeu adubação nitrogenada. Além disso, a quantidade de nitrogênio absorvido e acumulado pelas plantas de *L. corniculatus* não diferiu entre o tratamento inoculado com EEL8084 e o tratamento que recebeu o equivalente a 100 kg de nitrogênio por hectare. Quando a disponibilidade de água foi limitante, o controle T+N foi superior aos demais no acúmulo de nitrogênio por planta de *L. corniculatus*.

O isolado UFRGS-Lc340 se destacou, favorecendo o acúmulo de nitrogênio total na parte aérea de *L. uliginosus* (Figura 3.1B) em condição adequada de umidade. Este rizóbio foi capaz de incrementar a quantidade de N total nesta espécie e a quantidade acumulada foi equivalente ao tratamento que recebeu o equivalente a 100 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio. Nesta mesma condição hídrica, os rizóbios U512 e UFRGS-Lc340 também proporcionaram incrementos no acúmulo de nitrogênio por planta de *L. uliginosus*.



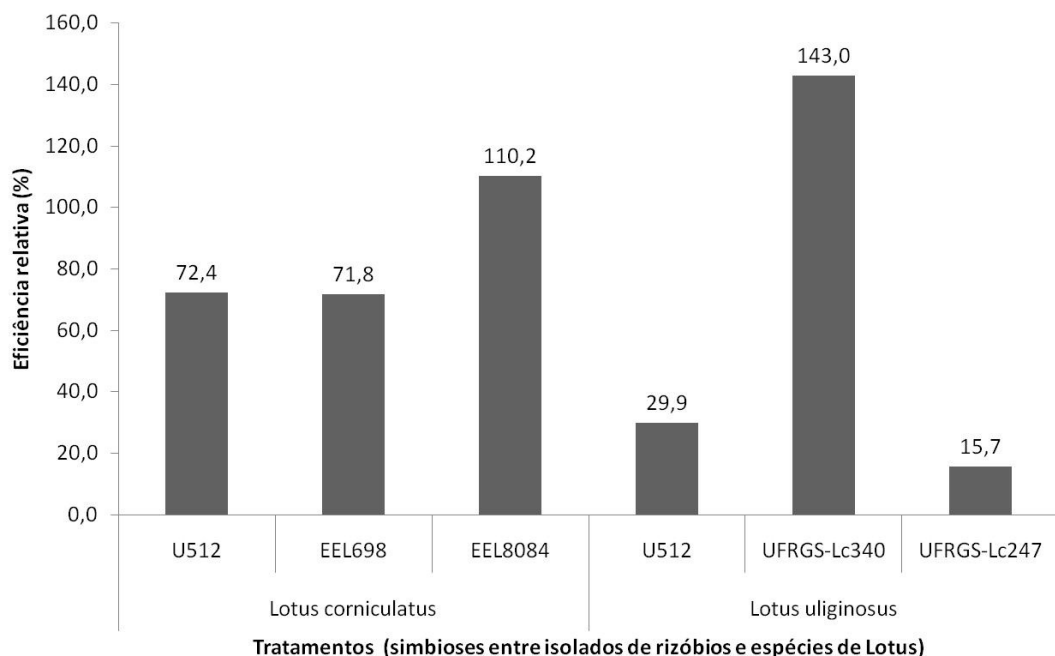


**FIGURA 3.1. Nitrogênio total acumulado na parte aérea de plantas de *Lotus corniculatus* (A) e *Lotus uliginosus* (B), inoculadas com isolados de rizóbios e submetidas a três níveis de umidade do solo (\*médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade de erro; \*\*diferenças não significativas a 5% de probabilidade de erro)**

Em situações de estresse hídrico, seja alagamento ou deficiência hídrica, nenhum dos isolados apresentou eficiência relativa em ambas as espécies de *Lotus* estudadas. No entanto, mesmo não sendo comprovada eficiência relativa, em condições de alagamento, todas as plantas de *L. uliginosus*, que foram inoculadas com rizóbios, apresentaram desenvolvimento de nódulos, inclusive em raízes adventícias, sobre a lâmina de água.

Resultados similares foram obtidos por James & Crawford (1998), em que plantas desta espécie formaram nódulos eficientes na fixação de nitrogênio em raízes adventícias oriundas de hipocótilos e caules submersos. Em um trabalho realizado com plantas de soja cultivadas sob alagamento, Pires et al. (2002) observaram que as raízes estavam noduladas e que os caules apresentavam diâmetro superior a plantas cultivadas em condições adequadas de umidade, em função do desenvolvimento de aerênquima.

Embora a produção de matéria seca da parte aérea de *L. corniculatus* em simbiose com rizóbios tenha sido inferior ao proporcionado pela adubação nitrogenada, os três isolados testados apresentaram eficiência na fixação de nitrogênio superior a 71%, em condições adequadas de umidade (Figura 3.2). O isolado EEL8084 apresentou eficiência relativa de 110%, sendo mais eficiente na simbiose com as plantas de *L. corniculatus*, que a estirpe U512, recomendada oficialmente para esta espécie, no Uruguai. Esta estirpe oficial apresentou uma baixa eficiência relativa (29,9%) em plantas de *L. uliginosus*. No entanto, com esta espécie, o isolado UFRGS-Lc340 apresentou uma eficiência superior de 143%, em condições adequadas de umidade.



**FIGURA 3.2. Eficiência relativa das simbioses entre rizóbios e plantas de *Lotus corniculatus* e *Lotus uliginosus* em condições adequadas de umidade.**

Os resultados desse trabalho mostram o potencial das plantas de *L. uliginosus* para serem utilizadas como forrageiras em áreas de várzeas, onde, no inverno, são comuns períodos de alagamento. No Rio Grande do Sul, o arroz é cultivado nessas áreas, em sistema de irrigação por inundação. Pelo desempenho que a espécie *L. uliginosus* mostrou nesse estudo, essa apresenta potencial também para ser usada como cultura de cobertura em rotação com o arroz, beneficiando a gramínea com nitrogênio fixado biologicamente. Além disso, os rizóbios simbiotes com *L. uliginosus* podem permanecer no solo e colonizar as plantas de arroz. O isolado UFRGS-Lc340 apresentou bom desempenho em condições adequadas de umidade (eficiência superior a 140%), e mesmo não sendo eficiente em aumentar o acúmulo de nitrogênio, foi capaz de formar nódulos nas raízes adventícias, sobre a lamina de água. Como se observa na tabela 3.3, o rizóbio UFRGS-Lc340, assim como os outros isolados testados, estimulou o crescimento da parte aérea da cultivar de arroz IRGA 424.

**TABELA 3.3. Perfilhamento, produção de matéria seca da parte aérea e eficiência relativa em arroz (cultivar IRGA 424) em função da inoculação com rizóbios.**

Tratamento/rizóbio	Perfilhamento	Matéria seca da parte aérea	Eficiência relativa**
	(perfilhos planta <sup>-1</sup> )	(g planta <sup>-1</sup> )	(%)
U512	12,0 b*	1,553 b	38,0
UFRGS-Lc247	10,3 b	1,476 b	25,9
UFRGS-Lc340	12,5 b	1,602 b	45,8
EEL698	15,5 a	1,558 b	38,7
EEL8084	11,5 b	1,649 b	53,1
Controle 40 kg N ha <sup>-1</sup>	10,5 b	1,312 c	-
Controle 80 kg N ha <sup>-1</sup>	10,7 b	1,946 a	-
CV	5,87	9,47	-

\* médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade de erro; \*\* método modificado de BROCKWELL et al (1966).

O isolado UFRGS-Lc340 apresentou uma eficiência de 45,8% (Tabela 3.3). Isso significa que, apenas com a inoculação desta bactéria, as plantas de arroz cresceram mais que o tratamento que não foi inoculado. O mecanismo responsável por esta promoção de crescimento em arroz, possivelmente, seja a produção de hormônios vegetais, como o ácido indol acético. Este hormônio estimula o crescimento radicular, melhorando a nutrição da planta e o crescimento vegetal (Tien et al., 1979; Yanni et al., 1997; Biswas et al., 2000; Matiru & Dakora, 2004) O isolado EEL698 destacou-se em estimular o perfilhamento das plantas de arroz (Tabela 3). Se bem nutridos, durante o ciclo da cultura, cada perfilho será responsável por uma panícula, assim como a planta mãe (SOSBAI, 2007). Logo, a inoculação com rizóbios pode aumentar o número de panículas por área, e conseqüentemente, a produtividade do arroz, ou manter a produtividade com a diminuição da adubação nitrogenada.

### **Conclusões**

- As plantas de *Lotus corniculatus* (variedade São Gabriel) não resistem ao alagamento, mas em condições adequadas de umidade apresentam simbiose eficiente com todos os rizóbios testados e, em deficiência hídrica, apenas com o isolado EEL698;

- As plantas de *L. uliginosus* (variedade Maku) resistem ao alagamento, porém não formam simbiose eficiente com os rizóbios testados nesta condição de umidade. Entre os rizóbios testados em condição adequada de umidade, apenas o rizóbio UFRGS-LC340 forma simbiose eficiente com as plantas desta variedade;

- Todos os isolados testados nas leguminosas são capazes de estimular o crescimento da parte aérea de plantas de arroz. Apenas o isolado EEL698 estimula a emissão de perfilhos de arroz.

## Referências

- ASSMANN, T. S.; ASSMANN, A. L.; SOARES, A. B.; CASSOL, L. C.; GIASSON, M.S.; GIASSON, N. F. Fixação biológica de nitrogênio por plantas de trevo (*Trifolium* spp) em sistema de integração lavoura-pecuária no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.5, p.1435-1442, 2007.
- BANERJEE, M. R.; YESMIN, L.; VESSEY, J. K. Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. In. RAI, M.K. (Ed), **Handbook of Microbial Biofertilizers**. Food Products Press®, Nova York, p.137-181, 2006.
- BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B; YANNI, Y. G.; ROLFE, B.G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, v.92, n.5. p.880-886, 2000.
- 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 Agricultural and Animal Husbandry**, v.6, n.23, p.365-370, 1966.
- BROSE, E. Seleção de rizóbio para *Lotus pedunculatus* em solo ácido. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.27, n.3. p.409-415, 1992.
- CQFS - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Núcleo Regional Sul. 10ed, 400p. Porto Alegre, 2004.
- CHEN, X.; FENG, J.; HOU, B.; LI, F.; LI, Q.; HONG, G. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Res**, v.33, n.8, p. 2540-2548, 2005.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, n.2, p.107-149, 2003.
- DREW, M. C.; HE, C. J.; MORGAN, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in Plant Science**, v.5, n.3. p.123-127, 2000.
- DUTTA, S.; MISHRA, A.K.; DILEEP KUMAR, B.K. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**. doi:10.1016/j.soilbio.2007.09.009, 2007.
- FRIZZO, M. L. S. **Isolamento de rizóbios nativos para *Lotus corniculatus* e *L. uliginosus* em solos do Rio Grande do Sul**. 2007. 68 f. (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- FERREIRA, D. F. **Manual do sistema SISVAR para análises estatísticas**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000. 66p.
- HADDADE, I.R.; OBEID, J.A.; FONSECA, D.M.; PEREIRA, O.G.; SILVA, M.A.P. Crescimento de espécies forrageiras tropicais submetida a diferentes períodos de alagamento. **Revista**

**Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.5, p.1924-1930, 2002.

HALDER, A. K.; CHAKRABARTTY, P. K. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. **Folia Microbiologica**, v.38, n.4, p.325–330, 1993.

JAMES, E. K.; CRAWFORD, R. M. M. Effect of oxygen availability on nitrogen fixation by two *Lotus* species under flooded conditions. **Journal of Experimental Botany**, v.49, n.320, p.599-609, 1998.

JAMES, E. K.; SPRENT, J.I. Development of N<sub>2</sub>-fixing nodules on the wetland legume *Lotus uliginosus* exposed to conditions of flooding. **New Phytologist**, v.142, n.2, p.219-231, 1999.

KROLOW, R. H.; MISTURA, C.; COELHO, R. W. Effect of phosphorus and potassium on development and nodulation of three cool season annual legumes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.2224-2230, 2004.

LANGER, R.H.M. Pastures Plants. *In*: R.H.M. Langer (Ed.) Pastures: **Their ecology and management**. Okford University Press, Auckland, Australia, 1990.

MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.394, p.27-34, 2004.

MARCHEZAN, E.; VIZZOTTO, V.R.; ROCHA, M.G.; MOOJEN, E.L.; SILVA, J.H.S. Produção animal em várzea sistematizada cultivada com forrageiras de estação fria submetidas a diferentes níveis de adubação. **Ciência Rural**, v.32, n.2, 303-308, 2002.

MATIRU, V. N.; DAKORA, F. D. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in land races of African cereal crops. **African Journal of Biotechnology**, v.3, n.1, p.1–7, 2004.

MISHRA, R. P. N.; SINGH, R. K.; JAISWAL, H. K.; KUMAR, V.; MAURYA, S. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, v. 52, n.5, p.383–389, 2006.

MONTES, L.. *Lotus tenuis*. **Revista Argentina de Producción Animal**, v.8. p. 367-376, 1988.

NAUTIYAL, C. S. Rhizosphere competence of *Pseudomonas* sp. NBRI9926 and *Rhizobium* sp. NBRI9513 involved in the suppression of chick pea (*Cicer arietinum* L.) pathogenic fungi. **FEMS Microbial Ecology**, v. 23, n.2, p.145–158, 1997.

ONA, O.; IMPE, J. V.; PRINSEN, E.; VANDERLEYDEN, J. Growth and índole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, n.1, p.125–132, 2005.

PAIM, N.R.; RIBOLDI, J. Comparação entre espécies e cultivares do gênero *Lotus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26. n.10, p.1699-1704, 1991.

PIRES, J. L. F.; SOPRANO, E.; CASSOL, B. Adaptações morfológicas da soja em solo inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.37, n.1, p.41-50, 2002.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, n.4-5, p.319-339, 1999.

SINGH, R. K.; MISHRA, R. P. N.; JAISWAL, H. K. Can rhizobial inoculation promote rice growth through nitrogen fixation? **Institute Rice Research Notes**, v.30, p.28–29, 2005

SOSBAI - SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. Arroz Irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. **In Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado**. 5ª Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. Pelotas, 2007.

SOSTER, M. T. B.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; DALL'AGNOL, M.; BRUSTOLIN, R.; FONTANELI, R.S. Caracterização agrônômica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.33, n.6, p.1662-1671, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3 Ed. ArtMed Editora, 2004.

TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 215p. (Boletim Técnico, 5).

TIEN, T.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.5, p.1016–1024, 1979.

YANNI, Y.G.; RIZK, E.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.G.; DE BRUIJN, F.J.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T.M.; MATEOS, P.F.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, v.194, n.1-2, p.99–114, 1997.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; ABD EL-FATTAH, F.K.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJN, F.; REDEMAKER, J.; MAYA-FLORES, J.; OSTROM, P.; VEGA-HERNANDEZ, M.; HOLLINGSWORTH, R.I.; MARTINEZ-MOLINA, E.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; MATEOS, P.F.; VELASQUEZ, E.; TRIPLETT, E.; UMALI-GARCIA, M.; ANARNA, J.A.; ROLFE, B.G.; LADHA, J.K.; HILL, J.; MUJOO, R.; NG, P.K.; DAZZO, F.B. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* with rice roots. **Australian Journal Plant of Physiology**, v.28, n.9, p.845-870, 2001.

## 4. ESTUDO II

### Respostas de cultivares de arroz à inoculação com rizóbios nativos do sul do Brasil

#### Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos principais cereais produzidos no mundo e de grande importância por ser a base alimentar de metade da população humana. Com o aumento da população mundial, a demanda deste cereal no mundo está aumentando. Estima-se que até o ano 2025, a demanda por arroz cresça cerca de 25% (IRRI, 2008).

Experimentos têm demonstrado que rotações de culturas entre leguminosas e arroz podem ser capazes de incrementar a produção deste cereal. Isso porque as plantas de arroz são capazes de estabelecer uma efetiva associação com bactérias promotoras de crescimento, incluindo estirpes de rizóbios. Estas associações permitem aumentos de produção, pois os rizóbios estimulam a germinação e o crescimento das plantas de arroz (Biswas et al., 2000; Yanni et al., 1997; James et al., 2002).

As bactérias de solo do gênero *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Alorhizobium*, além de *Blastobacter*, *Devosia*, *Methylobacterium* e *Ochrobactrum*, coletivamente chamados de rizóbios, são capazes de formar nódulos em plantas leguminosas e fixar o nitrogênio atmosférico para os tecidos vegetais. Embora o benefício dos rizóbios em leguminosas, em termos de fixação de nitrogênio, seja bem documentado (Werner, 1992), recentes resultados (Hoflich et al., 1995; Chabot et al., 1996; Noel et al., 1996; Yanni et al., 1997; Antoun et al., 1998; Biswas et al., 2000; Chaintreuil et al., 2000; Gutierrez-Zamora & Martinez-Romero, 2001;



Matiru & Dakora, 2004; Singh et al., 2005; Singh et al, 2006; Perrine-Walker et al, 2007) indicam que os rizóbios estabelecem associações endofíticas com milho, sorgo, milheto, canola, alface, mostarda, arroz, cevada e trigo, e trazem benefícios para estas.

Detalhes da interação entre rizóbios e não-leguminosas ainda são pouco entendidos (Mishra et al., 2006). Alguns autores têm descrito os benefícios indiretos da fixação biológica de nitrogênio pelos rizóbios em sistemas de rotação de culturas entre leguminosas e arroz (Yanni et al., 1997; Yanni et al, 2001). Os benefícios diretos podem estar associados com o aumento do número e do comprimento de raízes laterais e pêlos radiculares, e, conseqüentemente, com a absorção de nutrientes (Tien et al., 1979; Yanni et al., 1997; Biswas et al., 2000; Matiru & Dakora, 2004). Esta promoção de crescimento possivelmente esteja relacionada com a produção de fitohormônios pelas bactérias, como o ácido indol acético (AIA) (Lippmann et al., 1995; Chabot et al., 1996; Biswas et al., 2000; Dobbelaere et al., 2003; Ona et al., 2003; Mantelin & Touraine, 2004; Chen et al., 2005; Singh et al., 2005; Banerjee et al., 2006), inibição do crescimento de fungos patogênicos (Nautiyal, 1997; Mishra et al., 2006; Dutta et al., 2007); maior eficiência no uso de nitrogênio e outros nutrientes (Chabot et al., 1996; Yanni et al., 1997; Biswas et al., 2000); solubilização de fosfato (Halder & Chakrabarty, 1993; Rodriguez & Fraga, 1999), antibiose contra fitopatógenos e ativação de sistemas de resistência a doenças (Neilands & Leong, 1986).

Em arroz, a associação com bactérias diazotróficas tem sido verificada especialmente em cultivares primitivas (Barraquio et al., 1997). Pela falta de conhecimento, a interação entre as plantas e bactérias promotoras de crescimento não foi levada em consideração nos processos de melhoramento vegetal, e os genótipos de arroz, utilizados na atualidade, provavelmente sejam menos responsivos à associação com tais bactérias. Recentemente, os trabalhos têm buscado genótipos que interajam melhor com os microrganismos benéficos (Verma et al., 2001). Um estudo, com seis cultivares de arroz, mostrou que todos os isolados testados incrementaram a produção de matéria seca da parte aérea de plantas cultivadas em tubos com solução nutritiva esterilizada. No entanto, estas respostas foram diferenciadas entre as cultivares (Yanni et al., 2001). Outros estudos têm demonstrado que a

habilidade na promoção de crescimento de algumas bactérias pode ser específica para cada espécie, cultivar ou variação genética (Nowak, 1998). Mesmo assim, ainda há uma carência de trabalhos que mostrem a interação dos rizóbios com diferentes genótipos de arroz e não se sabe se as cultivares de arroz utilizadas no Estado do Rio Grande do Sul respondem à inoculação com rizóbios, e ainda, em que proporção.

O objetivo deste trabalho é avaliar a promoção de crescimento de quatro cultivares de arroz por seis estirpes de rizóbios, nodulantes em plantas do gênero *Lotus* e *Trifolium*, isolados de diferentes solos do sul do Brasil.

### **Material e Métodos**

Quatro cultivares de arroz – IRGA 409, IRGA 417, IRGA 422CL e IRGA 424 foram utilizadas. A cultivar IRGA 409 é muito utilizada pelos agricultores porque apresenta resistência à brusone, doença causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc = *Magnaporthe grisea* Barr., e tolerância à toxidez por ferro. A cultivar IRGA 417 apresenta alta precocidade, alta produtividade, elevada qualidade de grãos e alto vigor inicial das plântulas, além de ser bem adaptada a todas as regiões de cultivo de arroz do Rio Grande do Sul. A cultivar IRGA 422CL é muito utilizada por apresentar resistência ao herbicida Only® (imazethapyr + imazapic), num sistema de produção que permite o controle de arroz vermelho (*Oryza sativa*). A cultivar IRGA 424, lançada recentemente, apresenta grande desempenho em todas as regiões do Rio Grande do Sul, pela sua alta produtividade e qualidade industrial de grãos, além de apresentar tolerância à toxidez por ferro e resistência à brusone (SOSBAI, 2007). As estirpes de rizóbios utilizadas neste estudo (Tabela 4.1) cresceram em meio levedura-manitol (YM), incubado a 28°C por três dias (Somasegaran & Hoben, 1994).

Foram realizados três experimentos, na Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, para a avaliação da capacidade e da eficiência dos rizóbios em promover o crescimento de arroz. Os delineamentos experimentais foram inteiramente casualizados, em esquema bifatorial, com três repetições. O primeiro experimento teve por finalidade avaliar, em laboratório, o efeito da inoculação dos rizóbios sobre a germinação das sementes das cultivares de arroz

estudadas. As sementes foram desinfestadas com álcool (70%), hipoclorito de sódio (0,3%) e lavadas com água destilada esterilizada. Após, foram distribuídas cinquenta sementes de arroz em placas de petri com papel toalha, esterilizados em autoclave. A inoculação foi realizada com 5 mL de caldo das culturas de bactérias crescidas por 24 horas. O tratamento controle (sem inoculação) constituiu-se da adição de 5 mL de meio levedura manitol líquido esterilizado em autoclave. As placas foram colocadas em estufa a 28°C e, a cada 24 horas, as sementes germinadas foram contadas e retiradas, tendo sido avaliadas durante seis dias. A germinação inicial (GI) foi determinada pela razão entre o número de sementes germinadas na primeira avaliação em que detectou-se sementes germinadas e o número total de sementes germinadas, ao final das seis avaliações. A germinação final (GF) foi calculada pela razão entre o número de sementes germinadas no final do período de incubação e o número total de sementes colocadas para germinar.

**TABELA 4.1. Estirpes de rizóbios utilizadas**

<b>Estirpe</b>	<b>Leguminosa hospedeira</b>	<b>Município</b>	<b>Fonte</b>
UFRGS-1TV	<i>T. vesiculosum</i>	Dom Pedrito (RS)	Bredow, 2005
UFRGS-VP16	<i>Trifolium repens</i>	Veranópolis (RS)	Bredow, 2005
UFRGS-Lg111	<i>Lotus glaber</i>	Porto Alegre (RS)	Fontoura, 2007
UFRGS-Lc336	<i>L. corniculatus</i>	Hulha Negra (RS)	Frizzo, 2007
UFRGS-Lc348	<i>L. corniculatus</i>	Hulha Negra (RS)	Frizzo, 2007
EEL1183U	<i>L. uliginosus</i>	Lages (SC)	Brose, 1992

No segundo experimento, em condições axênicas, as sementes de cada cultivar foram desinfestadas superficialmente, pré-germinadas e plantadas (seis sementes) em vasos plásticos de 500mL, contendo mistura autoclavada de vermiculita e areia (2:1), tratada neste estudo como substrato esterilizado. Foi realizado desbaste, deixando-se apenas duas plântulas por vaso. Aos sete dias, as plantas foram inoculadas com 5 mL da cultura bacteriana, crescida em meio YM. As plantas do tratamento controle receberam 5 mL de meio YM esterilizado. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente com solução nutritiva esterilizada diluída a 50% (Sarruge, 1975). Aos 37 dias, as plantas foram cortadas, rente ao

substrato. A parte aérea e o sistema radicular foram secos a 65°C até atingir matéria constante, para determinação da matéria seca da parte aérea e de raízes.

No terceiro experimento foram utilizados vasos plásticos de 2,5L contendo 1,7kg de solo, coletado na profundidade de 0-20cm, em área de várzea com pastagem nativa, no município de Caçapava do Sul. O dados da análise de solo são os seguintes: argila = 20%,  $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 5,2$ , Índice SMP = 6,0;  $\text{P} = 8 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\text{K} = 95 \text{ mg dm}^{-3}$ , matéria orgânica = 3,8%,  $\text{Al} = 0,6 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ,  $\text{Ca} = 7,9 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ,  $\text{Mg} = 3,0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ,  $\text{S} = 6,1 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\text{Zn} = 1,9 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\text{Cu} = 1,7 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\text{B} = 0,4 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\text{Mn} = 45 \text{ mg dm}^{-3}$ . O solo foi misturado com super fosfato simples e cloreto de potássio, equivalente a 45 e 25  $\text{mg kg}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$  e  $\text{K}_2\text{O}$ , respectivamente, de acordo com o manual de recomendação de calagem e adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CQFS, 2004), considerando densidade do solo igual a um (1).

O solo foi alagado por 16 dias antes da semeadura, mantendo-se uma lâmina de 5 cm acima do nível do solo. As sementes de cada cultivar foram tratadas como descrito acima e semeadas (seis sementes). Antes da semeadura, as sementes foram imersas em caldo contendo os rizóbios, por 10 a 15 minutos, com exceção dos tratamentos controle, onde as sementes foram imersas em água destilada esterilizada. Após 10 dias, foi realizado desbaste para três plantas por vaso e aplicado nitrogênio, na forma de solução de uréia ( $760 \text{ mg L}^{-1}$ ), equivalendo a  $40 \text{ kg N ha}^{-1}$ . Utilizaram-se dois tratamentos controles não inoculados, um com adição de nitrogênio, equivalente a  $40 \text{ kg ha}^{-1}$  de N por hectare, e outro com adição de  $80 \text{ kg ha}^{-1}$ . Após a fertilização, as condições de inundação foram reestabelecidas. Trinta dias após a semeadura, foi realizada a segunda aplicação de nitrogênio, conforme descrita anteriormente. Sessenta dias após a semeadura, foi contado o número de perfilhos por planta e as plantas foram cortadas rente ao solo. A parte aérea das plantas foi seca a 65°C, até obtenção de matéria constante, para determinação da matéria seca da parte aérea por planta.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando significativa, foram realizados testes de médias Scott-Knott, com 10% de probabilidade de erro, pelo software Sysvar 4.6 (Ferreira, 2000). Determinou-se também a eficiência relativa da inoculação dos rizóbios

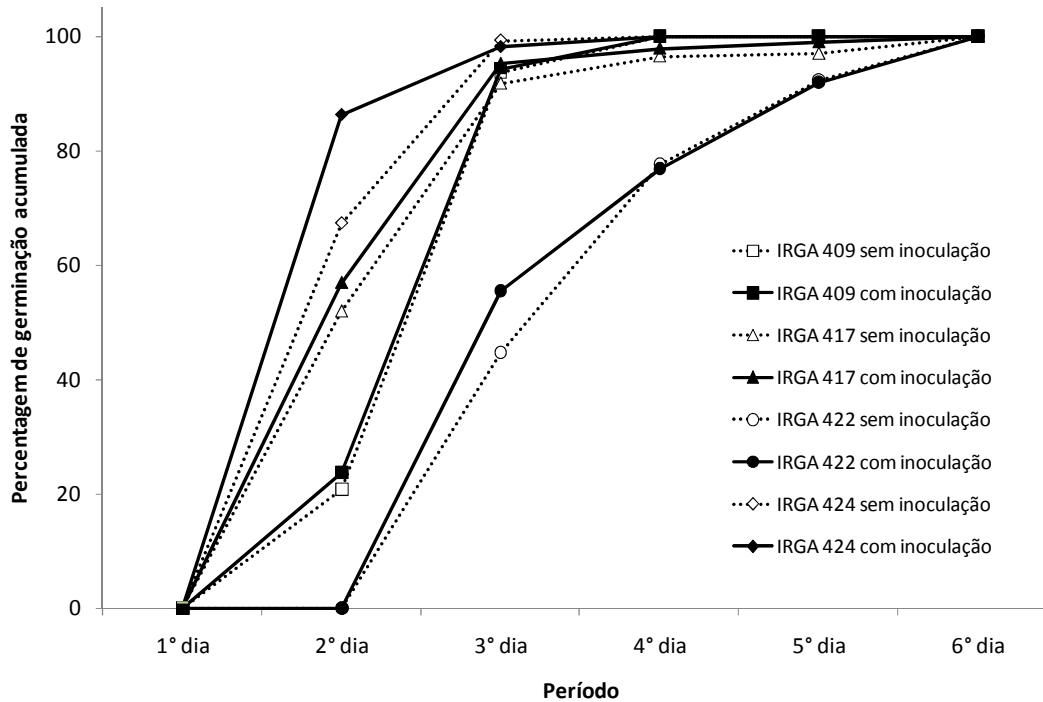
no crescimento da parte aérea das plantas de arroz, via uma modificação do método de Brockwell et al. (1966), que originalmente, determina a eficiência relativa da fixação de nitrogênio por isolados de rizóbios em plantas leguminosas. Para determinar este parâmetro, utilizou-se as matérias secas da parte aérea produzidas pela inoculação com o rizóbio e dos tratamentos controle. O valor foi obtido pelo quociente entre a diferença entre o tratamento inoculado ( $MSPA_{inoculação}$ ) e o controle com 40 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio ( $MSPA_{40N}$ ) e a diferença entre o controle com 80 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio ( $MSPA_{80N}$ ) e o controle com 40 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio ( $MSPA_{40N}$ ), de acordo com a equação 1.

$$Eficiência\ relativa\ (\%) = \left( \frac{MSPA_{inoculação} - MSPA_{40N}}{MSPA_{80N} - MSPA_{40N}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

### Resultados e discussão

Observou-se que, no segundo dia de avaliação, a germinação das sementes de arroz das cultivares IRGA 409, IRGA 417 e IRGA 424 já havia começado (Figura 4.1), enquanto que nas da cultivar IRGA 422CL só iniciou no terceiro dia. O número de sementes germinadas das cultivares IRGA 409 e IRGA 424 não aumentou mais a partir do quarto dia, e as das cultivares IRGA 417 e IRGA 422CL a partir do sexto dia (Figura 4.1). O valor da germinação inicial foi obtido no segundo dia de incubação para as cultivares IRGA 409, IRGA 417 e IRGA 424. Já para a cultivar IRGA 422CL considerou-se o valor obtido no terceiro dia de incubação.

A inoculação com rizóbios não alterou o poder germinativo das sementes de arroz, característica inerente à semente, porém interferiu na velocidade de germinação. Ao se fazer a média da germinação inicial, proporcionada pela inoculação com rizóbios, e compará-la com a da germinação inicial no tratamento controle, observou-se uma aceleração do processo de germinação devido à inoculação. Verificou-se que na cultivar IRGA 424, no segundo dia de avaliação, a inoculação proporcionou um aumento de 18,9% na germinação. Para a cultivar IRGA 422CL, no segundo dia ainda não haviam sido observadas sementes germinadas. No entanto, no terceiro dia, as sementes inoculadas com rizóbios haviam germinado 10,8% a mais do que as sementes não inoculadas (Tabela 4.2).



**FIGURA 4.1. Efeito da inoculação com rizóbios na germinação de sementes de arroz das cultivares IRGA409, IRGA417, IRGA422 e IRGA424.**

Ao analisar-se, isoladamente, o efeito de cada rizóbio na germinação das sementes de arroz, observou-se que alguns isolados estimularam a germinação e outros não (Tabela 4.2). Nas sementes da cultivar IRGA 409, os rizóbios UFRGS-Lg111 e UFRGS-Lc336 aumentaram a germinação, em relação ao controle que não recebeu inoculação, já no segundo dia. O isolado UFRGS-Lg111 induziu um acréscimo de 19,5% na germinação e o UFRGS-Lc336, um acréscimo de 8,6%. As sementes da cultivar IRGA 417 germinaram mais rapidamente quando inoculadas com os isolados UFRGS-1TV, UFRGS-Lg111, UFRGS-Lc348 e EEL1183. O aumento médio na germinação foi de 4,8%. Para as sementes da cultivar IRGA 422CL, observou-se que a inoculação com os isolados UFRGS-Lc348 e EEL1183 aumentou a germinação em mais de 17%. Ainda nas sementes desta mesma cultivar, os rizóbios UFRGS-1TV, UFRGS-VP16 e UFRGS-Lg111 também estimularam a germinação, porém de forma menos pronunciada. A germinação das sementes da cultivar IRGA 424 foi estimulada por todos os rizóbios testados. Os isolados UFRGS-1TV, UFRGS-Lg111, UFRGS-Lc336 e UFRGS-Lc348 foram responsáveis por incrementos superiores a 18% na germinação das sementes desta cultivar.

**TABELA 4.2. Germinação inicial e final de sementes de quatro cultivares de arroz, inoculadas com seis isolados de rizóbios nativos do sul do Brasil.**

Rizóbios	IRGA 409		IRGA 417		IRGA 422CL		IRGA 424	
	GI <sup>1</sup>	GF <sup>2</sup>	GI	GF	GI <sup>3</sup>	GF	GI	GF
	..... % .....							
UFRGS-1TV	20,9 c*	96,0 <sup>ns</sup>	26,7 a	96,0 <sup>ns</sup>	55,6 b	84,0 <sup>ns</sup>	85,8 a	93,3 <sup>ns</sup>
UFRGS-VP16	17,8 c	95,3	23,0 b	97,3	53,9 b	85,3	80,4 b	92,0
UFRGS-Lg111	40,3 a	96,0	28,0 a	95,0	53,6 b	87,3	91,4 a	93,3
UFRGS-Lc336	29,4 b	95,3	23,0 b	96,6	45,4 c	80,7	88,7 a	94,0
UFRGS-Lc348	17,6 c	91,3	29,3 a	96,6	61,6 a	86,7	91,2 a	90,0
EEL1183	16,6 c	96,7	26,0 a	96,3	62,5 a	85,3	80,4 b	95,3
Controle	20,8 c	96,0	22,7 b	95,3	44,6 c	86,7	67,4 c	94,0
Média <sup>4</sup>	23,8	95,1	26,0	96,3	55,4	84,9	86,3	93,0
Diferença <sup>5</sup>	3,0	-0,9	3,3	1,0	10,8	1,8	18,9	-1,0

<sup>1</sup> Germinação inicial: % de sementes germinadas no segundo dia, em relação às sementes germinadas no sexto dia; <sup>2</sup> Germinação final: % de sementes germinadas no sexto dia, em relação ao número total de sementes; <sup>3</sup> A germinação inicial na cultivar IRGA 422CL foi considerada no terceiro dia de avaliação; <sup>4</sup> Média dos tratamentos que receberam inoculação com rizóbios; <sup>5</sup> Diferença entre a média dos tratamentos inoculados e do tratamento controle, sem inoculação, \* médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

A inoculação com os isolados de rizóbios promoveu o crescimento das quatro cultivares de arroz, em condições axênicas. Todas as estirpes aumentaram a matéria seca da parte aérea (Tabela 4.3) da cultivar IRGA 409, em relação ao tratamento sem inoculação. No entanto, a matéria seca das plantas da cultivar IRGA 422 aumentou apenas com a inoculação dos isolados UFRGS-1TV, UFRGS-VP16, UFRGS-Lc336 e EEL1183. Já para a cultivar IRGA 424, os isolados UFRGS-1TV, UFRGS-Lg111, UFRGS-Lc336 e UFRGS-Lc348 foram os que estimularam o crescimento da parte aérea.

Os isolados que apresentaram incremento no crescimento da parte aérea de arroz proporcionaram um aumento médio de 31,1%, 11,6% e 30,9% para as cultivares IRGA 409, IRGA 422 e IRGA 424, respectivamente. Surpreendentemente, a produção de matéria seca das plantas da cultivar IRGA 417 não foi estimulada por nenhum rizóbio testado. Estes resultados indicam que existem diferenças na interação entre as cultivares de arroz e as bactérias testadas no que diz respeito ao estímulo ao crescimento da parte aérea das plantas. Em estudo realizado por Yanni et al. (2001), resultados similares foram encontrados. Esses autores observaram que entre seis cultivares de arroz testadas, apenas duas se destacaram, ao terem o comprimento da parte aérea aumentado pela inoculação com rizóbios. Na interação com a cultivar IRGA 417, ou os rizóbios não produzem substâncias promotoras de crescimento de parte aérea ou eles não conseguem colonizar a parte aérea das plantas desta cultivar, da mesma forma que os isolados UFRGS-Lg111 e UFRGS-1TV colonizam a cultivar IRGA 424 (Osorio Filho et al., 2009).

Em relação ao desenvolvimento radicular das plantas, observou-se que poucos isolados foram capazes de aumentar a matéria seca das raízes nas quatro cultivares de arroz analisadas (Tabela 4.3). A cultivar IRGA409 teve a matéria seca de raízes incrementada quando inoculada com o isolado UFRGS-Lc336, em comparação com o tratamento não inoculado. Neste caso, o incremento foi de 142%. Os rizóbios UFRGS-1TV, isolado de trevo vesiculoso e UFRGS-VP16, isolado de trevo branco, foram capazes de estimular o crescimento das raízes das plantas da cultivar IRGA417, com aumento de 55 e 24%, respectivamente. No entanto, para as plantas da cultivar IRGA422CL, a matéria seca radicular apresentou aumentos de 156 e 118%, quando inoculadas com os isolados UFRGS-VP16 e EEL1183, respectivamente.



**TABELA 4.3. Produção de matéria seca da parte aérea e da raiz de plantas de quatro cultivares de arroz, cultivadas em vasos com substrato esterilizado, inoculadas com rizóbios nativos do sul do Brasil.**

Rizóbio inoculado	Cultivares de arroz			
	IRGA 409	IRGA 417	IRGA 422CL	IRGA 424
	.....matéria seca da parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> ).....			
UFRGS-1TV	271 a**	273 <sup>ns</sup>	326 a*	308 b*
UFRGS-VP16	254 a	273	331 a	264 c
UFRGS-Lg111	264 a	304	245 b	325 b
UFRGS-Lc336	271 a	326	323 a	383 a
UFRGS-Lc348	269 a	302	283 b	324 b
EEL1183	284 a	322	345 a	260 c
Controle	205 b	269	297 b	256 c
CV	11,06	18,13	8,49	14,51
	.....matéria seca da raiz (mg planta <sup>-1</sup> ).....			
UFRGS-1TV	295 b*	634 a*	528 b*	381 b*
UFRGS-VP16	378 b	508 a	813 a	373 b
UFRGS-Lg111	289 b	331 b	554 b	482 a
UFRGS-Lc336	516 a	337 b	382 c	462 a
UFRGS-Lc348	261 b	360 b	353 c	413 b
EEL1183	334 b	339 b	693 a	392 b
Controle	213 b	373 b	318 c	375 b
CV	25,39	22,82	20,29	17,15

\*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro; \*\* médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott a 10% de probabilidade de erro; ns diferença não significativa entre médias.

A matéria seca radicular da cultivar IRGA424 foi incrementada em 29 e 23%, quando as plantas foram inculadas com os rizóbios UFRGS-Lg111 e UFRGS-Lc336, respectivamente. Observa-se que o sistema radicular das plantas de todas as cultivares foi estimulado pela inoculação com rizóbios. No entanto, da mesma forma que o observado para a parte aérea, houve diferenças no efeito da inoculação por diferentes rizóbios, indicando a existência de diferentes interações entre planta e microrganismo. Estes

resultados concordam com os de Yanni et al. (2001), que observaram diferentes interações entre cultivares de arroz e isolados de rizóbios, no estímulo do volume radicular de plantas de arroz. Outra similaridade com este estudo diz respeito ao fato de os isolados que mais incrementaram o crescimento da parte aérea em uma cultivar, não necessariamente, foram os melhores em estimular o crescimento radicular na mesma cultivar.

As diferenças em interações entre plantas de arroz e microrganismos também foram levantadas em outros trabalhos. Diferentes populações de bactérias diazotróficas foram encontradas em duas cultivares de arroz, EEA 406 e IRGA 419, em condições similares de cultivo, em uma pesquisa realizada por Silva et al. (2004). Estes autores observaram um incremento significativo nas populações de diazotróficos na cultivar EEA-406. Em outra pesquisa, Khalid et al. (2004) observaram que dois cultivares de arroz responderam diferentemente à inoculação com diferentes rizobactérias. Eles sugerem que a variação nas respostas pode ser devido às diferenças genéticas entre as cultivares.

Quando as diferentes cultivares de arroz foram cultivadas em solo, com população microbiana estabelecida, verificou-se que a promoção de crescimento pela inoculação com rizóbios apresentou resultados diferentes aos observados em cultivo em substrato esterilizado (Tabela 4.4), semelhantemente ao observado por Yanni et al. (2001). Apenas a cultivar IRGA 424 apresentou resposta à inoculação com os isolados de rizóbios. Ao se comparar com o tratamento controle, que recebeu a mesma dose de nitrogênio dos tratamentos inoculados, percebeu-se que todos os isolados estimularam o crescimento da planta, e com conseqüente acúmulo de matéria seca na parte aérea. Além disso, o isolado UFRGS-Lc348 foi tão eficiente na promoção de crescimento, que não diferiu estatisticamente do tratamento controle que recebeu o dobro da adubação nitrogenada. Esse isolado apresentou uma eficiência relativa de 88,4% em relação aos tratamentos sem inoculação. Os demais rizóbios apresentaram eficiência superior a 47,4% (Figura 4.2).

O bom desempenho que os isolados de rizóbios apresentaram na promoção de crescimento de arroz, quando inoculados em solo, mostra que os microrganismos conseguem competir com a microflora estabelecida no solo, uma vez que não foi realizada esterilização. De fato, um importante requisito

para o uso agrônomo de rizóbios como promotores de crescimento de arroz é a habilidade da bactéria em sobreviver em condições competitivas (Tan et al., 2001).

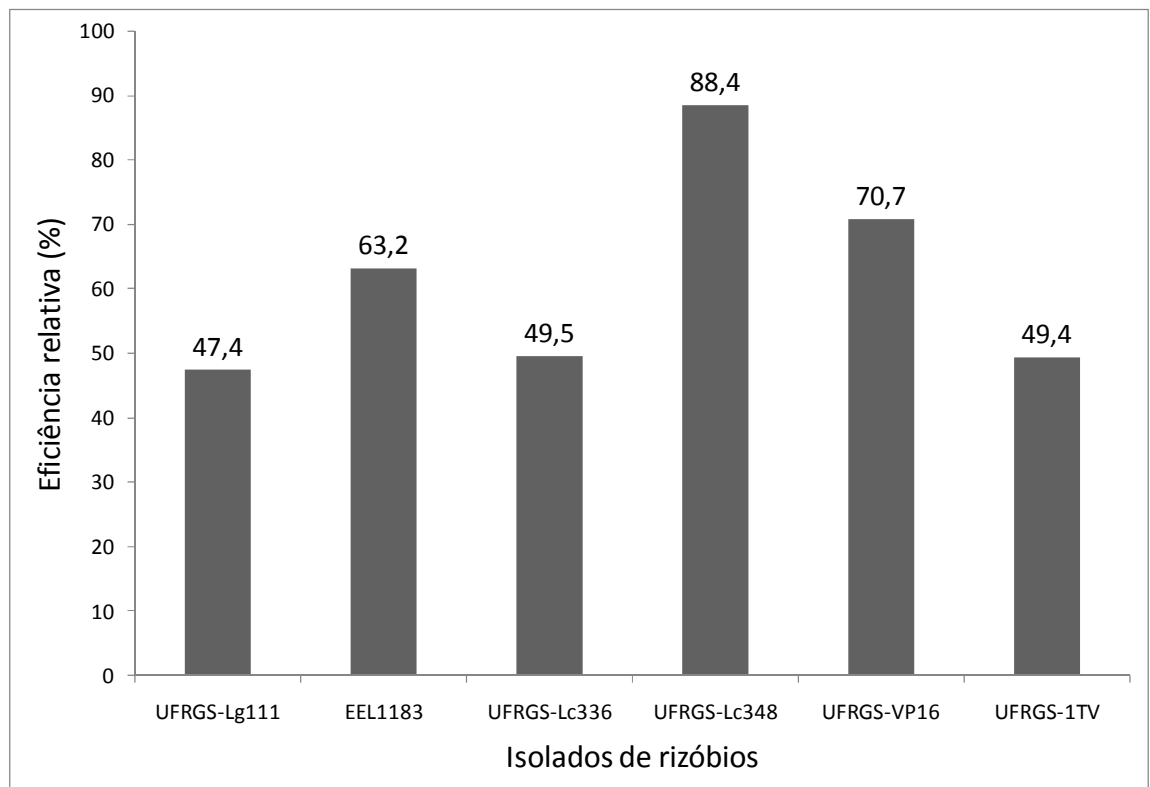
**TABELA 4.4. Produção de matéria seca da parte aérea e perfilhamento de plantas de quatro cultivares de arroz, cultivadas em vasos com solo, inoculadas com rizóbios nativos do sul do Brasil.**

Rizóbio inoculado	Cultivares de arroz			
	IRGA 409	IRGA 417	IRGA 422CL	IRGA 424
	.....matéria seca da parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> ) .....			
UFRGS-1TV	2.669 b*	2.329 b	1.985 b	2.264 b
UFRGS-VP16	2.287 c	2.246 b	2.358 b	2.466 b
UFRGS-Lg111	2.651 b	2.405 b	2.140 b	2.245 b
UFRGS-Lc336	2.461 c	2.395 b	2.029 b	2.265 b
UFRGS-Lc348	2.391 c	2.199 b	2.325 b	2.635 a
EEL1183	2.619 b	2.177 b	2.109 b	2.395 b
Controle (40 kg N ha <sup>-1</sup> )	2.647 b	2.315 b	2.200 b	1.794 c
Controle (80 kg N ha <sup>-1</sup> )	3.116 a	2.792 a	2.730 a	2.745 a
CV	11,64	9,36	9,30	11,38
	.....perfilhos planta <sup>-1</sup> .....			
UFRGS-1TV	5,22 b	5,22 b	5,22 b	7,11 b
UFRGS-VP16	5,22 b	4,67 b	5,56 b	7,89 a
UFRGS-Lg111	6,00 a	4,78 b	5,56 b	8,22 a
UFRGS-Lc336	5,00 b	4,78 b	6,22 a	7,67 a
UFRGS-Lc348	5,00 b	5,33 b	4,78 b	8,56 a
EEL1183	5,00 b	5,00 b	5,89 a	8,78 a
Controle (40 kg N ha <sup>-1</sup> )	5,22 b	5,00 b	5,22 b	5,78 c
Controle (80 kg N ha <sup>-1</sup> )	6,33 a	6,00 a	6,78 a	8,89 a
CV	13,73	9,97	11,66	12,06

\*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro;

Por não formarem nódulos em plantas não-leguminosas, os rizóbios não fixam nitrogênio quando em associação com essas plantas. No entanto,

esse incremento no crescimento da parte aérea pode ser devido ao melhor aproveitamento dos nutrientes do solo, como o nitrogênio (Tien et al., 1979; Yanni et al., 1997; Biswas et al., 2000; Matiru & Dakora, 2004). Trabalhos mostram que um dos mecanismos de promoção de crescimento de plantas pelos rizóbios é a produção de hormônios vegetais, como o ácido indol acético (AIA) (Yanni et al., 2001; Chi et al., 2005). Este hormônio estimula o crescimento de raízes (Senthilkumar et al., 2006), o que aumenta a eficiência do aproveitamento dos nutrientes do solo, pois estimula o crescimento do sistema radicular, como observado para a cultivar IRGA 424 no experimento com substrato esterilizado. Dessa forma, o uso de rizóbios em lavouras de arroz pode ser uma alternativa para a diminuição da adubação nitrogenada, reduzindo os custos para o agricultor e a contaminação de recursos hídricos com nitrato, problema muito comum em áreas agrícolas de elevada utilização de fertilizantes nitrogenados.



**FIGURA 4.2. Eficiência relativa de isolados de rizóbios nativos do sul do Brasil em promover o acúmulo de matéria seca da parte aérea de plantas de arroz da cultivar IRGA 424, aos sessenta dias após a semeadura, em vasos com solo, em casa de vegetação.**

Entre as cultivares de arroz estudadas, observa-se que algumas são relativamente mais responsivas à inoculação com rizóbios (Tabela 4.5). As plantas da cultivar IRGA 417 não foram estimuladas pelos rizóbios para incrementar a produção de matéria seca, tanto em substrato esterilizado, quanto no solo, assim como o perfilhamento. Por outro lado, a cultivar IRGA 424 foi altamente responsiva aos rizóbios nestes experimentos. Pela inoculação de rizóbios, esta cultivar teve incrementos na velocidade de germinação, na produção de matéria seca da parte aérea, em substrato esterilizado e no solo, na produção de raízes e no perfilhamento. A cultivar IRGA 424 apresenta elevado potencial, tanto para futuros estudos com rizóbios como promotores de crescimento, quanto para utilização destas bactérias pelos agricultores.

**TABELA 4.5. Incrementos percentuais na germinação, na parte aérea, no sistema radicular e no perfilhamento de plantas de quatro cultivares de arroz inoculadas com rizóbios nativos do Rio Grande do Sul.**

Rizóbio inoculado	Cultivares de arroz			
	IRGA409	IRGA417	IRGA422CL	IRGA424
	..... germinação (%) .....			
UFRGS-1TV	ns	17,6	24,7	27,3
UFRGS-VP16	ns	ns	20,9	19,3
UFRGS-Lg111	93,8	23,3	20,2	35,6
UFRGS-Lc336	41,3	ns	ns	31,6
UFRGS-Lc348	ns	29,1	38,1	35,3
EEL1183	ns	14,5	40,1	19,3
	..... matéria seca da parte aérea (substrato esterilizado) .....			
UFRGS-1TV	32,2	ns	9,8	20,3
UFRGS-VP16	23,9	ns	11,4	ns
UFRGS-Lg111	28,8	ns	ns	27,0
UFRGS-Lc336	32,2	ns	8,8	49,6
UFRGS-Lc348	31,2	ns	ns	26,6
EEL1183	38,5	ns	16,2	ns

**TABELA 4.5. Continuação**

..... matéria seca da raiz (substrato esterilizado) .....				
UFRGS-1TV	ns	70,0	66,0	ns
UFRGS-VP16	ns	36,2	155,7	ns
UFRGS-Lg111	ns	ns	74,2	28,5
UFRGS-Lc336	142,3	ns	ns	23,2
UFRGS-Lc348	ns	ns	ns	ns
EEL1183	ns	ns	117,9	ns
..... matéria seca da parte aérea (solo) .....				
UFRGS-1TV	ns	ns	ns	26,2
UFRGS-VP16	ns	ns	ns	37,5
UFRGS-Lg111	ns	ns	ns	25,1
UFRGS-Lc336	ns	ns	ns	26,3
UFRGS-Lc348	ns	ns	ns	46,9
EEL1183	ns	ns	ns	33,5
..... perfilhamento (solo) .....				
UFRGS-1TV	ns	ns	ns	23,0
UFRGS-VP16	ns	ns	ns	36,5
UFRGS-Lg111	14,9	ns	ns	42,2
UFRGS-Lc336	ns	ns	19,2	32,7
UFRGS-Lc348	ns	ns	ns	48,1
EEL1183	ns	ns	12,8	51,9

O entendimento das interações entre as cultivares de arroz e rizóbios é de fundamental importância para que no futuro se possa utilizar inoculantes a base de rizóbios, específicos para cada cultivar, ou mesmo, para se recomendar ou não a prática da inoculação em arroz, dependendo da cultivar utilizada. Espera-se a viabilidade da prática de uso dos rizóbios nas lavouras de arroz para aumentar a produção deste cereal, diminuindo os problemas ambientais pelo uso de fertilizantes nitrogenados e diminuindo os custos econômicos para o produtor de arroz, buscando dessa forma, a sustentabilidade do sistema de produção de arroz.

## Conclusões

- A inoculação das cultivares de arroz com os isolados de rizóbios produz respostas diferenciadas, indicando a existência de diferentes interações entre as plantas e os microrganismos;
- A inoculação com rizóbios testados acelera o processo de germinação de sementes de arroz, sendo o isolado UFRGS-Lg111 capaz de estimular a germinação de todas as cultivares de arroz estudadas;
- Observam-se diferenças nas interações entre os isolados de rizóbios e as cultivares de arroz, quando as plantas são cultivadas em substrato esterilizado e em solo. Apenas a cultivar IRGA 424 responde à inoculação quando o cultivo é realizado no solo.

## Referências

- ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effects on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, v. 204, n.1, p.57-67, 1998.
- BANERJEE, M.R.; YESMIN, L.; VESSEY, J. K. Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. In. RAI, M.K. (Ed), **Handbook of Microbial Biofertilizers**. Food Products Press®, Nova York, p.137-181, 2006.
- BARRAQUIO, W. L.; REVILLA, L., LADHA, J. K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, v.194, n.1-2, p.15–24, 1997.
- BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B; YANNI, Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, v.92, n.5, p.880–886, 2000.
- BREDOW, J. **Seleção de rizóbios para trevo branco**. 2005. 66 f. (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- 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 Agricultural and Animal Husbandry**, v.6, n.23, p.365-370, 1966.
- BROSE, E. Seleção de rizóbio para *Lotus pedunculatus* em solo ácido. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 27, n.3, p.409-415, 1992.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.B.; GILLIS, M.; DE LAUDIE, P.; DREYFUS, B. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, n.12, p.5437–5477, 2000.

CHABOT, R. H.; ANTOUN, H.; KLOEPPER, J.; BEAUCHAMP, C. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, n.8, p.2767–2772, 1996.

CHEN, X.; FENG, J.; HOU, B.; LI, F.; LI, Q.; HONG, G. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**. v. 33, n.8, p. 2540-2548, 2005.

CHI, F.; SHEN, S.H.; CHENG, H.P.; JING, Y.X.; YANNI, Y.G.; DAZZO, F.B. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and environmental microbiology**. v.71, n.11, p.7271-7278, 2005.

CQFS - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Núcleo Regional Sul. 10ed, 400p. Porto Alegre, 2004.

DAKORA, F.D.; KEYA, S.O. Contribution of legume nitrogen fixation to sustainable agriculture in Sub-Saharan Africa. **Soil Biology and Biochemistry**. v.29, n.5-6, p.809-817, 1997.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.22, n.2. p.107-149, 2003.

DUTTA, S.; MISHRA, A.K.; DILEEP KUMAR, B.K. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**. doi:10.1016/j.soilbio.2007.09.009, 2007.

ENGLESHAM, A.R.J.; AYANABA, A.; RAO, V.R.; ESKEW, D.L. Improving the nitrogen nutrition of maize by intercropping with cowpea. **Soil Biology and Biochemistry**, v.13, p.169-171, 1981.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema SISVAR para análises estatísticas**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000. 66p.

FONTOURA, R. A. **Isolamento de rizóbios nativos para *Lotus subbiflorus* e *L. glaber* em solos do Rio Grande do Sul**. 2007. 82 f. (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FRIZZO, M. L. S. **Isolamento de rizóbios nativos para *Lotus corniculatus* e *L. uliginosus* em solos do Rio Grande do Sul**. 2007. 68 f. (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GUTIERREZ-ZAMORA, M.; MARTINEZ-ROMERO, F. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays*). **Journal of Biotechnology**, v.91, n.2-3, p.117-126, 2001.



HALDER, A. K.; CHAKRABARTTY, P. K. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. **Folia Microbiologica**, v.38, n.4. p.325–330, 1993.

HOLFLICH, G.; WIEHE, W.; HECHT-BUCHOLZ, C. Rhizosphere colonization of different crops with growth promoting *Pseudomonas* and *Rhizobium* bacteria. **Microbiology Research**, v.150, n.2, p.139–147, 1995.

JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W.L.; REDDY, P.M.; IANNETTA, P. P. M.; OLIVARES, F.L.; LADHA, J. K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v.15, n.9, p.894–906, 2002.

KHALID, A.; TAHIR, S.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non- rhizosphere soils. **Australian Journal of Soil Research**. v.42, n.8, p.921–926, 2004.

LIPPMANN, B.; LEINHOS, V.; BERGMANN, H. Influence of auxin producing rhizobacteria on root morphology and nutrient accumulation of crops. I. Changes in root morphology and nutrient accumulation in maize (*Zea mays* L.) caused by inoculation with indole-3-acetic acid (IAA) producing *Pseudomonas* and *Acinetobacter* strains or IAA applied exogenously. **Angewandte Botany**, v.69, n.1-2, p.31–36, 1995.

MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.394, p. 27-34, 2004.

MATIRU, V. N.; DAKORA, F. D. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in land races of African cereal crops. **African Journal of Biotechnology**, v.3, n.1, p.1–7, 2004.

MISHRA, R. P. N.; SINGH, R. K.; JAISWAL, H. K.; KUMAR, V.; MAURYA, S. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, v.52, n.5, p.383–389, 2006.

NAUTIYAL, C. S. Rhizosphere competence of *Pseudomonas* sp. NBRI9926 and *Rhizobium* sp. NBRI9513 involved in the suppression of chick pea (*Cicer arietinum* L.) pathogenic fungi. **FEMS Microbial Ecology**, v.23, n.2, p.145–158, 1997.

NEILANDS, J. B.; LEONG, S. A. Siderophores in relation to plant growth and disease. **Annual Review of Plant Physiology** v.37, p.187–208, 1986.

NOEL, T. C.; SHENG, C.; YOST, C. K.; PHARIS, R. P.; HYNES, M. F. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. **Canadian Journal of Microbiology**. v.42, n.3, p. 279–283, 1996.

NOWAK, J. Benefits of in vitro “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants. In Vitro Cell. **Developmental Biology of Plants**, v.2, p.122–130, 1998.

ONA, O.; SMETS, I.; GYSEGOM, P.; BERNAERTS, K.; VAN IMPE, J.; PRINSEN, E.; VANDERLEYDEN, J. The effect of pH on indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Symbiosis**, v.35, n1-3, p.199-208, 2003.

OSORIO FILHO, B.D.; BINZ, A.; LIMA, R.F.; SÁ, E.L.S. Colonização e promoção de crescimento em arroz por *Mesorhizobium amorphae* e *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. In: XXXII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO. **Livro de Resumos**. Fortaleza, 2009. 1 CD-ROM.

PERRINE-WALKER, F. M.; PRAYITNO, J.; ROLFE, B. G.; WEINMAN, J.J.; HOCART, C. H. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n12, p.3343–3350, 2007.

REDDY, P.M.; LADHA, J.K.; SO, R.B.; HERNANDEZ, R.J.; RAMOS, M.C.; ANGELES, O.R.; DAZZO, F.B.; DE BRUIJN, F.J. Rhizobial communication with rice roots: Induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. **Plant and Soil**, v.194, n.1-2, p.81–98, 1997.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, n.4-5, p.319-339, 1999.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.1, n.3, p. 231-234, 1975.

SENTHILKUMAR, M.; MADHAIYAN, M.; SUNDARAM, S.P.; KANNAIYAN, S. Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. Cv CO-43). **Microbiological Research** (2006), doi:10.1016/j.micres.2006.10.007.

SILVA, D. M.; FRIES, M. R.; ANTONIOLLI, Z. I.; AITA, C.; VOSS, M.; JACQUES, R.; SEMINOTTI, J.; CARVALHO, C. A. Bactérias diazotróficas em solo cultivado com arroz irrigado (*Oryza sativa*), **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n.4, p.467–474, 2004.

SINGH, R. K; MISHRA, R. P. N.; JAISWAL, H. K. Can rhizobial inoculation promote rice growth through nitrogen fixation? **Institute Rice Research Notes** v.30, p.28–29. 2005

SINGH, R.K.; MISHRA, R.P.N.; JAISWAL, H.K.; KUMAR, V.; PANDEY, S.P.; RAO, S.B.; ANNAPURNA, K. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from Rice (*Oryza sativa* L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis. **Current Microbiology**. v.52, n.2, p.117–122, 2006.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, J. H. Handbook for **Rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology**. Springer-Verlag, New York, 450p, 1994.

SOSBAI - SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. Arroz Irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO. **5ª Reunião da Cultura Irrigada**. Pelotas, 2007.

TAN, Z.; HUREK, T.; VINUESA, P.; MULLER, P.; LADHA, J. K.; REINHOLD-HUREK, B. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots

by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. **Applied Environmental Microbiology**. v.67, n.8, p. 3655–3664, 2001.

TIEN, T.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**. v.37, n.5, p.1016–1024, 1979.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**. v.91, n.2-3, p.127–141, 2001.

WERNER D. **Symbiosis of plants and microbes**. London, UK: Chapman & Hall. 1992.

YANNI, Y.G.; RIZK, E.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.G.; DE BRUIJN, F.J.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T.M.; MATEOS, P.F.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, v.194, n.1-2, p.99–114, 1997.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; ABD EL-FATTAH, F.K.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJN, F.; REDEMAKER, J.; MAYA-FLORES, J.; OSTROM, P.; VEGA-HERNANDEZ, M.; HOLLINGSWORTH, R.I.; MARTINEZ-MOLINA, E.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; MATEOS, P.F.; VELASQUEZ, E.; TRIPLETT, E.; UMALI-GARCIA, M.; ANARNA, J.A.; ROLFE, B.G.; LADHA, J.K.; HILL, J.; MUJOO, R.; NG, P.K.; DAZZO, F.B. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolli* with rice roots. **Australian Journal Plant of Physiology**, v.28, n.9, p.845-870, 2001.

## **5. ESTUDO III**

### **Promoção de crescimento de arroz por rizóbios em diferentes níveis de adubação nitrogenada**

#### **Introdução**

O nitrogênio (N) é um elemento fundamental para todas as células vivas, fazendo parte de muitas moléculas orgânicas, como aminoácidos e proteínas. Representa cerca de 3,5% da matéria seca vegetal (CQFS-RS/SC, 2004) e é demandado em grandes quantidades pelas culturas agrícolas (Matson et al., 1998). A aplicação de N no solo é uma das práticas responsáveis pelos altos índices de produtividade das culturas agrícolas. No entanto, o N aplicado no solo está sujeito a transformações e movimentações no perfil do solo em função da atividade microbiana, do clima, das propriedades químicas e físicas do solo, e mesmo, do estágio fenológico da planta. Dependendo destes fatores, grande parte do N aplicado no solo pode não ser aproveitada pela planta, e ser perdida para o ambiente (Raun & Johnson, 1999). Nas áreas de arroz irrigado, uma das principais formas de perda de nitrogênio é a volatilização de amônia, ocorrendo poucos dias após a aplicação (Duarte et al, 2007). O nitrogênio que é perdido do sistema solo-planta, logo após as adubações nitrogenadas, pode, em outros ambientes, ser um contaminante. É o caso das contaminações dos recursos hídricos com nitrato, que causam desequilíbrios ambientais e põem em risco as populações humanas (Schröder et al., 2000).

Neste contexto, os rizóbios são extremamente importantes na agricultura porque fixam nitrogênio da atmosfera, transferindo-o às plantas e ao

solo. Os rizóbios vivem em simbiose com plantas leguminosas, formando nódulos radiculares, onde a enzima *nitrogenase* fica protegida do oxigênio, cuja presença diminui a eficiência da enzima em fixar o nitrogênio (Sandowsky et al., 1995). Atualmente, a soja cultivada no Brasil não recebe nenhuma forma de adubação nitrogenada, graças à inoculação com rizóbios do gênero *Bradyrhizobium* (Campo & Hungria, 2004; Giongo et al., 2008).

Em plantas não-leguminosas, os rizóbios não formam nódulos e não fixam nitrogênio atmosférico. Por outro lado, estudos recentes vêm demonstrando que os rizóbios podem ser capazes de colonizar caules e folhas de plantas como o arroz, o milho, o trigo e a canola, entre muitas outras (Biswas et al., 2000; Chaintreuil et al., 2000; Singh et al., 2006; Perrine-Walker et al., 2007; Roesch et al., 2007). Vivendo endofiticamente, os rizóbios podem estimular o crescimento das plantas pela produção de substâncias hormonais, principalmente auxinas (Biswas et al., 2000; Mantelin & Touraine, 2004; Chen et al., 2005), a solubilização de fosfatos (Rodriguez & Fraga, 1999), e a proteção das plantas contra patógenos (Mishra et al., 2006; Dutta et al., 2007).

A entrada dos rizóbios em plantas de arroz se dá por aberturas radiculares devido à emergência de raízes secundárias. Do sistema radicular, essas bactérias ascendem via xilema para a parte aérea (Reddy et al., 1997; Yanni et al., 1997). Em arroz, os rizóbios podem acelerar a germinação das sementes, estimular o crescimento radicular, melhorar a absorção de nutrientes, estimular o crescimento da parte aérea e aumentar o rendimento de grãos (Yanni et al., 1997; Yanni et al., 2001; Biswas et al., 2000). A promoção no crescimento e no desenvolvimento de arroz é atribuída à produção de ácido-indol-acético (AIA) pelos rizóbios, que pode ocorrer por quatro vias metabólicas: a rota de indol-3-acetamida (IAM), a rota dos indol-3-piruvato (IPyA), a rota da triptamida (TAM), e a rota do indol-acetonitrilo (IAN). O precursor inicial da síntese de AIA, utilizado por todas estas rotas, é o aminoácido triptofano (Spaepen et al., 2007).

Apesar de não fixar nitrogênio quando associados com arroz, os rizóbios podem estimular o crescimento radicular e aumentar o aproveitamento dos nutrientes do solo, como o nitrogênio. O objetivo deste trabalho foi avaliar a promoção de crescimento que os rizóbios proporcionam em plantas de arroz fertilizadas com diferentes doses de nitrogênio.

## Material e Métodos

Realizou-se um experimento com vasos plásticos com solo em casa de vegetação, no Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições em esquema bifatorial. O solo foi coletado em área de campo nativo no município de Caçapava do Sul, na profundidade de 0 a 20 cm, sendo peneirado em malha de 20 mm. Os dados da análise de solo são os seguintes: argila = 20%,  $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 5,2$ , Índice SMP = 6,0;  $\text{P} = 8 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\text{K} = 95 \text{ mg dm}^{-3}$ , matéria orgânica = 3,8%,  $\text{Al} = 0,6 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ,  $\text{Ca} = 7,9 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ,  $\text{Mg} = 3,0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ,  $\text{S} = 6,1 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\text{Zn} = 1,9 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\text{Cu} = 1,7 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\text{B} = 0,4 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\text{Mn} = 45 \text{ mg dm}^{-3}$ . O solo foi fertilizado com superfosfato triplo e cloreto de potássio na dose de 219 e 86  $\text{mg kg}^{-1}$  de solo, respectivamente, equivalendo a 90  $\text{kg ha}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$  e 50  $\text{kg ha}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{O}$ , de acordo com as recomendações de calagem e adubação para o Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CQFS, 2004). Os vasos foram perfurados na lateral inferior, para controle da drenagem usando-se uma rolha de silicone de 20 mm de diâmetro. Os vasos foram alagados por 11 dias, sendo realizada a manutenção da lâmina de água em 3 cm acima do nível do solo.

Utilizou-se a cultivar de arroz IRGA424 que foi lançada recentemente para todo o estado do Rio Grande do Sul, e se destaca pela alta produtividade e qualidade industrial de grãos, além de apresentar tolerância à toxidez por ferro e resistência à bruzone (SOSBAI, 2007). Os tratamentos foram as combinações entre rizóbios e doses de nitrogênio em cobertura. Os isolados de rizóbios utilizados foram UFRGS-Lc336, UFRGS-Lc348, UFRGS-Lc398, oriundos de Hulha Negra (RS), eficientes para *Lotus corniculatus* (Frizzo, 2007); UFRGS-Lg111, oriundo de solo do município de Porto Alegre (RS), eficiente para *L. glaber*, UFRGS-Ls36, isolado de solo do município de Mostardas, RS, eficiente para *L. subbiflorus* (Fontoura, 2007); EEL1183, isolado em Lages (SC), eficiente para *L. uliginosus* (Brose, 1992); UFRGS-VP16, isolado em Veranópolis (RS), eficiente para *Trifolium repens* e UFRGS-1TV, oriundo de Dom Pedrito (RS), eficiente para *T. vesiculosum* (Bredow, 2005). As sementes foram inoculadas sendo colocadas em contato com o caldo levedura manitol (LM) contendo o isolado crescido, por 10 minutos, e

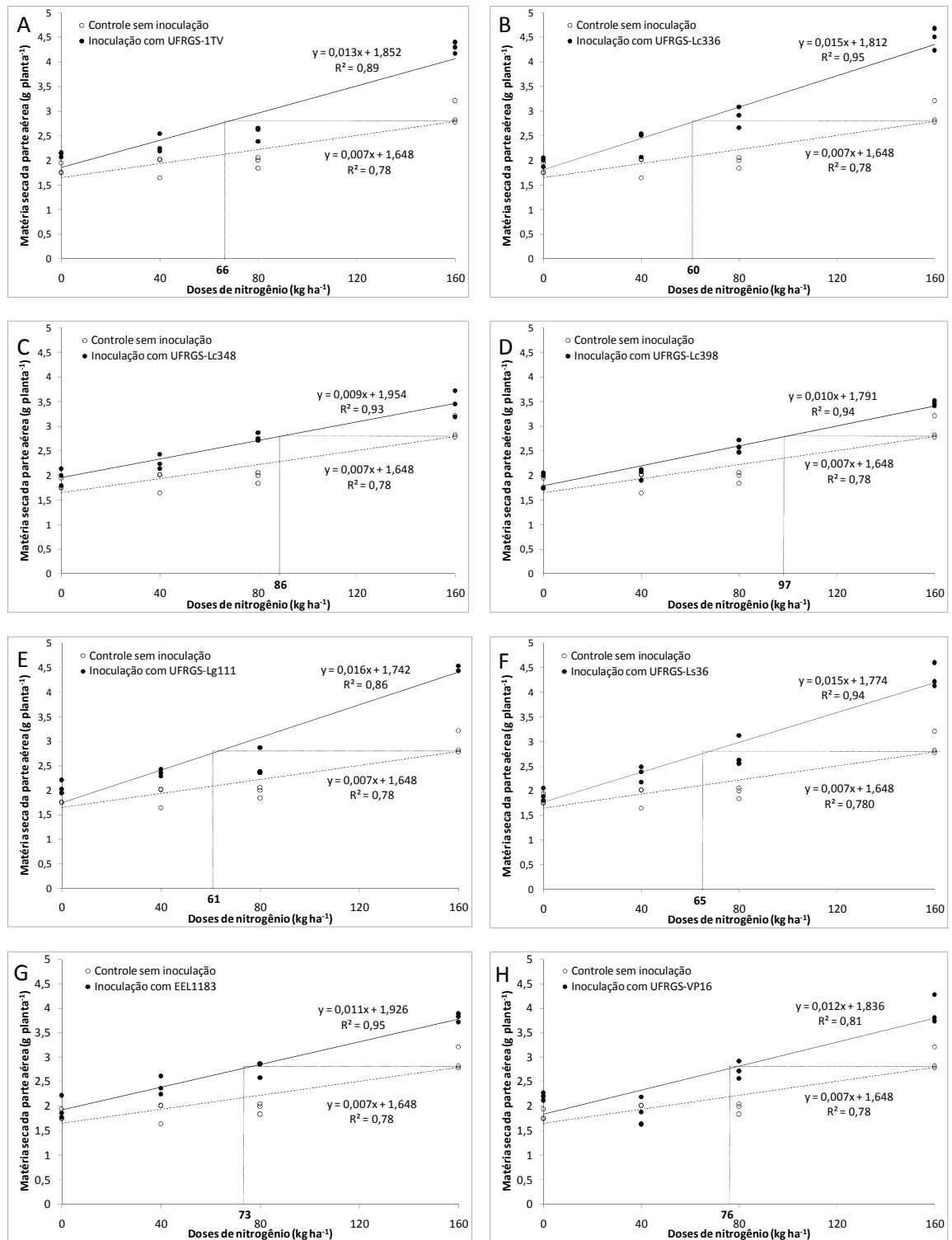
após semeadas no solo. Foram utilizados tratamentos controle sem inoculação sendo as sementes colocadas em contato com água esterilizada. Cada vaso recebeu 16 sementes, sendo realizado desbaste para duas plantas por vaso, 10 dias após a semeadura. As doses de nitrogênio empregadas equivaleram a 0, 40, 80 e 160 kg ha<sup>-1</sup>, parceladas em duas aplicações, via solução com uréia, nas respectivas concentrações de 0; 0,378; 0,755 e 1,510 mg L<sup>-1</sup>. A primeira e a segunda aplicação de nitrogênio ocorreram aos 10 e 30 dias após a semeadura, respectivamente. Imediatamente após a primeira fertilização nitrogenada de cobertura, o solo foi mantido alagado, com reposição periódica de água para manutenção da lâmina em 3 cm acima do nível do solo.

Aos 55 dias após a semeadura, a parte aérea foi cortada, seca em estufa a 65°C por 48 horas, pesada e moída. Determinou-se o teor de nitrogênio no tecido (Tedesco et al., 1995). Para o cálculo das quantidades de nitrogênio absorvidas pelas plantas, multiplicou-se os valores de matéria seca pelo teor deste elemento no tecido vegetal. Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância, e quando significativa, foram realizadas regressões.

### **Resultados e Discussão**

A inoculação com rizóbios aumentou a produção de matéria seca da parte aérea das plantas (Figura 5.1). Este estímulo no crescimento do arroz foi maior com as doses de nitrogênio aplicadas, para todos os isolados testados. O isolado UFRGS-VP16 destacou-se por estimular a produção de parte aérea de arroz em 21%, sem aplicação de nitrogênio. Com a aplicação de 160 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, o rizóbio UFRGS-Lg111 incrementou em 60% a produção de matéria seca da parte aérea. Na média entre todos os isolados testados, a matéria seca da parte aérea foi incrementada pelos rizóbios em 11, 22, 30 e 40%, nas doses de 0, 40, 80 e 160 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, respectivamente. Estes valores são superiores aos observados por Mishra et al. (2006), que estudaram dois isolados de rizóbios, em arroz, e obtiveram incremento de 5,14% na matéria seca da parte aérea das plantas. Estes autores também observaram que os isolados produziram ácidos fenólicos, promovendo a resistência das plantas de arroz ao ataque de *Rhizoctonia solani*. Em outros trabalhos, foram observados aumentos de 19% (Biswas et al., 2000) e de 32%

(Chi et al., 2005) na produção de matéria seca da parte aérea de plantas de arroz inoculadas com diferentes estirpes de rizóbios.



**FIGURA 5.1.** Matéria seca da parte aérea de plantas de arroz (cultivar IRGA 424), sem inoculação e inoculadas com os rizóbios UFRGS-Lc336 (A), UFRGS-Lc348 (B), UFRGS-Lc398 (C), UFRGS-LG111 (D), UFRGS-Ls36 (E), EEL1183(F), UFRGS-VP16 (G) e UFRGS-1TV (H), em doses crescentes de nitrogênio.

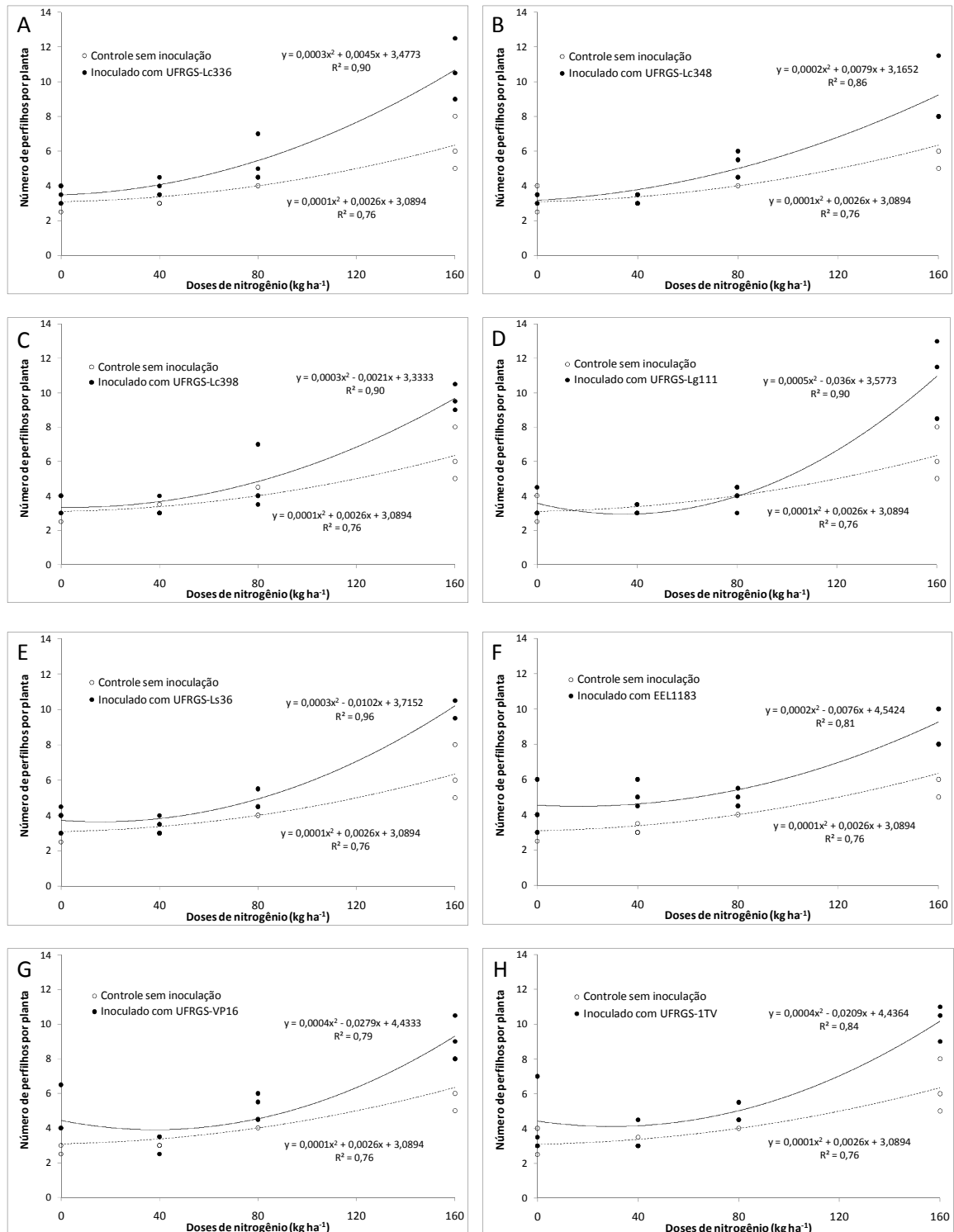


Os resultados obtidos mostram que o uso de rizóbios permitiu a produção da mesma quantidade de matéria seca da parte aérea, em doses menores de nitrogênio, em relação aos tratamentos sem inoculação. O isolado UFRGS-Lc336, associado a uma dose de 60 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, proporcionou uma produção de matéria de parte aérea equivalente ao obtido com a dose de 160 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, sem inoculação de rizóbios (Figura 5.1A). Supondo que a produtividade de arroz esteja diretamente relacionada com a produção de matéria seca, pode-se dizer que a inoculação com o isolado UFRGS-Lc336 proporciona uma economia na adubação nitrogenada. Essa estimativa de economia de nitrogênio foi observada em todos os tratamentos inoculados. Mesmo o isolado UFRGS-Lc398, que foi o menos eficiente entre os rizóbios testados, proporcionou uma economia estimada de 63 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio (Figura 5.1C).

A inoculação com os rizóbios também estimulou o perfilhamento (Figura 5.2). Em plantas, sem aplicação de nitrogênio, o isolado EEL1183 aumentou em 47% a emissão de perfilhos. Este mesmo rizóbio também estimulou a produção de matéria da parte aérea, sem aplicação de nitrogênio. Na dose de 160 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, o isolado UFRGS-Lc336 estimulou o perfilhamento em 96%. Na média entre todos os rizóbios estudados, a emissão de perfilhos foi incrementada pela inoculação em 24, 16, 27 e 70%, nas doses de 0, 40, 80 e 160 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, respectivamente. Quando se aplicou 160 kg ha<sup>-1</sup>, o número de perfilhos foi de seis por planta de arroz sem inoculação, mas quando as plantas foram inoculadas com rizóbios, a média do número de perfilhos por planta foi de dez. O aumento do número de perfilhos por planta é de extrema importância para a produção de arroz, pois cada perfilho poderá formar uma panícula, gerando uma maior produção de panículas e maior rendimento de grãos (SOSBAI, 2007). Em um estudo feito na Índia, o número de panículas de arroz aumentou em média 23,3% quando as plantas foram inoculadas com estirpes de rizóbios (Mishra et al., 2006).

Ao se ajustar a emissão de perfilhos com o intervalo de doses de nitrogênio testado, entre 0 e 160 kg ha<sup>-1</sup>, as equações mais adequadas são as quadráticas, para todos os tratamentos. Percebe-se que até a dose de 80 kg ha<sup>-1</sup>, o número de perfilhos das plantas inoculadas pouco se altera, sendo muito próximo ao número de perfilhos do tratamento controle. No entanto, após

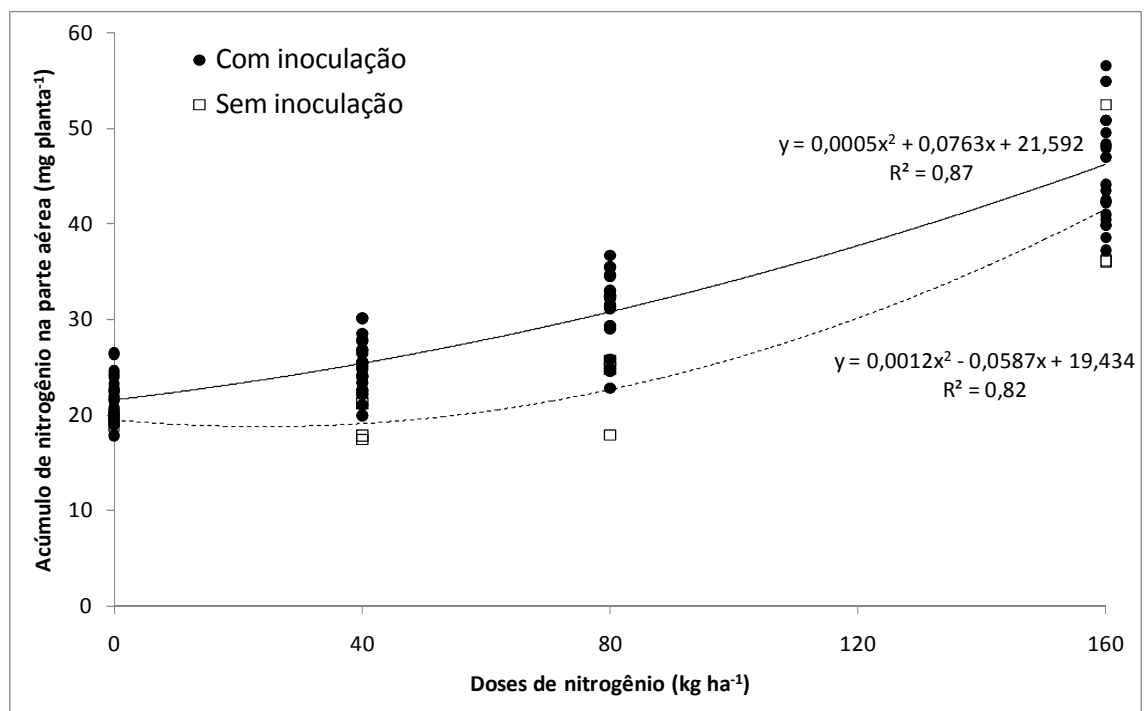
esta dose intermediária, o número de perfilhos aumenta significativamente, chegando a dobrar no intervalo entre 80 e 160 kg ha<sup>-1</sup>.



**FIGURA 5.2.** Perfilhamento de arroz (cultivar IRGA 424), sem inoculação e inoculadas com os rizóbios UFRGS-Lc336 (A), UFRGS-Lc348 (B), UFRGS-Lc398 (C), UFRGS-LG111 (D), UFRGS-Ls36 (E), EEL1183 (F), UFRGS-VP16 (G) e UFRGS-1TV (H) em doses crescentes de nitrogênio.

Além da possível economia que as estirpes de rizóbios podem proporcionar na cultura de arroz, referente ao uso de fertilizantes nitrogenados,

estes resultados também mostram que a inoculação com estes microrganismos melhora o aproveitamento do nitrogênio do solo. A quantidade de nitrogênio absorvida e acumulada pela parte aérea das plantas de arroz aumentou com as doses de nitrogênio (figura 5.3). Este incremento foi maior quando as plantas foram inoculadas com os isolados de rizóbios. Percebe-se que até a dose de  $80 \text{ kg ha}^{-1}$ , a quantidade acumulada de nitrogênio na parte aérea das plantas não inoculadas permaneceu próxima a 20 mg de nitrogênio por planta. Entretanto, nas plantas inoculadas, o acúmulo de nitrogênio na parte aérea passou de 22 para 31 mg de nitrogênio por planta, neste mesmo intervalo de doses nitrogenadas.



**FIGURA 5.3. Quantidade acumulada de nitrogênio, fósforo e potássio do solo pela parte aérea de plantas de arroz (cultivar IRGA 424), sem inoculação e inoculadas com isolados de rizóbios, em doses crescentes de nitrogênio.**

Nas condições experimentais, estimou-se que, com uma dose de nitrogênio de  $79,8 \text{ kg ha}^{-1}$ , é obtido o máximo incremento na absorção deste elemento, devido à inoculação com rizóbios. Este incremento, que é de 39%, é muito próximo ao observado por Biswas et al. (2000), de 32,2%, quando estes autores inocularam cinco estirpes de rizóbios no arroz.

Os resultados obtidos neste estudo reforçam o potencial de isolados de rizóbios em promover o crescimento de plantas de arroz, concordando com pesquisas realizadas em outros países (Biswas et al., 2000; Yanni et al, 2001; Chi et al., 2005; Mishra et al., 2006). O presente trabalho mostra que a inoculação de rizóbios em arroz pode ter grande importância para os orizicultores, pois com o elevado preço dos fertilizantes nitrogenados, a economia com esses insumos significaria redução nos custos da lavoura e aumento na renda agrícola. Além disso, com a maior absorção de nitrogênio pelas plantas inoculadas, poderia se diminuir as perdas com a adubação nitrogenada e a conseqüente poluição ambiental.

### **Conclusões**

- Os rizóbios estudados aumentam a produção de matéria seca da parte aérea e o perfilhamento das plantas da cultivar de arroz IRGA 424 e, a magnitude destes incrementos aumenta com as doses de nitrogênio aplicadas;
- A inoculação com rizóbios no arroz aumenta a absorção de nitrogênio mineral do solo;
- Os rizóbios testados apresentam potencial para serem utilizados em inoculação na cultura do arroz, visando estimular o crescimento das plantas e diminuir as adubações nitrogenadas.

### **Agradecimentos**

Ao Instituto Rio-Grandense do Arroz, por ceder as sementes de arroz, e ao pesquisador Edemar Brose, da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A., EPAGRI, Brasil., por ceder a estirpe EEL1183.

### **Referências**

BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B; YANNI, Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, v.92, n.5, p.880–886, 2000.

BREDOW, J. **Seleção de rizóbios para trevo branco**, 2005. 66 f. (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em ciência do solo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BROSE, E. Seleção de rizóbio para *Lotus pedunculatus* em solo ácido. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 27, n.3, p.409-415, 1992.

CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. Economical and environmental benefits of inoculation and biological nitrogen fixation with the soybean: situation in South America. **In: Proceedings; VII World Soybean Research Conference; IV International Soybean Processing and Utilization Conference; III Congresso Brasileiro de Soja (Brazilian Soybean Congress)**. Foz do Iguassu, PR, Brazil. 2004.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.B.; GILLIS, M.; DE LAUDIE, P.; DREYFUS, B. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, n.12, p.5437–5477, 2000.

CHI, F.; SHEN, S.H.; CHENG, H.P.; JING, Y.X.; YANNY, Y.G.; DAZZO, F.B. Ascending Migration of Endophytic Rhizobia, from Roots to Leaves, inside Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p.7271–7278, 2005.

CHEN, X.; FENG, J.; HOU, B.; LI, F.; LI, Q.; HONG, G. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, v.33, n.8, p.2540-2548, 2005.

CQFS - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Núcleo Regional Sul. 10ed, 400p. Porto Alegre, 2004.

DUTTA, S.; MISHRA, A.K.; DILEEP KUMAR, B.K. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**. doi:10.1016/j.soilbio.2007.09.009, 2007.

DUARTE, F. M.; POCOJESKI, E.; SILVA, L. S.; GRAUPE, F. A.; BRITZKE, D. Perdas de nitrogênio por volatilização de amônia com aplicação de uréia em solo de várzea com diferentes níveis de umidade. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.705-711, 2007.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema SISVAR para análises estatísticas**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000. 66p.

FONTOURA, R. A. **Isolamento de rizóbios nativos para *Lotus subbiflorus* e *L. glaber* em solos do Rio Grande do Sul**. 2007. 82 f. (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FRIZZO, M. L. S. **Isolamento de rizóbios nativos para *Lotus corniculatus* e *L. uliginosus* em solos do Rio Grande do Sul**. 2007. 68 f. (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GIONGO, A.; AMBROSINI, A.; VARGAS, L. K.; FREIRE, J. R. J.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. P. Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] isolated from South Brazilian fields. **Applied Soil Ecology**. v.38, n.3, p.261–269, 2008.

MANTELIN, S.; TOURAINE, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.394, p. 27-34, 2004.

MATSON, P.A.; NAYLOR, R.; MONASTERIO, O. Integration of environmental, agronomic, and economic aspects of fertilizer management. **Science**, v.280, n.3, 1998.

MISHRA, R. P. N.; SINGH, R. K.; JAISWAL, H. K.; KUMAR, V.; MAURYA, S. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, v.52, n.5, p.383–389, 2006.

PERRINE-WALKER, F. M.; PRAYITNO, J.; ROLFE, B. G.; WEINMAN, J.J.; HOCART, C. H. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.12, p.3343–3350, 2007.

RAUN, W. R.; JOHNSON, G.V. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. **Agronomy Journal**, Madison, v.91, n.3, p.357-363, 1999.

REDDY, P.M.; LADHA, J.K.; SO, R.B.; HERNANDEZ, R.J.; RAMOS, M.C.; ANGELES, O.R.; DAZZO, F.B.; DE BRUIJN, F.J. Rhizobial communication with rice roots: Induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. **Plant and Soil**, v.194, n.1-2, p.81–98, 1997.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, n.6, p.1367-1380, 2007.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, n.4-5, p.319-339, 1999.

SANDOWSKY, J.; KOSSLAR, M.; MADRZAK, J.; GOLINSK, B.; CREGAN, B. Restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* is mediated by factors present in the roots of *Glycine max*. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, n.2, p.832-836, 1995.

SCHRÖDER, J. J.; NEETSON, J. J.; OENEMA, O.; STRUIK, P. C. Does the crop or the soil indicate how to save nitrogen in maize production? Reviewing the state of art. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.66, n.1, p.151-164, 2000.

SINGH, R.K.; MISHRA, R.P.N.; JAISWAL, H.K.; KUMAR, V.; PANDEY, S.P.; RAO, S.B.; ANNAPURNA, K. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from Rice (*Oryza sativa* L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis. **Current Microbiology**, v.52, n.2, p.117–122, 2006.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **Federation of European Microbiological**, v31, p.425-448, 2007.

SOSBAI - SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. Arroz Irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. IN CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO. **5ª Reunião da Cultura do Arroz Irrigado**. Pelotas, 2007.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 215p. (Boletim Técnico, 5).

YANNI, Y.G.; RIZK, E.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.G.; DE BRUIJN, F.J.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T.M.; MATEOS, P.F.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, v.194, n.1-2, p.99–114, 1997.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; ABD EL-FATTAH, F.K.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJN, F.; REDEMAKER, J., MAYA-FLORES, J.; OSTROM, P.; VEGA-HERNANDEZ, M.; HOLLINGSWORTH, R.I.; MARTINEZ-MOLINA, E.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; MATEOS, P.F.; VELASQUEZ, E.; TRIPLETT, E.; UMALI-GARCIA, M.; ANARNA, J.A.; ROLFE, B.G.; LADHA, J.K.; HILL, J.; MUJOO, R.; NG, P.K.; DAZZO, F.B. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolli* with rice roots. **Australian Journal Plant of Physiology**, v.28, n.9, p.845-870, 2001.

## 6. ESTUDO IV

### **Produção de ácido indol acético e colonização de plantas de lótus (*Lotus corniculatus*), trevo vesiculoso (*Trifolium vesiculosum*) e arroz (*Oryza sativa*) por rizóbios nativos do sul do Brasil**

#### **Introdução**

O sul do Brasil é responsável por mais da metade da produção de arroz do país, sendo que nessa região, o cultivo de arroz está situado em relevo plano, com irrigação por inundação. A produtividade de arroz nessas áreas depende de elevadas doses de fertilizantes nitrogenados. Com a elevação dos preços destes insumos a nível mundial, a cultura do arroz tem se tornado muito onerosa para os agricultores. Além disso, as perdas de nitrogênio do sistema solo-planta, em virtude do uso de altas doses de nitrogênio no solo, são responsáveis pela contaminação de recursos hídricos e pelo aumento do efeito estufa (Bhattacharjee et al., 2008).

Nas áreas de produção de arroz, a criação de bovinos na entressafra é prática comum nessa região do Brasil. No entanto, em virtude do relevo e do inverno chuvoso, o estabelecimento de pastagens é uma prática difícil (Marchezan et al., 2002). Por outro lado, espécies leguminosas forrageiras, como as pertencentes ao gênero *Trifolium* e *Lotus*, e sua simbiose com rizóbios, tem sido avaliadas quanto à resistência a períodos de alagamentos (Lupwayi et al., 1997), o que permitiria a rotação cultural com o arroz. Com a fixação biológica de nitrogênio, realizada por rizóbios em simbiose com estas leguminosas, poderia haver uma diminuição da necessidade de fertilização nitrogenada para a cultura do arroz, e



conseqüentemente, dos custos de produção e da contaminação ambiental (Cho et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que rizóbios podem colonizar arroz (Reddy et al., 1997, Chaintreuil et al., 2000; Chi et al., 2005). Por não terem a capacidade de formarem nódulos, o rizóbios não fixam nitrogênio no arroz. No entanto, estes mesmos estudos indicam que a inoculação com rizóbios estimula a germinação, o crescimento e o desenvolvimento do arroz (Chi et al., 2005, Singh et al., 2006, Yanni et al., 2007; Yanni et al., 2001). Atribui-se como mecanismos de promoção de crescimento neste caso, a biossíntese de hormônios vegetais, como o ácido indol acético (AIA). Os rizóbios também podem estimular a produção de compostos fenólicos e, conseqüentemente, aumentar a resistência de arroz a fungos patogênicos (Mishra et al., 2006).

A colonização de rizóbios em gramíneas ocorre diferentemente do que em leguminosas (Reddy et al, 1997; Chi et al., 2005). A entrada de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* em *Trifolium repens* pode ocorrer via pelos radiculares, via aberturas radiculares ou pela própria epiderme intacta (Kodama, 1992). Em arroz, os rizóbios penetram nas raízes via fissuras radiculares criadas na emergência das raízes secundárias (Reddy et al., 1997; Yanni et al., 1997; Prayitino et al., 1999).

A síntese de auxina, particularmente AIA, por microrganismos endofíticos, promove o crescimento das raízes e a proliferação de pêlos radiculares, melhorando a absorção de água e nutrientes do solo e, conseqüentemente, melhorando o desenvolvimento da planta (Caballero-Mellado et al., 2006). Diferentes rotas metabólicas de biossíntese de AIA já foram identificadas em bactérias (Spaepen et al, 2007). O triptofano é tido como o principal precursor de AIA. A rota de indol-3-acetamida (IAM) é que se apresenta melhor caracterizada por bactérias. Nessa rota, o triptofano é convertido em IAM pela enzima triptofano monoxigenase (IaaH) e a IAM em AIA, pela enzima IAM-hidrolase. A enzima triptofano monoxigenase já foi identificada em *Agrobacterium tumefaciens* (Goodner et al, 2001; Wood et al, 2001)

A rota indol-3-piruvato (IPyA) é a rota de síntese de AIA predominante em plantas. No entanto, já foi identificada em bactérias como *Bradyrhizobium* (Giraud et al., 2007). Pela ação de uma aminotransferase, o

triptofano é convertido em indol-3-piruvato. Este composto é descarboxilado, convertendo-se em indol-3-acetaldeído. A descarboxilação ocorre pela ação de indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC). Finalmente, o indol-3-acetaldeído é oxidado a AIA. Outra rota de produção de AIA é a rota da triptamida (TAM). Essa rota consiste na transformação de triptofano em TAM, pela ação da triptofano descarboxilase, e a TAM é diretamente convertida em indol-3-acetaldeído, por uma amino-oxidase. A rota TAM ocorre principalmente em plantas, porém a atividade de triptofano descarboxilase foi identificada em *Mesorhizobium loti* (Kaneko et al., 2000). A rota do indol-acetonitrilo (IAN) não está ainda bem definida. É possível que o triptofano seja convertido em indol-3-indoldoxima ou indol-3-glicobrassicin e estes compostos sejam convertidos em IAN. O IAN então pode ser convertido diretamente em AIA por ação de uma nitrilase ou transformado em indol-3-acetamida, por ação de uma enzima nitrilo hidratase. Em *Bradyrhizobium japonicum* foi identificada a enzima nitrilase (Kaneko, 2002). Enzimas nitrilo hidratase já foram identificadas em *Rhizobium etli* (Gonzalez et al., 2006), *Rhizobium leguminosarum* (Young et al., 2006), *Bradyrhizobium* sp. (Giraud et al., 2007), *Sinorhizobium meliloti* (Capela et al., 2001; Galibert et al., 2001).

O uso de rizóbios em áreas de rotação de arroz com forrageiras leguminosas pode ser uma excelente alternativa para aumento da produção tanto de arroz, quanto de forrageiras e, conseqüentemente, de gado. Durante o inverno, as bactérias estariam nodulando e fixando o nitrogênio para o bom desenvolvimento das forrageiras. Os resíduos destas plantas forneceriam nitrogênio para o arroz. Os rizóbios ao permanecerem no solo, colonizariam as plantas de arroz e estimulariam seu crescimento.

O objetivo desta pesquisa é estudar a capacidade de rizóbios nativos isolados de solos do sul do Brasil, de produção de ácido indol acético e de colonização de plantas de arroz, de trevo vesiculoso e de lotus.

## **Material e Métodos**

**Isolados de rizóbios:** Os rizóbios em estudo foram: UFRGS-LC336 (Frizzo, 2007), UFRGS-LG111 (Fontoura, 2007) e UFRGS-1TV (Bredow, 2005), isolados de amostras de solo, sob campo nativo, no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Tabela 6.1). Para o isolamento, foram realizadas

suspensões de 10 g de solo em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%). Foi adicionado 10 mL dessa suspensão em vasos plásticos, com plantas leguminosas armadilhas, em casa de vegetação. Os vasos continham 500 dm<sup>3</sup> de substrato autoclavado (vermiculita e areia, na proporção 2:1). As plantas armadilhas pertenciam às espécies de *Trifolium vesiculosum*, *Lotus corniculatus* e *L. glaber*. Os nódulos obtidos foram previamente desinfestados, com lavagens sucessivas com álcool (70%), hipoclorito de sódio (0,3%) e água destilada esterilizada. Após foram macerados em uma gota de água estéril em placas contendo meio levedura manitol ágar com vermelho congo, denominado meio LM (Vicent, 1970). Os isolados de rizóbios obtidos foram purificados por repicagens sucessivas em placas com meio LM. Após a obtenção de colônias homogêneas e com características persistentes, os isolados foram transferidos para tubos contendo meio ágar levedura-manitol e incubados por quatro dias a 28°C, sendo armazenados sob refrigeração.

**TABELA 6.1. Isolados de rizóbios utilizados no estudo IV**

<b>Isolado</b>	<b>Local de Coleta</b>	<b>Planta armadilha</b>
UFRGS-LC336	Hulha Negra, RS, Brasil	<i>Lotus corniculatus</i>
UFRGS-LG111	Porto Alegre, RS, Brasil	<i>Lotus glaber</i>
UFRGS-1TV	Dom Pedrito, RS, Brasil	<i>Trifolium vesiculosum</i>

**Caracterização genotípica dos isolados:** Foi realizada purificação de DNA cromossômico das bactérias pelo protocolo de extração de DNA de bactérias gram negativas do “Genomic DNA Kit – Bio-Rad”. Para amplificação do gene 16S foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores rD1 (AAGGAGGTGATCCARCC) e fD1 (AGAGTTTGATYMTGGCTCAG), nas seguintes condições de PCR: desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C, 30 ciclos, contendo cada um 30 segundos de desnaturação a 94 °C, 45 segundos de anelamento a 58 °C e 1 minuto para alongação a 72 °C, seguido de 5 minutos de alongação a 72 °C. Os produtos de PCR (15µl) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% e documentados. A quantidade restante do produto de PCR foi ligada em plasmídeo PCR<sup>®</sup>2.1, e este, inserido em células competentes de *E. coli* (The TA Original Cloning Kit – Invitrogen<sup>®</sup>) para

clonagem deste plasmídeo. O DNA plasmidal foi extraído com o “High Pure Plasmid Isolation Kit – Roche” e enviado para seqüenciamento na empresa Macrogem, Coréia. Para cada seqüência foi realizado BLAST, pelo NCBI HomePage.

**Determinação dos genes *nif* e *nod*:** O DNA dos rizóbios foi extraído como descrito anteriormente e foram utilizados os oligonucleotídeos nodAB1 (CAGATCNAGDCCBTTGAARCGCA) e nodAB2 (CTNCGNGCCCARCGNAGTTG) para amplificação de parte do gene *nodB*, em PCR nas seguintes condições: desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, 30 ciclos, contendo cada um 30 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 62°C e 1 minuto para alongação a 72°C, seguido de 5 minutos de alongação a 72°C. Para amplificar os genes NIF foram usados os oligonucleotídeos IGK (TACGGYAARGGBGGYATCGG) e NDR (TTGGAGCCGGCRTANGCRCA) para as bactérias UFRGS-Lg111 e UFRGS-1TV e os oligonucleotídeos nIGK (AAGGGCGGTATCGGCAAGTC) e nNDR (TTSGARCCGGCGTASGCGCA) para a bactéria UFRGS-Lc336.

Os produtos de PCR (15µl) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% e documentados. A quantidade restante do produto de PCR foi ligada em plasmídeo PCR<sup>®</sup>2.1, e este inserido em células competentes de *E. coli* (The TA Original Cloning Kit – Invitrogen<sup>®</sup>) para clonagem deste plasmídeo. O DNA plasmidal foi extraído com o “High Pure Plasmid Isolation Kit – Roche” e enviado para seqüenciamento na empresa Macrogem, Coréia. Para cada seqüência foi realizado BLAST, pelo NCBI HomePage.

#### **Determinação da produção de ácido indol acético:**

Foram obtidos pré-cultivos das bactérias, em 5 mL de meio PY. As células foram lavadas com MgSO<sub>4</sub> 10 mM, e a densidade ótica determinada por espectrofotometria a 600 nm. Inoculou-se 1mL de pré-cultivo ajustado para uma densidade ótica de 0,2, em meio para determinação de indóis (Jain y Patriquin, 1985), com e sem triptofano. A bactéria UFRGS-Lc336 foi incubada por 72 horas e as bactérias UFRGS-Lg111 e UFRGS-1TV por 48 horas. Do caldo crescido, tomou-se 41 mL que foram centrifugados a 8000 rpm por 5 minutos. Do sobrenadante tomou-se 1mL para detecção qualitativa de indoles,

misturando-se 1 mL de solução de Salkowski (12 g de cloreto férrico por litro de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,9M). Adicionou-se 40 mL de acetato de etílico nos 40 mL de sobrenadante restante (com pH ajustado para 2,5 a 3,0). Após 1 hora, a fase inferior foi descartada com pipeta. Realizou-se a secagem em rotoevaporador a 50°C. O precipitado foi ressuspendido em 1 mL de acetonitrilo e filtrado em filtros millex-GV. O AIA foi detectado por HPLC, com uma coluna C18 de fase reversa TSKgel (N. S0448). Como fase móvel se utilizou tampão de acetonitrilo (40%) e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,1%), com fluxo constante de 1 mL min<sup>-1</sup>.

#### **Identificação das rotas de produção de ácido indol acético:**

Foram realizados PCR com oligonucleotídeos que amplificam genes envolvidos na biossíntese de AIA, em *Azospirillum*, *Bulkholderia* e *Pseudomonas* (Tabela 6.2). Com base nas sequências do banco de genes NCBI, também foram desenhados oligonucleotídeos específicos para rizobiales, para amplificar o gene da indol piruvato descarboxilase (iPDC) e da nitrilo hidratase. Para o gene iPDC foram desenhados quatro oligonucleotídeos: ipdCRhi-1F (CGCGAGATCTTCGGCATTCC), ipdCRhi-1R (CACGTCCACCACGATCACCG), ipdCRhi-2F (CCGCTCTATCTCGAATTCCC) e ipdCRhi-2R (GTATCCGACAGGATCACGCC) e para a nitrilo hidratase, três oligonucleotídeos: nthAF (GTGTGCACGCTGTGCTCCT), nthAR (ACCGTGTAGAGCCATTGCG), e nthBR(CGGCGGTGGAATCCCAGAC). As condições de PCR, as ligações dos produtos de PCR e as clonagens de plasmídeos para seqüenciamento foram realizadas como descrito anteriormente.

**Inserção do gene GUS nas bactérias:** A inserção do gene Gus nos rizóbios ocorreu pelo princípio da conjugação de plasmídeo contendo o gene Gus e resistência a antibióticos específicos. Para seleção das cepas participantes da conjugação, realizou-se seleção por meio de antibióticos. As bactérias foram crescidas em 7 mL de meio líquido por 24 horas, como segue: o isolado UFRGS-Lc336 foi crescido em meio LM contendo ácido nalidíxico (20 µg mL<sup>-1</sup>); o isolado UFRGS-Lg111 crescido em meio PY contendo ácido nalidíxico (20 µg mL<sup>-1</sup>); o isolado UFRGS-1TV em meio PY contendo espectinomicina (50 µg mL<sup>-1</sup>), e as estirpes de *E. coli*, doadora e intermediária

(helper), crescidas em meio LB, contendo kanamicina ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Para o isolado UFRGS-Lc336, tomou-se 5 mL de caldo de crescimento após 72 horas de incubação. Centrifugou-se por 1 minuto a 13000 rpm e o pélete foi lavado em 1 mL de meio PSY (Regensburger & Hennecke, 1983) por três vezes, sendo que após a terceira centrifugação, o pélete foi ressuscitado em 100 mL de meio PSY. Em outro tubo estéril foi colocado 50 mL da suspensão contendo o rizóbio, com 25 mL da suspensão contendo a bactéria doadora e com 25 mL da solução contendo a bactéria helper. A mistura foi inoculada no centro de uma placa contendo meio PSY sólido e incubada por 48 horas. A matéria bacteriana obtida na placa foi transferida com palito estéril para tubo de 1,5 mL e ressuscitada em 1 mL de  $\text{MgSO}_4$  10 mM. Foram realizadas diluições de  $10^1$  a  $10^5$  vezes. Todas as diluições foram inoculadas em placas contendo meio Bergersen sólido contendo kanamicina ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e ácido nalidíxico ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Para o isolado UFRGS-Lg111, tomou-se 1 mL de caldo crescido por 24 horas, centrifugou-se a 13.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi lavado em 1 mL de  $\text{MgSO}_4$  10 mM, por três vezes, sendo que após a terceira centrifugação, o pélete foi ressuscitado em 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4$  10 mM. Em outro tubo estéril foi colocado 50 mL da suspensão contendo o rizóbio, com 25 mL da suspensão contendo a bactéria doadora e com 25 mL da solução contendo a bactéria helper. A mistura foi colocada em placa contendo meio sólido PY e incubada por 24 horas. Com um palito estéril, a matéria bacteriana crescida foi transferida para tubo estéril e ressuscitada em 1 mL de  $\text{MgSO}_4$  10 mM e realizadas diluições de  $10^1$  a  $10^5$  vezes. Todas as diluições foram inoculadas em placas de petri contendo meio PY sólido, kanamicina ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e ácido nalidíxico ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

O procedimento de marcação do isolado UFRGS-1TV foi similar ao do isolado UFRGS-Lg111. No entanto, o meio para seleção continha espectinomicina ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em vez de ácido nalidíxico e as bactérias doadora e intermediária eram suscetíveis a espectinomicina na dose de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

As colônias crescidas após 48 horas de incubação foram inoculadas em placas de meio LM contendo X-gluc. As colônias azuis foram selecionadas, para comparação com a bactéria "wild type", por PCR, para amplificação com os oligonucleotídeos nodAB1 e nodAB2. As colônias que apresentaram o

mesmo perfil de bandas que seu “wild type” foram posteriormente inoculadas em plantas.

**Inoculação em plantas e determinação da colonização:** As sementes utilizadas foram tratadas com lavagens sucessivas com álcool (70%), hipoclorito de sódio (0,3%) e água destilada esterilizada. As sementes das leguminosas foram semeadas em tubos de 100 mL (uma semente por tubo), contendo 35 mL de solução nutritiva (Fahraeus, 1957) isenta de nitrogênio, contendo 0,75% de ágar. As sementes de arroz foram semeadas em erlenmeyers contendo 210 mL de solução nutritiva, com 0,75% de ágar. Tanto nos tubos quanto nos erlenmeyers, a parte contendo o ágar foi coberta com papel escuro para favorecer o desenvolvimento das raízes.

Para a inoculação, as bactérias contendo o gene Gus foram crescidas em 5mL de meio PY por 24 horas. O número de células de cada inoculo foi ajustado, por determinação da turbidez celular em espectrofotômetro a 600 nm. Um dia após a semeadura, cada unidade experimental foi inoculada com os rizóbios.

Após duas semanas para o arroz e após três semanas para as leguminosas, as plântulas foram retiradas do meio nutritivo e colocadas em tubos falcon de 15 mL, e submersas em tampão de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50mM contendo 2 mM de X-Gluc, e incubadas a 37 °C por 48 horas para coloração das bactérias contendo o gene GUS.

As plantas foram fotografadas com câmera digital Canon Power Shot A 620 acoplada em microscópio Zeiss Stemi SV6.

### **Resultados e discussão**

De acordo com o seqüenciamento dos fragmentos 16s, determinou-se que o isolado UFRGS-Lc336 pertence à espécie *Bradyrhizobium japonicum*, que o isolado UFRGS-Lg111 pertence à espécie *Mesorhizobium amorphae* e que o isolado UFRGS-1TV pertence à espécie *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

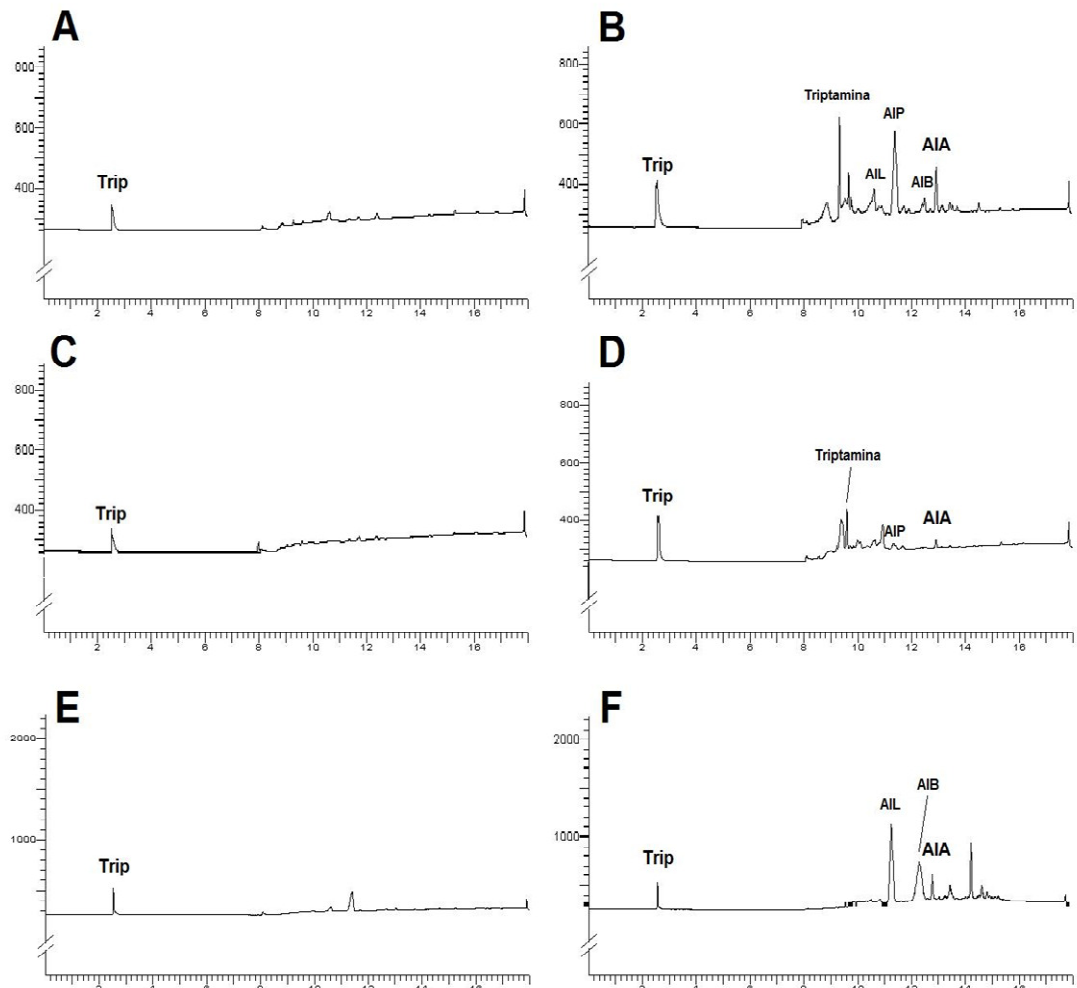
Com os oligonucleotídeos nIGK e nNDR foi amplificado o gene NifH em *Bradyrhizobium japonicum* UFRGS-Lc336. A seqüência amplificada apresenta 100% de identidade com a seqüência de NifH identificada em

*Bradyrhizobium canariense* por Appunu et al. (2008). Parte da seqüência amplificada com os oligonucleotídeos IGK e NDR em *Mesorhizobium amorphae* UFRGS-Lg111 correspondeu, com 100% de identidade ao gene NifD e parte à 97% ao gene nifH em *Mesorhizobium loti* (Kaneko et al., 2000; Sullivan et al., 2002). Em *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UFRGS-1TV, estes mesmos oligonucleotídeos amplificaram com 94% de identidade um gene regulador de transcrição, envolvido no controle do metabolismo secundário e na virulência em bactérias dessa mesma espécie (Young et al., 2006).

Os oligonucleotídeos nodAB1 e nodAB2 amplificaram fragmentos referentes aos genes de nodulação (Nod) apenas em *M.amorphae* UFRGS-Lg111 e em *R.leguminosarum* UFRGS-1TV. No primeiro foi amplificada uma seqüência 97% idêntica ao gene que codifica a proteína de nodulação NoeK de *M.loti* (Kaneko et al., 2000; Sullivan et al., 2002). Em *R. leguminosarum* UFRGS-1TV a seqüência amplificada apresentou 95% de identidade ao gene nodB de *Rhizobium* sp. (Wernegreen & Riley, 1999).

A produção de AIA foi confirmada por cromatografia líquida (Figura 6.1). As rotas de produção de AIA nas três bactérias estudadas são dependentes de triptofano, pois na ausência deste aminoácido (Figura 6.1A, C e D), não se observou produção significativa de AIA. Em um trabalho similar, realizado por Perrine et al. (2004), também foi verificado que a produção de AIA foi estimulada pela presença de triptofano no meio de cultura. Senthilkumar et al. (2006) também detectaram produção de AIA em cultura de *Azorhizobium caulinodans*, crescida em meio suplementado com triptofano. Outros trabalhos sobre produção de AIA por estirpes de rizóbios determinaram a presença deste hormônio no interior dos tecidos de arroz. Chi et al. (2005) detectaram por cromatografia líquida, um acúmulo de AIA em folhas de arroz, inoculado com estirpes de *Azorhizobium caulinodans* e *Sinorhizobium meliloti*.





**FIGURA 6.1.** Cromatogramas da produção de indóis – ácido indol acético (AIA), ácido indol láctico (AIL), ácido indol butírico (AIB), ácido indol pirúvico (AIP) e triptamida por rizóbios na ausência e na presença de triptofano (Trip). A) *Bradyrhizobium japonicum* UFRGS-Lc336 sem triptofano; B) *B. japonicum* UFRGS-Lc336 com triptofano; C) *Mesorhizobium amorphae* UFRGS-Lg111 sem triptofano; D) *M. amorphae* UFRGS-Lg111 com triptofano; E) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UFRGS-1TV sem triptofano, F) *R. leguminosarum* bv. *viciae* UFRGS-1TV com triptofano.

Os oligonucleotídeos que amplificam genes envolvidos com a síntese de AIA em outras bactérias (Tabela 6.2) não foram eficientes para as três bactérias em estudo. Os oligonucleotídeos ipdCRhi-1F, ipdCRhi-1R, ipdCRhi-2F e ipdCRhi-2R, desenhados para amplificar o gene da indol-piruvato descarboxilase, também não foram eficazes para os três rizóbios estudados.

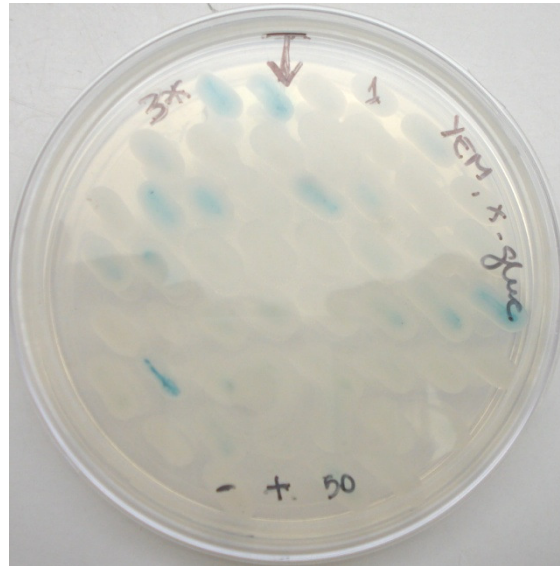
No entanto, quando utilizados os oligonucleotídeos nthAF e nthAR, para a enzima nitrilo-hidratase, foram amplificadas sequências nas três bactérias. Em *B. japonicum* UFRGS-Lc336, parte da sequência amplificada corresponde ao gene da subunidade alfa e parte à subunidade beta de nitrilo-hidratase de *B. japonicum* (Kaneko et al., 2002). Em *M. amorphae* UFRGS-Lg111 a sequência amplificada corresponde aos genes referentes às subunidades alfa e beta de nitrilo-hidratase de *M. loti* (Kaneko et al., 2000). Similarmente, em *R. leguminosarum* UFRGS-1TV, foram amplificados os genes referentes às subunidades alfa e beta de nitrilo-hidratase, idênticos aos determinados em *R. etli* (Gonzalez et al., 2008) e *R. leguminosarum* (Copeland et al., 2008). Com a identificação do gene da nitrilo hidratase nos rizóbios, e com a comprovação de que com adição de triptofano no meio, há produção de AIA, provavelmente a rota de biossíntese de AIA nos rizóbios estudados seja a rota do indol-3-acetonitrilo (IAN).

Após a conjugação entre a bactéria portadora do plasmídeo contendo o gene Gus, a bactéria helper e os rizóbios em estudo, foram obtidas colônias azuis (Figura 6.2). Via reações de PCR com os oligonucleotídeos nodAB1 e nodAB2, foi confirmado que as colônias azuis correspondiam aos rizóbios que tiveram a inserção do plasmídeo contendo o gene Gus.

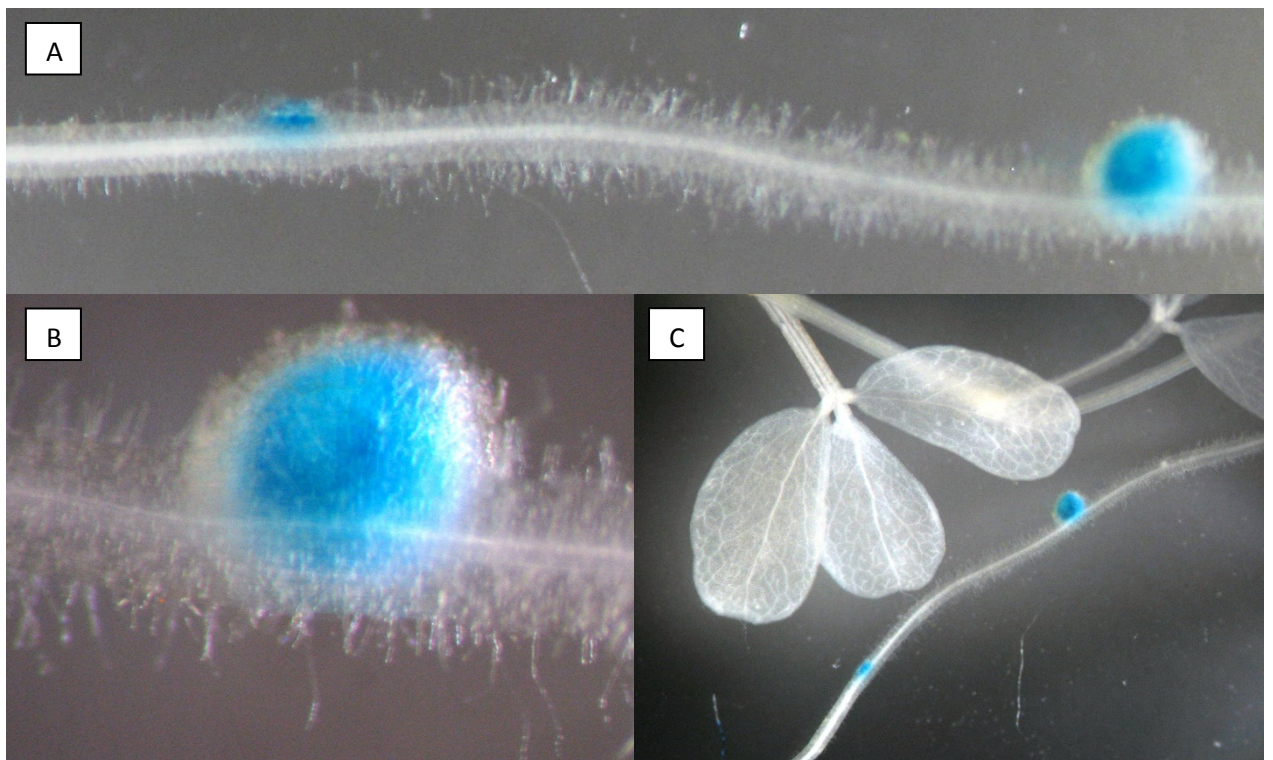
A colonização dos rizóbios nas plantas de *Lotus corniculatus*, *Trifolium vesiculosum* e *Oryza sativa* foi confirmada pela visualização da presença dos rizóbios contendo o gene Gus e expressando a coloração azul nas raízes e partes aéreas dessas plantas. Em plantas de *L. corniculatus*, a bactéria *M.amorphae* UFRGS-Lg111 penetrou nas raízes, concentrando-se nos primórdios nodais ou nos nódulos, (Figura 6.3). Não se observou colonização deste rizóbio na parte aérea de *L. corniculatus* (Figura 6.3C). De maneira muito similar, a bactéria *R. leguminosarum* bv. *viciae* UFRGS-1TV colonizou apenas as raízes de *T. leguminosarum*. A colonização das raízes também se concentrou na região de formação de nódulos e não houve colonização na parte aérea desta leguminosa (Figura 6.4).

**TABELA 6.2. Oligonucleotídeos empregados, sequência, tamanho do fragmento da amplificação, proteína e organismo de origem.**

Oligonucleotídeo	Seqüência	Tamanho da amplificação (pb)	Gene/Proteína	Organismo
TM1F	CTTTCGCCTTCGACGACTGG	550	Triptofano monoxigenase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
TM1R	GTAGAAGGTGCGGTCGTCCC			
PHYTM1F	TCACAAAGTTCATCACCGAC	700	Triptofano monoxigenase	<i>Burkholderia phymatum</i>
PHYTM1R	TTGATAGACAGGCAGAAAGC			
TRIPBF1	TACTTCGGCTTCGTSATYGG	350	Triptamida	<i>Burkholderia xenovorans</i>
TRIPBF2	GAAGCCGAGCACGCGCAGCG			
IPDCF4	GCAGTTCCAGGTGTTCAAGG	800	Indol piruvato descarboxilase	<i>Azospirillum brasiliense</i>
IPDCR4	ATGGCGGTGAACAGGCAGTC			

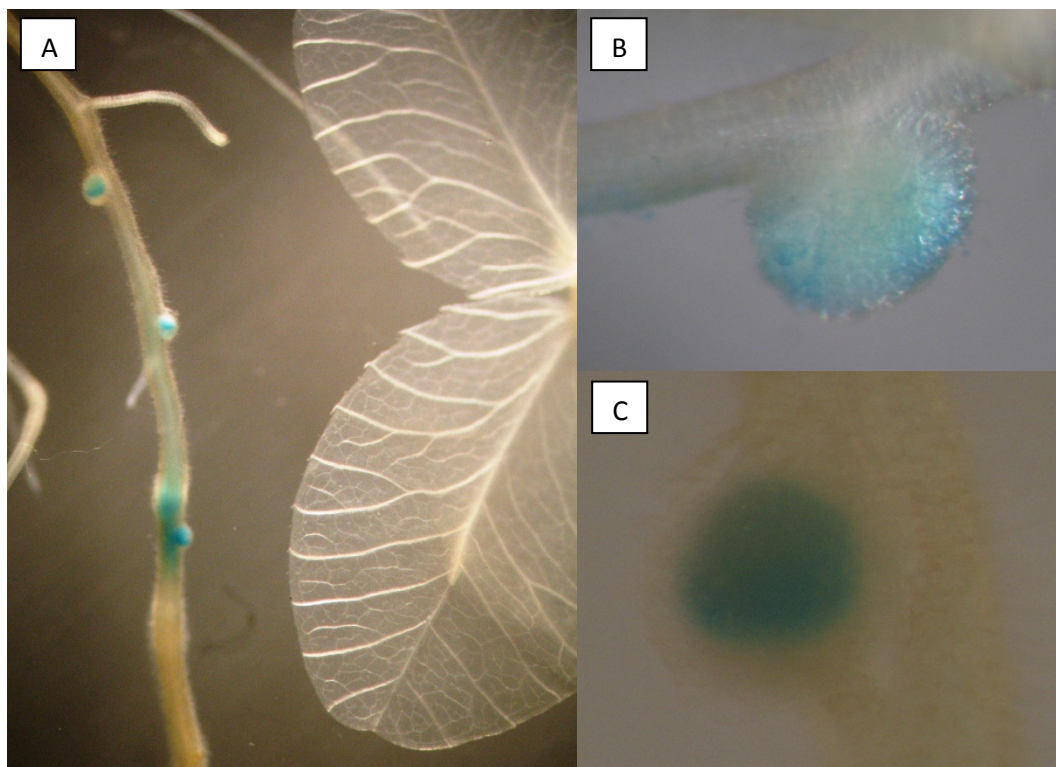


**FIGURA 6.2.** Placa de petri com colônias de rizóbios. As colônias azuis correspondem às bactérias que receberam o plasmídeo contendo o gene **Gus**.

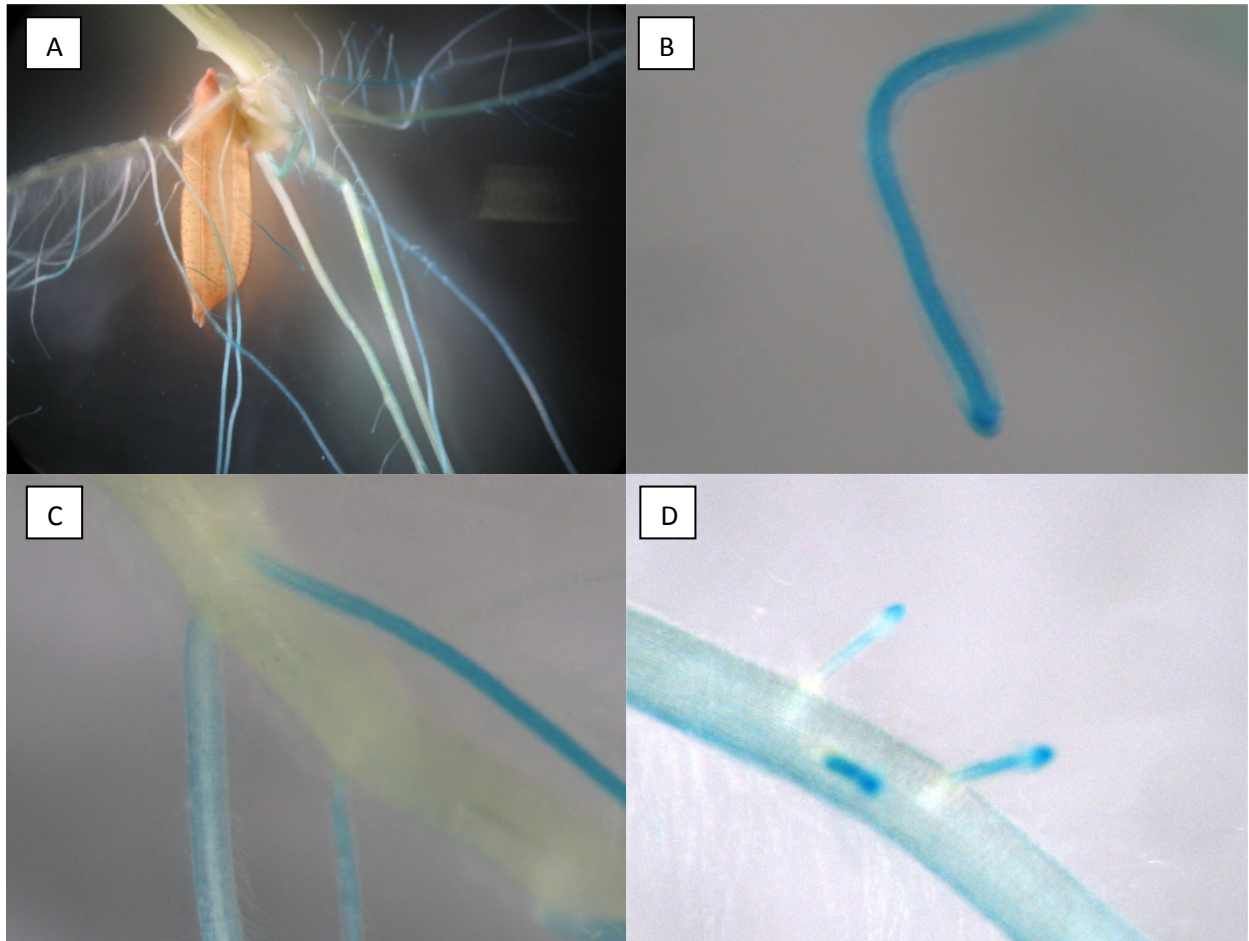


**FIGURA 6.3.** Colonização de *Mesorhizobium amorphae* UFRGS-Lg111 em plantas de *Lotus corniculatus*, (A) raiz contendo nódulo e primórdio nodais, (B) detalhe de nódulo, (C) raízes e folhas.

Nas plantas de arroz, os rizóbios estudados foram capazes de colonizar raízes e parte aérea (Figuras 6.5 e 6.6). Observou-se que os rizóbios colonizam preferencialmente as raízes secundárias de arroz. Esta observação concorda com trabalhos que afirmam que a entrada dos rizóbios ocorre em pontos onde as raízes secundárias são emitidas (Reddy et al., 1997; Chaintreuil et al., 2000; Chi et al., 2005; Perrine-Walker et al., 2007). Possivelmente, o rizóbio penetra nestes pontos e coloniza a epiderme e o córtex da raiz secundária.

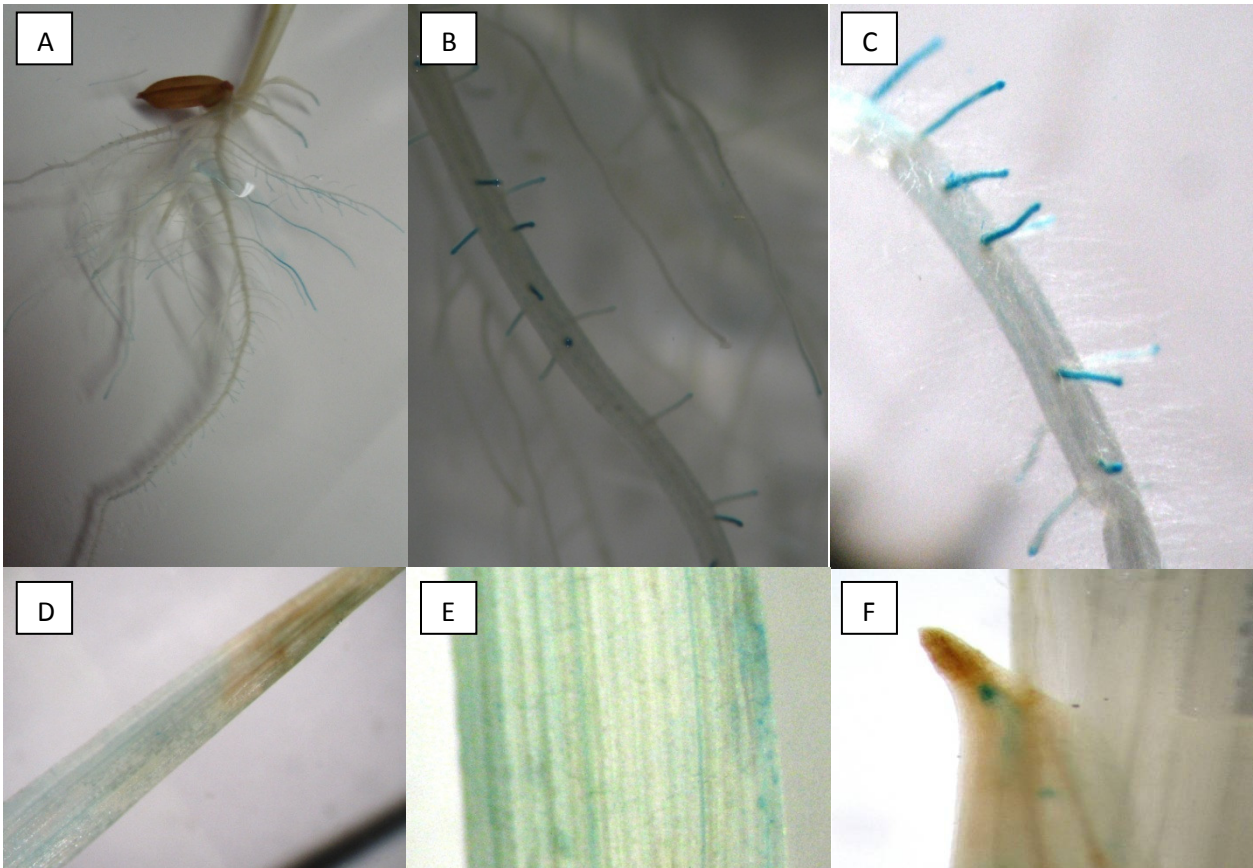


**FIGURA 6.4.** Colonização de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UFRGS-1TV em plantas de *Trifolium repens* (A) raízes e folha; (B, C) detalhe do nódulo.



**FIGURA 6.5.** Colonização de plantas de arroz por *Mesorhizobium amorphae* UFRGS-Lg111 (A) semente, caule e raízes, (B) detalhe de raiz secundária, (C, D) raiz primária com raízes secundárias.

Nas folhas, observou-se que a colonização ocorreu ordenada nos feixes vasculares (Figura 6.6D e E). A colonização da parte aérea de arroz só foi observada com a inoculação de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UFRGS-1TV. De acordo com Chi et al. (2005), as bactérias que penetram nas raízes de arroz seguem pelos espaços intercelulares, colonizando a epiderme, córtex e tecidos vasculares e aerênquima, ascendendo para o caule e folhas.



**FIGURA 6.6.** Colonização de plantas de arroz por *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UFRGS-1TV (A) semente, raiz e caule; (B, C) raiz principal com raízes secundárias, (D) folha, (E) nervuras da folha, (F) primórdio foliar.

### Conclusões

- Os rizóbios estudados produzem ácido indol acético (AIA), sendo o triptofano o provável precursor deste hormônio nestes microrganismos;
- O gene codificante da nitrilo-hidratase está presente nos isolados estudados, indicando que, possivelmente, a rota responsável pela biossíntese de AIA seja a do indol-3-acetonitrilo (IAN);
- Os rizóbios estudados não colonizam a parte aérea das leguminas testadas e, nas raízes, e a colonização concentra-se em nódulos ou em pontos de primórdios nodulares;

- No arroz, a colonização por rizóbios é mais abundante nas raízes secundárias. Na parte aérea verifica-se colonização quando as plantas de arroz são inoculadas com *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UFRGS-1TV.

## Referências

APPUNU, C.; N'ZOUÉ, A.; LAGUERRE, G. Genetic diversity of native *Bradyrhizobia* isolated from soybeans *Glycine max* L. in different agricultural-ecological-climatic regions of India. **Applied Environmental Microbiology**, v.74, n.19, p.5991-5996, 2008.

BHATTACHARJEE, R.B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.80, n.2, p.199-209, 2008.

BREDOW, J. **Seleção de rizóbios para trevo branco**. 2005. 66 f. (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CABALLERO-MELLADO, J. Microbiología agrícola y interacciones microbianas con plantas. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v.48, n.2, p.154-161, 2006.

CAPELA, D.; BARLOY-HUBLER, F.; GOUZY, J.; BOTHE, G.; AMPE, F.; BATUT, J.; BOISTARD, P.; BECKER, A.; BOUTRY, M.; CADIEU, E.; DREANO, S.; GLOUX, S.; GODRIE, T.; GOFFEAU, A.; KAHN, D.; KISS, E.; LELAURE, V.; MASUY, D.; POHL, T.; PORTETELLE, D.; PUEHLER, A.; PURNELLE, B.; RAMSPERGER, U.; RENARD, C.; THEBAULT, P.; VANDENBOL, M.; WEIDNER, S.; GALIBERT, F. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.17, p.9877-9882, 2001.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.B.; GILLIS, M.; DE LAUDIE, P.; DREYFUS, B. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, n.12, p.5437-5477, 2000.

CHI, F.; SHEN, S. H.; CHENG, H. P.; JING, Y. X.; YANNY, Y. G.; DAZZO, F. B. Ascending Migration of Endophytic Rhizobia, from Roots to Leaves, inside Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p.7271-7278, 2005

CHO, Y.S.; HIDAKA, K.; MINETA, T. Evaluation of white clover and rye grown in rotation with no-tilled rice. **Field Crops Research**, v.83, n.3, p.237-250, 2003.

COPELAND, A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; BARRY, K.; GLAVINA DEL RIO, T.; DALIN, E.; TICE, H.; BRUCE, D.; GOODWIN, L.; PITLUCK, S.; LARIMER, F.; LAND, M. L.; HAUSER, L., REEVE, W. G., RICHARDSON, P. Sequencing of the draft genome and assembly of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325. **US DOE Joint Genome Institute, 2800**, (Submetido) 2008



FAHRAEUS, G. The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. **Journal of General Microbiology**, v.16, p.374-381, 1957.

FONTOURA, R. A. **Isolamento de rizóbios nativos para *Lotus subbiflorus* e *L. glaber* em solos do Rio Grande do Sul**. 2007. 82 f. (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GALIBERT, F.; FINAN, T. M.; LONG, S. R.; PUHLER, A.; ABOLA, P.; AMPE, F.; BARLOY-HUBLER, F.; BARNETT, M. J.; BECKER, A.; BOISTARD, P.; BOTHE, G.; BOUTRY, M.; BOWSER, L.; BUHRMESTER, J.; CADIEU, E.; CAPELA, D.; CHAIN, P.; COWIE, A.; DAVIS, R. W.; DREANO, S.; FEDERSPIEL, N. A.; FISHER, R. F.; GLOUX, S.; GODRIE, T.; GOFFEAU, A.; GOLDING, B.; GOUZY, J.; GURJAL, M.; HERNANDEZ-LUCAS, I.; HONG, A.; HUIZAR, L.; HYMAN, R. W.; JONES, T.; KAHN, D.; KAHN, M. L.; KALMAN, S.; KEATING, D.H.; KISS, E.; KOMP, C.; LELAURE, V.; MASUY, D.; PALM, C.; PECK, M. C.; POHL, T. M.; PORTETELLE, D.; PURNELLE, B.; RAMSPERGER, U.; SURZYCKI, R.; THEBAULT, P.; VANDENBOL, M.; VORHOLTER, F. J.; WEIDNER, S.; WELLS, D. H.; WONG, K.; YEH, K.C.; BATUT, J. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*, **Science**, v.293, n.5530, p.668-672, 2001.

GIRAUD, E.; MOULIN, L.; VALLENET, D.; BARBE, V.; CYTRYN, E.; AVARRE, J. C.; JAUBERT, M.; SIMON, D.; CARTIEAUX, F.; PRIN, Y.; BENA, G.; HANNIBAL, L.; FARDOUX, J.; KOJADINOVIC, M.; VUILLET, L.; LAJUS, A.; CRUVEILLER, S.; ROUY, Z.; MANGENOT, S.; SEGURENS, B.; DOSSAT, C.; FRANCK, W. L.; CHANG, W. S.; SAUNDERS, E.; BRUCE, D.; RICHARDSON, P.; NORMAND, P.; DREYFUS, B.; PIGNOL, D.; STACEY, G.; EMERICH, D.; VERMEGLIO, A.; MEDIGUE, C.; SADOWSKY, M. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic *Bradyrhizobia*, **Science**, v.316, n.5829, p.1307-1312, 2007.

GONZALEZ, V.; SANTAMARIA, R. I.; BUSTOS, P.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; MEDRANO-SOTO, A.; MORENO-HAGELSIEB, G.; JANGA, S. C.; RAMIREZ, M. A.; JIMENEZ-JACINTO, V.; COLLADO-VIDES, J.; DAVILA, G. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.10, p.3834-3839, 2006.

GONZALEZ, V.; ACOSTA, J. L.; SANTAMARIA, R. I.; BUSTOS, P.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I. L.; FERNANDEZ, J. L.; DIAZ, R.; FLORES, M.; MORA, J.; PALACIOS, R.; DAVILA, G. Genome diversity and DNA divergence of *Rhizobium etli* (Submitted) **Genomica Evolutiva**, Centro de Ciencias Genomicas, UNAM, Mexico, 2008

GOODNER, B.; HINKLE, G.; GATTUNG, S.; MILLER, N.; BLANCHARD, M.; QUROLLO, B.; GOLDMAN, B. S.; CAO, Y.; ASKENAZI, M.; HALLING, C.; MULLIN, L.; HOUMIEL, K.; GORDON, J.; VAUDIN, M.; IARTCHOUK, O.; EPP, A.; LIU, F.; WOLLAM, C.; ALLINGER, M.; DOUGHTY, D.; SCOTT, C.; LAPPAS, C.; MARKELZ, B.; FLANAGAN, C.; CROWELL, C.; GURSON, J.; LOMO, C.; SEAR, C.; STRUB, G.; CIELO, C.; SLATER, S. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58, **Science**, v.294, n.5550, p.2323-2328, 2001.

JAIN, D. K.; PATRIQUIN, D. G. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, p.206-210, 1985.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; KATO, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KIYOKAWA, C.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MOCHIZUKI, Y.; NAKAYAMA, S.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKEUCHI, C.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research**, v.7 n.6, p.331-338, 2000.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; MINAMISAWA, K.; UCHIUMI, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; IRIGUCHI, M.; KAWASHIMA, K.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; SHIMPO, S.; TSURUOKA, H.; WADA, T.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (supplement) **DNA Research**, v.9, n.6, p.225-256, 2002.

KODAMA A. Early cytological events in the infection of the root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* observed by glass slide culture in living seedlings. **Journal of Plant Research**, v.105, n.1079, p.421-429, 1992.

LUPWAYI, N.Z.; HAQUE, I.; HOLL, F.B. Strain-specific response of *Trifolium semipilosum* to inoculation with *Rhizobium* and the significance of waterlogging in Vertisols. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.129, n.4, p.439-446, 1997

MARCHEZAN, E.; VIZZOTTO, V. R.; ROCHA, M. G.; MOOJEN, E. L.; SILVA, J. H. S. Produção animal em várzea sistematizada cultivada com forrageiras de estação fria submetidas a diferentes níveis de adubação. **Ciência Rural**, v.32, n.2, p.303-308, 2002.

MISHRA, R. P. N.; SINGH, R. K.; JAISWAL, H. K.; KUMAR, V.; MAURYA, S. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, v.52, n.5, p.383-389, 2006.

PERRINE-WALKER, F. M.; PRAYITNO, J.; ROLFE, B. G.; WEINMAN, J.J.; HOCART, C. H. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.12, p.3343-3350, 2007.

PRAYITNO J.; STEFANIAK, J.; MCIVER, J.; WEINMAN, J. J.; DAZZO, F. B.; LADHA, J. K.; BARRAQUIO, W.; YANNI, Y.G.; ROLFE, B. G. Interactions of rice seedlings with bacteria isolated from rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.26, n.6, p.521-535, 1999.

REDDY, P. M.; LADHA, J. K.; SO, R.B.; HERNANDEZ, R.J.; RAMOS, M.C.; ANGELES, O.R.; DAZZO, F.B.; DE BRUIJN, F.J. Rhizobial communication with rice roots: Induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. **Plant and Soil**, v.194, n.1-2, p.81-98, 1997.

REGENSBURGER, B.; HENNECKE, H. RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. **Archives of Microbiology**, v.135, n.2, p.103-109, 1983

SENTHILKUMAR, M.; MADHAIYAN, M.; SUNDARAM, S.P.; KANNAIYAN, S. Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. Cv CO-43). **Microbiological Research** (2006), doi:10.1016/j.micres.2006.10.007.

SINGH, R. K.; MISHRA, R. P. N.; JAISWAL, H. K.; KUMAR, V.; PANDEY, S. P.; RAO, S. B.; ANNAPURNA, K. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from Rice (*Oryza sativa* L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis. **Current Microbiology**, v.52, n.2, p.117–122, 2006.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **Federation of European Microbiological Societies**, v.31, p.425-448, 2007.

SULLIVAN, J. T.; TRZEBIATOWSKI, J. R.; CRUICKSHANK, R. W.; GOUZY, J.; BROWN, S. D.; ELLIOT, R. M.; FLEETWOOD, D. J.; MCCALLUM, N. G.; ROSSBACH, U.; STUART, G. S.; WEAVER, J. E.; WEBBY, R. J.; DE BRUIJN, F. J.; RONSON, C. W. Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. **Journal of Bacteriology**, v.184, n.11, p.3086-3095, 2002.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 164 p. 1970.

WERNEGREEN, J.J.; RILEY, M. A. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, n.1, p.98-113, 1999.

WOOD, D. W.; SETUBAL, J. C.; KAUL, R.; MONKS, D. E.; KITAJIMA, J. P.; OKURA, V. K.; ZHOU, Y.; CHEN, L.; WOOD, G. E.; ALMEIDA, N. F.; WOO, L.; CHEN, Y.; PAULSEN, I. T.; EISEN, J. A.; KARP, P. D.; BOVEE, D.; CHAPMAN, P.; CLENDENNING, J.; DEATHERAGE, G.; GILLET, W.; GRANT, C.; KUTYAVIN, T.; LEVY, R.; LI, M. J.; MCCLELLAND, E.; PALMIERI, A.; RAYMOND, C.; ROUSE, G.; SAENPHIMMACHAK, C.; WU, Z.; ROMERO, P.; GORDON, D.; ZHANG, S.; YOO, H.; TAO, Y.; BIDDLE, P.; JUNG, M.; KRESPAN, W.; PERRY, M.; GORDON-KAMM, B.; LIAO, L.; KIM, S.; HENDRICK, C.; ZHAO, Z. Y.; DOLAN, M.; CHUMLEY, F.; TINGEY, S. V.; TOMB, J. F.; GORDON, M. P.; OLSON, M. V.; NESTER, E. W. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, v.294, n.5550, p.2317-2323, 2001.

YANNI, Y.G.; RIZK, E.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.G.; DE BRUIJN, F.J.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T.M.; MATEOS, P.F.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant Soil**, v.194, n.1-2, p.99–114, 1997.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; ABD EL-FATTAH, F.K.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJN, F.; REDEMAKER, J.; MAYA-FLORES, J.; OSTROM, P.; VEGA-HERNANDEZ, M.; HOLLINGSWORTH, R.I.; MARTINEZ-MOLINA, E.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; MATEOS, P.F.; VELASQUEZ, E.; TRIPLETT, E.; UMALI-GARCIA, M.; ANARNA, J.A.; ROLFE, B.G.; LADHA, J.K.; HILL, J.; MUJOO, R.; NG, P.K.; DAZZO, F.B. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* with rice roots. **Australian Journal Plant of Physiology**, v.28, n.9, p.845-870, 2001.

YOUNG, J. P.; CROSSMAN, L. C.; JOHNSTON, A. W.; THOMSON, N. R.; GHAZOU, Z. F.; HULL, K. H.; WEXLER, M.; CURSON, A. R.; TODD, J. D.; POOLE, P. S.; MAUCHLINE, T. H.; EAST, A. K.; QUAIL, M. A.; CHURCHER, C.; ARROWSMITH, C.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T.; CLARKE, K.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; FRASER, A.; HANCE, Z.; HAUSER, H.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; NORBERTCZAK, H.; RABBINOWITSCH, E.; SANDERS, M.; SIMMONDS, M.; WHITEHEAD, S.; PARKHILL, J. The

genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components.  
**Genome Biology.** v.7, n.4, R34, 2006.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

As plantas de *Lotus corniculatus*, variedade São Gabriel não resistem ao alagamento do solo, ao contrário das plantas de *L. uliginosus*, variedade Maku, que mesmo sob lâmina de água produzem nódulos, quando inoculadas com rizóbios. Entretanto, mesmo havendo nodulação, a simbiose entre os isolados estudados e *L. uliginosus* não é eficiente. Em situação de umidade adequada do solo, os isolados U512, EEL689 e EEL8084 apresentam alta eficiência para *L. corniculatus*, e apenas o isolado UFRGS-Lc340 é eficiente para *L. uliginosus*.

Os rizóbios testados nas plantas de Lotus são capazes de promover o crescimento de arroz irrigado. A associação entre rizóbios e arroz promove melhoria na germinação de sementes de arroz, aumentos no perfilhamento, no crescimento das raízes e da parte aérea de plantas de arroz. As cultivares de arroz estudadas mostram diferentes respostas à inoculação com rizóbios. A cultivar IRGA 424 é mais responsiva à inoculação com rizóbios, mesmo em solo não esterilizado. Os incrementos no crescimento das plantas desta cultivar pela inoculação com rizóbios são mais pronunciados quando as plantas recebem nitrogênio. A inoculação com rizóbios aumenta a eficiência na absorção de nitrogênio pelas plantas.

Os isolados de *Bradyrhizobium japonicum*, UFRGS-Lc336, *Mesorhizobium amorphae*, UFRGS-Lg111, e *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, UFRGS-1TV são capazes de produzir o hormônio vegetal ácido indol acético (AIA). A detecção do gene codificador da enzima nitrilo-hidratase nos rizóbios estudados mostra que, provavelmente, a biosíntese de AIA ocorra pela rota do indol-3-acetonitrilo (IAN), sendo o triptofano a molécula precursora.

O padrão de colonização dos rizóbios em plantas de arroz difere da colonização em *L. corniculatus* e *Trifolium vesiculosum*. Os rizóbios penetram nas raízes de arroz por meio de fissuras que ocorrem devido à emergência das raízes laterais. Nas fotografias obtidas neste estudo, nota-se maior concentração de rizóbios nas raízes secundárias das plantas de arroz. Também se verifica a colonização nas folhas de arroz, quando as plantas são inoculadas com *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, UFRGS-1TV. Já nas plantas das leguminosas estudadas, a colonização limita-se às raízes, concentrando-se em regiões de formação de nódulos.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em solos de várzeas, os rizóbios podem trazer benefícios para leguminosas adaptadas a esses ambientes e para a cultura do arroz irrigado. A cultivar Maku de *Lotus uliginosus* apresenta grande potencial para ser utilizada em solos com problemas de drenagem imperfeita, inclusive em rotação com o arroz. Nesta situação, é possível que os rizóbios simbiotes desta leguminosa permaneçam no solo e colonizem as plantas de arroz no verão, promovendo seu crescimento. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que alguns dos rizóbios testados são capazes de acelerar a germinação, estimular o crescimento de raízes e de parte aérea, a emissão de perfilhos, além de aumentar a absorção de nitrogênio nas plantas de arroz.

A inoculação de rizóbios como bactérias promotoras de crescimento em gramíneas, no caso, o arroz, é um tema relativamente recente. Sugere-se que outros estudos sejam realizados para dar continuidade à busca de uma nova tecnologia a ser utilizada pelos produtores de arroz. Nesses próximos estudos, sugere-se a seleção de outros rizóbios para *L. uliginosus*, já isolados e mantidos na coleção da UFRGS, com vistas a buscar aqueles que realizem simbiose eficiente em condição de alagamento e promovam crescimento de plantas de arroz. Além disso, outras espécies leguminosas hibernais adaptadas a áreas com problemas de drenagem, como a serradela (*Ornithopus* sp.) podem ser estudadas quanto à eficiência da simbiose com rizóbios. Desta forma, tais leguminosas, futuramente, poderão ser recomendadas para rotações com o cultivo do arroz e manter, no solo, populações de rizóbios eficientes em arroz. Outros estudos poderiam ser feitos, avaliando-se o efeito da produção de ácidos orgânicos pela decomposição da palha destas leguminosas, sobre a germinação das sementes de arroz.

Para aplicar os resultados obtidos neste trabalho, sugere-se a realização de experimentos de campo com inoculação de rizóbios em arroz, estudos com diferentes variedades e com doses de nitrogênio. Nesses experimentos também poderão ser calibrada a dose mais adequada de inóculo e determinada a melhor forma de aplicação, se via inoculação de sementes, ou via pulverização em pós-emergência e a formulação mais adequada para produtos inoculantes a base de rizóbios para uso em lavouras de arroz.

Após o estudo de todos estes parâmetros, são necessários trabalhos de extensão que apresentem esta nova tecnologia ao agricultor, mostrando que o uso de rizóbios na cultura de arroz, bem como a rotação com leguminosas, são práticas de baixo custo e, que, se bem manejadas, poderão aumentar a produção, diminuir a contaminação do ambiente e reduzir custos de produção, buscando mais sustentabilidade para a orizicultura.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, B.J.R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F.M.; HECKLER, J.C.; MACEDO, R.A.T.; BODDEY, R.M.; JANTALIA, C.P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v.41, n.3, p. 449-456, 2006.

BANERJEE, M.R.; YESMIN, L.; VESSEY, J. K. Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. In. RAI, M.K. (Ed), **Handbook of Microbial Biofertilizers**. Nova York : Food Products Press, 2006. p. 137-181

BARAIBAR, A.; FRIONI, L.; GUEDES, M.E.; LJUNGGREN, H. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay, **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.34, n.6, 1011-1017, 1999.

BAREA, J.M.; NAVARRO, E.; MONTOYA, E. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphatesolubilizing bacteria. **Journal of Applied bacteriology**, London, v.40, p. 129–134, 1976.

BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B; YANNI, Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, p.880–886, 2000.

CABALLERO-MELLADO, J. Microbiología agrícola y interacciones microbianas con plantas. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México, v.48, n.2, p. 154-161, 2006.

CAPELA,D., BARLOY-HUBLER,F., GOUZY,J., BOTHE,G., AMPE,F., BATUT,J., BOISTARD,P., BECKER,A., BOUTRY,M., CADIEU,E., DREANO,S., GLOUX,S., GODRIE,T., GOFFEAU,A., KAHN,D., KISS,E., LELAURE,V., MASUY,D., POHL,T., PORTETELLE,D., PUEHLER,A., PURNELLE,B., RAMSPERGER,U., RENARD,C., THEBAULT,P., VANDENBOL,M., WEIDNER,S., GALIBERT,F. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, n. 17, p. 9877-9882, 2001.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.; BA, A.; GILLIS, M.; LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. Photosynthetic *Bradyrhizobia* are natural endophytes of the African Wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v.66, n.12, p.5437–5447, 2000.

CHEN, X.; FENG, J.; HOU, B.; LI, F.; LI, Q.; HONG, G. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.33, p.2540-2548, 2005.

CHI, F.; SHEN, S.H.; CHENG, H.P.; JING, Y.X.; YANNY, Y.G.; DAZZO, F.B. Ascending Migration of Endophytic Rhizobia, from Roots to Leaves, inside Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.11, p.7271–7278, 2005

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**. Philadelphia, v.22, p.107-149, 2003.

DREW, M. C.; HE, C. J.; MORGAN, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in Plant Science**, London, v.5, 123-127, 2000.

DUTTA, S.; MISHRA, A.K.; DILEEP KUMAR, B.K. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.40, n.2, p.452-461, 2007. doi:10.1016/j.soilbio.2007.09.009

FONTOURA, R. A. **Seleção de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus***. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência do solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

FRANKENBERGER, W.T. Jr.; ARSHAD, M. **Phytohormones in Soils: microbial production and function**. New York, Marcel Dekker, 1995.

FRIZZO, M. L. S. **Seleção e caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr**. 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

GALIBERT,F., FINAN,T.M., LONG,S.R., PUHLER,A., ABOLA,P., AMPE,F., BARLOY-HUBLER,F., BARNETT,M.J., BECKER,A., BOISTARD,P., BOTHE,G., BOUTRY,M., BOWSER,L., BUHRMESTER,J., CADIEU,E., CAPELA,D., CHAIN,P., COWIE,A, DAVIS,R.W., DREANO,S., FEDERSPIEL,N.A., FISHER,R.F., GLOUX,S., GODRIE,T., GOFFEAU,A., GOLDING,B., GOUZY,J., GURJAL,M., HERNANDEZ-LUCAS,I., HONG,A., HUIZAR,L., HYMAN,R.W., JONES,T., KAHN,D., KAHN,M.L., KALMAN,S., KEATING,D.H., KISS,E., KOMP,C., LELAURE,V., MASUY,D., PALM,C., PECK,M.C., POHL,T.M., PORTETELLE,D., PURNELLE,B., RAMSPERGER,U., SURZYCKI,R., THEBAULT,P., VANDENBOL,M., VORHOLTER,F.J., WEIDNER,S., WELLS,D.H., WONG,K., YEH,K.C., BATUT,J. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*, **Science**, Washington, v.293, n.5530, p.668-672, 2001.

GIONGO, A. **Diversidade de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum* que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul**. 2007. 168f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em genética e biologia molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

GIRAUD,E., MOULIN,L., VALLENET,D., BARBE,V., CYTRYN,E., AVARRE,J.C., JAUBERT,M., SIMON,D., CARTIEAUX,F., PRIN,Y., BENA,G., HANNIBAL,L., FARDOUX,J., KOJADINOVIC,M., VUILLET,L., LAJUS,A., CRUVEILLER,S., ROUY,Z., MANGENOT,S., SEGURENS,B., DOSSAT,C., FRANCK,W.L., CHANG,W.S., SAUNDERS,E., BRUCE,D., RICHARDSON,P., NORMAND,P., DREYFUS,B., PIGNOL,D., STACEY,G., EMERICH,D., VERMEGLIO,A., MEDIGUE,C., SADOWSKY,M. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic *Bradyrhizobia*, **Science**, Washington, v.316, n.5829, p.1307-1312, 2007.

GONZALEZ,V., SANTAMARIA,R.I., BUSTOS,P., HERNANDEZ-GONZALEZ,I., MEDRANO-SOTO,A., MORENO-HAGELSIEB,G., JANGA,S.C., RAMIREZ,M.A., JIMENEZ-JACINTO,V., COLLADO-VIDES,J., DAVILA,G. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.103, n.10, p.3834-3839, 2006.

GOODNER,B., HINKLE,G., GATTUNG,S., MILLER,N., BLANCHARD,M., QUROLLO,B., GOLDMAN,B.S., CAO,Y., ASKENAZI,M., HALLING,C.,MULLIN,L., HOUMIEL,K., GORDON,J., VAUDIN,M., IARTCHOUK,O., EPP,A., LIU,F., WOLLAM,C., ALLINGER,M., DOUGHTY,D., SCOTT,C., LAPPAS,C., MARKELZ,B., FLANAGAN,C., CROWELL,C., GURSON,J., LOMO,C., SEAR,C., STRUB,G., CIELO,C., SLATER,S. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58, **Science**, Washington, v.294, n.5550, p.2323-2328, 2001.

HALDER, A. K.; CHAKRABARTTY, P. K. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. **Folia Microbiologica**, Prague, v.38, p.325–30, 1993.

JAMES, E. K.; CRAWFORD, R. M. M. Effect of oxygen availability on nitrogen fixation by two *Lotus* species under flooded conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, p.599-609, 1998.

JAMES, E. K., SPRENT, J.I. Development of N<sub>2</sub>-fixing nodules on the wetland legume *Lotus uliginosus* exposed to conditions of flooding. **New Phytologist**, Lancaster, v.142, p.219-231, 1999.

JARVIS, B. D. W., P. VAN BERKUM, W. X. CHEN, S. M. NOUR, M. P. FERNANDEZ, J. C. CLEYET-MAREL, M. GILLIS. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. Nov. **International Journal of Systems Bacteriology**, Reading, v.47, p.895-898, 1997.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium japonicum* gen. Nov., a genus of slow growing root nodule bacteria. **International Journal of Systems Bacteriology**, Reading, v.32, p.378-380, 1982.

KANEKO,T., NAKAMURA,Y., SATO,S., ASAMIZU,E., KATO,T., SASAMOTO,S., WATANABE,A., IDESAWA,K., ISHIKAWA,A., KAWASHIMA,K., KIMURA,T., KISHIDA,Y., KIYOKAWA,C., KOHARA,M., MATSUMOTO,M., MATSUNO,A., MOCHIZUKI,Y., NAKAYAMA,S., NAKAZAKI,N., SHIMPO,S., SUGIMOTO,M., TAKEUCHI,C., YAMADA,M., TABATA,S. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research**, [Oxford], v.7, n.6, p.331-338, 2000

KANEKO,T., NAKAMURA,Y., SATO,S., MINAMISAWA,K., UCHIUMI,T., SASAMOTO,S., WATANABE,A., IDESAWA,K., IRIGUCHI,M., KAWASHIMA,K., KOHARA,M., MATSUMOTO,M., SHIMPO,S., TSURUOKA,H., WADA,T., YAMADA,M., TABATA,S. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (supplement). **DNA Research**, [Oxford], v.9, n.6, p.225-256, 2002.

KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. *Genius I Rhizobium Frank 1889, 338*. In: BRENNER, KRIEG, STALEY AND GARRITY (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 nd. New York: Springer, 2005. Vol.2, The Proteobacteria, Part C, The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilonproteobacteria, p. 325-340

LANGER, R.H.M. Pastures Plants. In: R.H.M. LANGER (Ed.) **Pastures**: Their ecology and management. Auckland, Australia: Oxford University Press, 1990.

MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 394, p. 27-34, 2004.

MARCHEZAN, E.; VIZZOTTO, V.R.; ROCHA, M.G.; MOOJEN, E.L.; SILVA, J,H.S. Produção animal em várzea sistematizada cultivada com forrageiras de estação fria submetidas a diferentes níveis de adubação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.2, p.303-308, 2002.

MISHRA, R. P. N.; SINGH, R. K.; JAISWAL, H. K.; KUMAR, V.; MAURYA, S. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, New York, v.52, p.383–389, 2006.

MONTES, L.. *Lotus tenuis*. **Revista Argentina de Producción Animal**, Bariloche, v.8, p.367-376, 1988.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2ª.Ed. Lavras, Editora UFLA, 2006. 729p.

NOEL, T. C.; SHENG, C.; YOST, C. K.; PHARIS, R. P.; HYNES, M. F. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa. v.42. p.279–283, 1996.

PAIM, N.R. Research on *Lotus* spp. in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Lotus Newsletter**, v.19, p.37-43, 1988.

PAIM, N.R.; RIBOLDI, J. Comparação entre espécies e cultivares do gênero *Lotus*. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v. 26, p.1699-1704, 1991.

PEREIRA, E. G.; TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Ocorrência de leguminosas e de nodulação em relação à biodiversidade vegetal em ecossistemas florestais brasileiros. In: FERTBIO 98, 1998, Caxambu. **Resumos...** Caxambu,1998.

PERRINE-WALKER, F. M.; PRAYITNO, J.; ROLFE, B. G.; WEINMAN, J.J.; HOCART, C. H. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.58, p.3343–50, 2007.

REDDY, P.M.; LADHA, J.K.; SO1, R.B.; HERNANDEZ, R.J.; RAMOS, M.C., ANGELES, O.R; DAZZO, F.B.; DE BRUIJN, F.J. Rhizobial communication with rice roots: Induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p.81–98, 1997.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v.17, p.319-339, 1999.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, J.H. **Handbook for rhizobia**: methods in legume-Rhizobium technology. New York: Springer-Verlag, 1994. 450p.

SOSTER, M.T.B.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; DALL'AGNOL, M.; BRUSTOLIN, R.; FONTANELI, R.S. Caracterização agrônômica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 33, n.6, p. 1662-1671, 2004.

SPAEPEN S, VANDERLEYDEN J, REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, v.31, p.425-448, 2007.

SPARKS, D. L. **Environmental Soil Chemistry**. San Diego: Academic Press, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 Ed. Porto Alegre, ArtMed Editora, 2004.

WOOD,D.W., SETUBAL,J.C., KAUL,R., MONKS,D.E., KITAJIMA,J.P., OKURA,V.K., ZHOU,Y., CHEN,L., WOOD,G.E., ALMEIDA,N.F. JR., WOO,L., CHEN,Y., PAULSEN,I.T., EISEN,J.A., KARP,P.D., BOVEE,D. SR., CHAPMAN,P., CLENDENNING,J., DEATHERAGE,G., GILLET,W., GRANT,C., KUTYAVIN,T., LEVY,R., LI,M.J., MCCLELLAND,E., PALMIERI,A., RAYMOND,C., ROUSE,G., SAENPHIMMACHAK,C., WU,Z., ROMERO,P., GORDON,D., ZHANG,S., YOO,H., TAO,Y., BIDDLE,P., JUNG,M., KRESPAN,W., PERRY,M., GORDON-KAMM,B., LIAO,L., KIM,S., HENDRICK,C., ZHAO,Z.Y., DOLAN,M., CHUMLEY,F., TINGEY,S.V., TOMB,J.F., GORDON,M.P., OLSON,M.V., NESTER,E.W. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58, **Science**, Washington, v.294, n.5550, p.2317-2323, 2001.

YANNI, Y.G.; RIZK, E.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.G.; DE BRUIJN, F.J.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T.M.; MATEOS, P.F.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.194, p.99–114, 1997.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; ABD EL-FATTAH, F.K.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJIN, F.; REDEMAKER, J., MAYA-FLORES, J.; OSTROM, P.; VEGA-HERNANDEZ, M.; HOLLINGSWORTH, R.I.; MARTINEZ-MOLINA, E.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; MATEOS, P.F.; VELASQUEZ, E.; TRIPLETT, E.; UMALI-GARCIA, M.; ANARNA, J.A.; ROLFE,



B.G.; LADHA, J.K.; HILL, J.; MUJOO, R.; NG, P.K.; DAZZO, F.B. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. Trifolli with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**. Melbourne, v.28, p.845-870, 2001.

YOUNG,J.P., CROSSMAN,L.C., JOHNSTON,A.W., THOMSON,N.R., GHAZOU,I,Z.F., HULL,K.H., WEXLER,M., CURSON,A.R., TODD,J.D., POOLE,P.S., MAUHLIN,T.H., EAST,A.K., QUAIL,M.A., CHURCHER,C., ARROWSMITH,C., CHEREVACH,I., CHILLINGWORTH,T., CLARKE,K., CRONIN,A., DAVIS,P., FRASER,A., HANCE,Z., HAUSER,H., JAGELS,K., MOULE,S., MUNGALL,K., NORBERTCZAK,H., RABBINOWITSCH,E., SANDERS,M., SIMMONDS,M., WHITEHEAD,S., PARKHILL,J. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. **Genome Biology**, London, v.7, n.4, R34, 2006.

## **10. RESUMO BIOGRÁFICO**

Benjamin Dias Osorio Filho nasceu em Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, em 28 de julho de 1981. É filho de Benjamin Dias Osorio e Ana Loiraci Dutra Osorio. De 1988 a 1995, cursou o primeiro grau na Escola Estadual Januária Leal, e de 1996 a 1998, o segundo grau, Técnico em Processamento de Dados, no Colégio da Universidade da Região da Campanha. No ano seguinte ingressou no curso de Agronomia, na Universidade Federal de Santa Maria. Durante a graduação foi monitor da disciplina de Morfologia e Gênese do Solo, nos cursos de Agronomia, Zootecnia e Engenharia Florestal, e bolsista PIBIC CNPq, no laboratório de Química e Fertilidade do Solo. Recebeu o título de Engenheiro Agrônomo em fevereiro de 2004, e de março do mesmo ano, a fevereiro de 2006 cursou o Mestrado em Ciência do Solo, na Universidade Federal de Santa Maria, sob a orientação do Professor Danilo Rheinheimer dos Santos, na área de Processos Químicos e Ciclagem de Nutrientes. Em março de 2006 ingressou no curso de Doutorado, do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na área de Biologia e Bioquímica do Solo, sob a orientação do Professor Enilson Luiz Saccol de Sá. Em fevereiro de 2007 foi aprovado como Professor Assistente na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, onde atualmente é professor na Unidade de Cachoeira do Sul. Foi contemplado com uma bolsa CAPES para realização do doutorado “sanduiche”, na Universidade Nacional Autónoma de México, em Cuernavaca, sob orientação do Dr. Jesús Caballero-Mellado, entre setembro de 2008 e fevereiro de 2009. Atualmente é membro da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.