

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

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS GRAMÍNEAS E
LEGUMINOSAS INOCULADAS COM RIZÓBIOS E BACTÉRIAS
ASSOCIATIVAS**

Leandro Hahn

Tese

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

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS GRAMÍNEAS E
LEGUMINOSAS INOCULADAS COM RIZÓBIOS E BACTÉRIAS
ASSOCIATIVAS**

LEANDRO HAHN
Engenheiro Agrônomo (UFSC)
Mestre em Agroecossistemas (UFSC)

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

Porto Alegre (RS) Brasil

Abril, 2013

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO
Biblioteca Setorial da Faculdade de Agronomia da UFRGS

LEANDRO HAHN

Engenheiro Agrônomo (UFSC)

Mestre em Agroecossistemas (UFSC)

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

ALBERTO VASCONCELLOS INDA JÚNIOR

Coordenador do Programa de Pós-

Graduação em Ciência do Solo

RODRIGO JOSEMAR SEMINOTI

JACQUES

PPG-Ciência do Solo - UFSM

ANELISE BENEDUZI DA SILVEIRA

Pesquisadora FEPAGRO-RS

FLÁVIO OLIVEIRA CAMARGO

PPG-Ciência do Solo/UFRGS

PEDRO ALBERTO SELBACH

Diretor da Faculdade de Agronomia

*"A utopia está lá no horizonte. Me
aproximo dois passos, ela se afasta
dois passos. Caminho dez passos e
o horizonte corre dez passos. Por
mais que eu caminhe, jamais
alcançarei. Para que serve a utopia?
Serve para isso: para que eu não
deixe de caminhar"*

Eduardo Galeano
(*Las palabras andantes*)

*Aos meus pais Roque e Lúcia Hahn.
À minha esposa Ivanete Schneider Hahn.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade.

Ao meu orientador, professor Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá pela amizade, pela sua preciosa orientação, conselhos, opiniões, correções. Por mostrar os caminhos, propiciar soluções e pelos valiosos ensinamentos relacionados ou não aos estudos.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da UFRGS, pelos ensinamentos e convivência.

À meus pais Roque e Lúcia Hahn, pela motivação aos estudos.

À minha esposa Ivanete Schneider Hahn por abraçar comigo o projeto deste doutorado. Obrigado pelo carinho, paciência e palavras de incentivo quando eu mais precisava. Obrigado pela compreensão de minha ausência.

Aos bolsistas William Rosa da Silva e Suélen Oldra e aos colegas do laboratório Rafael Machado e Raquel Damasceno pelo auxílio nos trabalhos na casa de vegetação, laboratório e nos experimentos a campo. Aos demais companheiros do laboratório, pela amizade.

Ao Instituto Rio-Grandense do Arroz, em especial ao pesquisador Rodrigo Schöenfeld, pela disponibilidade da estrutura e apoio técnico para condução dos experimentos.

Ao Dr. Anton Hartmann do Helmholtz München Zentrum (Munique-Alemanha) por ter me recebido na missão internacional de curta duração e pela concessão dos plasmídeos.

Ao professor Marcelo Gravina pela disponibilidade do Laboratório de Fitopatologia Molecular e auxílio na transformação genética das bactérias.

À FAI Faculdade de Itapiranga e aos alunos do Curso de Agronomia que souberam entender este período de dedicação aos estudos de doutorado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS GRAMÍNEAS E LEGUMINOSAS INOCULADAS COM RIZÓBIOS E BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS¹

Autor: Leandro Hahn

Orientador: Prof. Enilson Luiz Saccol de Sá

RESUMO

A inoculação de plantas com bactérias promotoras de crescimento vegetal representa uma importante opção de aumento da produtividade de plantas. Para aumentar a eficiência na promoção de crescimento vegetal, aponta-se o cultivo consorciado e plantas em sucessão de cultivos, bem como a inoculação conjunta de rizóbios e bactérias diazotróficas associativas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a promoção de crescimento de azevém, trevo branco, milho e arroz pela inoculação de bactérias diazotróficas associativas e rizóbios. Foram realizados experimentos em casa de vegetação e a campo com a inoculação de rizóbios e bactérias diazotróficas em plantas de trevo branco, azevém, milho e arroz. Os isolados utilizados nos experimentos tiveram um fragmento do 16S do ribossomo amplificado e sequenciado para sua identificação. As bactérias testadas apresentam efeito de promoção de crescimento variável em plantas de híbridos de milho, sendo o híbrido 30F53 o mais responsivo às inoculações. A inoculação da estirpe SEMIA 222 e do rizóbio UFRGS Vp16 eficientes na fixação biológica de N em trevo branco aumenta a produção de massa seca da parte aérea e de nitrogênio total da massa seca da parte aérea por área em cultivo consorciado com azevém em comparação ao cultivo de azevém exclusivo. A inoculação do rizóbio UFRGS Vp16, identificado como *Burkholderia* sp., e da mistura de três isolados de *Azospirillum* sp. aumenta o crescimento das plantas de milho cultivadas em sucessão ao azevém, trevo branco e o consórcio de azevém e trevo branco. A inoculação combinada dos rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348 (identificado como *Mesorhizobium* sp.) com um produto comercial contendo *A. brasilense* promovem o crescimento de plantas de arroz. Há presença em grãos de arroz de plantas cultivadas a campo de bactérias diazotróficas endofíticas e bactérias capazes de nodular plantas de cornichão e trevo branco. *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 e os rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348 marcados com *gfp* colonizam a superfície radicular de plantas de arroz inoculadas, principalmente na zona de emissão de pêlos radiculares.

¹ 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. (175 p.) Abril, 2013. Trabalho realizado com apoio financeiro do CNPq.

PLANT GROWTH PROMOTION OF GRASSES AND LEGUMES BY INOCULATION OF RHIZOBIA AND ASSOCIATIVE BACTERIA¹

Author: Leandro Hahn

Adviser: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

ABSTRACT

The inoculation of plants with bacteria that promoting the plant growth is an important option to increase the plant productivity. To increase the growth of these plants, it is suggested the intercropping and crop plants in succession, as well as the rhizobia inoculation and diazotrophic bacteria. Thus, the objective of this study was to evaluate the growth promotion of ryegrass, white clover, maize and rice by inoculation of diazotrophic associative bacteria and rhizobia. The experiments were carried out in a greenhouse and in a field with the inoculation of rhizobia in leguminous and diazotrophic bacteria in plants of white clover, ryegrass, maize and rice. The isolated bacteria used in the experiments had a fragment of the 16S ribosome amplified and sequenced for identification. The tested bacteria demonstrated growth promotion effect variable in plants of maize hybrids and the hybrid 30F53 was the most responsive to inoculations. The inoculation of SEMIA 222 and the rhizobia UFRGS Vp16, who demonstrate efficient N fixation in white clover, enhances the production of dry mass of shoots and total nitrogen of the dry mass of the shoots per area when intercropped with ryegrass, if it compared to the sole crop ryegrass. The inoculation of rhizobia UFRGS VP16, identified as *Burkholderia* sp., and the mix of three isolates of *Azospirillum* sp. enhance the growth of maize cropped in succession to ryegrass, white clover and the intercropping of ryegrass and white clover. The combined inoculation of rhizobia UFRGS Vp16 and UFRGS Lc348 (identified as *Mesorhizobium* sp.) with a commercial product containing *A. brasilense* promote the growth of rice plants. We note the presence of endophytic diazotrophic bacteria capable of nodulating plants of white clover and birdsfoot trefoil plants in the grains of the rice plants. *A. brasilense* Ab-V5 and Ab-V6 and rhizobia UFRGS Vp16 and UFRGS Lc348 tagged with gfp colonize the root surface of the inoculated rice plants, especially in the area of emission of root hairs.

¹ 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. (175 p.) April, 2013. Research performed with financial support from CNPq.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por rizóbios e bactérias diazotróficas associativas	19
2.2 Colonização de gramíneas por bactérias promotoras de crescimento vegetal	21
2.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal em sistemas de rotação/consorciação de pastagens e sucessão de culturas	27
2.4 Referências Bibliográficas.....	29
40	
3 CAPÍTULO II - PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE HÍBRIDOS DE MILHO INOCULADOS COM RIZÓBIOS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS	40
3.1 Introdução	40
3.2 Material e métodos	43
3.3 Resultados e discussão.....	46
3.4 Conclusões	53
3.5 Referências bibliográficas	54
4.1 Introdução	61
4.2 Material e métodos	64
4.3 Resultados e discussão.....	67
4.4 Conclusões	85
4.5 Referências Bibliográficas.....	86
5 CAPÍTULO IV - PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MILHO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM SUCESSÃO AO AZEVÉM E TREVO BRANCO EM CULTIVO EXCLUSIVO E CONSORCIADO	93
5.1 Introdução	93
5.2 Material e métodos	95
5.3 Resultados e discussão.....	99
5.4 Conclusão.....	107
5.5 Referências bibliográficas	107
6.1 Introdução	114
6.2 Material e métodos	116

6.3 Resultados e discussão	120
6.4 Conclusões	129
6.5 Referências Bibliográficas.....	129
7 CAPÍTULO VI - COLONIZAÇÃO EM PLANTAS DE TREVO BRANCO (<i>Trifolium repens</i>) E DE ARROZ (<i>Oryza sativa</i>) E EM GRÃOS DE ARROZ por <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Burkholderia</i> sp. E <i>Mesorhizobium</i> sp.....	134
7.1 Introdução	134
7.2 Material e métodos	137
7.2.1 Quantificação da população de bactérias endofíticas presentes em grãos de plantas de arroz cultivadas a campo.....	137
7.2.2 Colonização de plantas de arroz inoculadas com <i>Azospirillum</i> e rizóbios marcados com gene <i>gfp</i>	140
7.3 Resultados e discussão.....	145
7.3.1 Quantificação da população de <i>Azospirillum</i> e rizóbios presentes em grãos de plantas de arroz cultivadas a campo	145
7.3.2 Colonização de plantas de arroz inoculadas com <i>Azospirillum</i> e rizóbios contendo o gene <i>gfp</i>	149
7.4 Conclusões	154
7.5 Referências Bibliográficas.....	155
8 CONCLUSÕES GERAIS.....	162
APÊNDICES.....	164
RESUMO BIOGRÁFICO	171

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 4.1	Produção de massa Seca da parte aérea e Nitrogênio total na massa seca da parte aérea em azevém com a inoculação de bactérias diazotróficas em dois anos de cultivo e aplicação de duas doses de nitrogênio.....	69
Tabela 4.2	Produção de massa seca da parte aérea e nitrogênio total da na massa seca da parte aérea em plantas de azevém, em cultivo consorciado com trevo branco em dois anos de cultivo, inoculadas com bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio.....	71
Tabela 4.3	Massa Seca da Parte Aérea (MSPA), Nitrogênio total na Massa Seca da Parte Aérea (N total MSPA) e número de nódulos de trevo branco em cultivo exclusivo inoculado com bactérias diazotróficas em dois anos de cultivo e aplicação de duas doses de nitrogênio.....	74
Tabela 4.4	Massa seca da parte aérea, Nitrogênio total na massa seca da parte aérea, número de nódulos e percentagem de cobertura do solo de trevo branco em consórcio com azevém inoculado com bactérias diazotróficas em dois anos de cultivo e aplicação de duas doses de nitrogênio.....	75
Tabela 4.5	Índice de eficiência relativa (IER)* (%) da inoculação com isolados bacterianos em azevém e trevo branco em cultivo exclusivo e em consórcio.....	76
Tabela 4.6	Produção de massa seca da parte aérea e nitrogênio total na massa seca da parte aérea em plantas de azevém, em cultivo exclusivo e consorciado com trevo branco em dois anos de cultivo, inoculadas com bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio.....	80
Tabela 5.1	Produção de massa seca da parte aérea de milho inoculado com bactérias diazotróficas nas safras 2010/2011 e 2011/202 e com 70 e 140 kg.ha ⁻¹ de nitrogênio.....	102
Tabela 5.2	Índice de eficiência relativa (IER)* (%) da inoculação dos tratamentos com bactérias diazotróficas no crescimento da massa seca da parte aérea (MSPA) e rendimento de grãos de milho cultivado em sucessão à azevém, trevo branco e o consórcio dos dois cultivos nas safras 2010/2011 e 2011/2012.....	105
Tabela 6.1	Produção de Massa seca da parte aérea, nitrogênio total na massa seca da parte aérea, rendimento de grãos, altura de plantas, grãos por panícula, panículas m ⁻² e perfilhos/planta de arroz irrigado cultivar Puitá INTA inoculado com bactérias	122

	diazotróficas em 60 e 120 kg.ha ⁻¹ de nitrogênio.....	
Tabela 6.2	Produção de Massa seca da parte aérea (MSPA), nitrogênio total na MSPA, rendimento de grãos, altura de plantas, grãos/panícula, panículas m ⁻² e perfilhos/planta de arroz irrigado cultivar IRGA 422CL inoculado com bactérias diazotróficas em 0,70 e 140 kg.ha ⁻¹ de nitrogênio.....	123
Tabela 6.3	Índice de eficiência relativa (IER)* (%) dos tratamentos com bactérias diazotróficas no crescimento da massa seca da parte aérea de duas cultivares de arroz na produção de massa seca da parte aérea (MSPA), no rendimento de grãos e nitrogênio na massa seca da parte aérea (N na MSPA).....	126
Tabela 7.1	Log do número mais provável (média ± desvio padrão) de bactérias diazotróficas, nodulantes de trevo branco e de cornichão por grama de massa seca de grãos de arroz colhidos de plantas inoculadas com bactérias diazotróficas e com aplicação de duas doses de nitrogênio (N).....	146

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 3.1	Plantas de milho, híbrido 30F53, inoculadas com o rizóbio UFRGS Vp16 e sem inoculação, nos tratamentos que receberam N em doses equivalentes a 60 e 120 kg.ha ⁻¹	51
Figura 3.2	Inoculação dos isolados de <i>Azospirillum</i> (UFRGS EI-S, UFRGS Lg1-R e UFRGS M-S) e o tratamento controle sem inoculação no híbrido de milho 30F53 com doses equivalentes a 60 e 120 kg.ha ⁻¹ de N.....	52
Figura 4.1	Produção de massa seca da parte aérea em três cortes de azevém inoculado com a inoculação de bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio no ano de 2011. Médias seguidas de letras iguais em cada corte não diferem entre si (Tukey, P<0,05). ns = não significativo.....	70
Figura 4.2	Produção de massa seca da parte aérea em três cortes de azevém consorciado com trevo branco inoculado com bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio na safra 2011. Médias seguidas de letras iguais em cada corte não diferem entre si (Tukey, P<0,05). ns = não significativo.....	72
Figura 4.3	Nitrogênio total na massa seca da parte aérea em três cortes de azevém consorciado com trevo branco inoculado com bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio na safra 2011. Médias seguidas de letras iguais em cada corte não diferem entre si (Tukey, P<0,05).ns = não significativo.....	72
Figura 4.4	Massa seca da parte aérea em dois cortes de trevo branco inoculado com bactérias diazotróficas e com aplicação de duas doses de nitrogênio no ano de 2011.....	78
Figura 4.5	Nitrogênio total na massa seca da parte aérea em dois cortes de trevo branco inoculado com bactérias diazotróficas e com aplicação de duas doses de nitrogênio no ano de 2011.....	79
Figura 4.6	Produção de massa seca da parte aérea em três cortes de trevo branco consorciado com azevém inoculado com a inoculação de bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio na safra 2011.....	82
Figura 4.7	Nitrogênio na massa seca da parte aérea em três cortes de trevo branco consorciado com azevém com a inoculação de bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio na safra 2011.....	82

Figura 4.8	Cobertura do solo com cultivo de trevo branco em consórcio com azevém.....	82
Figura 4.9	Massa seca da parte aérea de azevém em cultivo exclusivo e em consórcio com trevo branco inoculados com bactérias diazotróficas e com adição de duas doses de N.....	84
Figura 4.10	Nitrogênio total na massa seca da parte e parte aérea de azevém em cultivo exclusivo e em consórcio com trevo branco inoculados com bactérias diazotróficas em duas doses de N....	85
Figura 7.1	Placa de Petry em trans-iluminador com filtro de luz no comprimento de onda 490 nm luz com colônia de <i>Burkholderia</i> sp. UFRGS Vp16 transformada expressando a proteína GFP (<i>green fluorescent protein</i>).....	149
Figura 7.2	Micrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de cortes longitudinais de fragmentos de plantas de arroz.....	150
Figura 7.3	Micrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de cortes longitudinais de raízes de plantas de arroz inoculadas.....	151
Figura 7.4	Micrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de cortes longitudinais de raízes de plantas de arroz inoculadas.....	152

1 INTRODUÇÃO GERAL

Com o crescimento da população mundial há a necessidade do aumento da produção de alimentos, e dentre os principais fatores determinantes para a obtenção de maior produção está o fornecimento de adequado de nutrientes, principalmente nitrogênio (N). Este elemento se destaca por participar da composição dos aminoácidos, da clorofila e de muitas enzimas essenciais que estimulam o crescimento e o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular, sendo o nutriente absorvido em maior quantidade e, também, o que causa maiores efeitos no aumento de produção de cereais. Estima-se que menos que 50% do N aplicado via fertilizante é usado pelas plantas devido à ação de processos como a lixiviação, volatilização de amônia, desnitrificação, erosão e imobilização microbiana. O resultado desta baixa eficiência é a contaminação do solo e águas sub-superficiais, aumento dos custos de produção, levando a danos na saúde e comprometendo a sustentabilidade agrícola.

O aumento da produtividade quase inevitavelmente leva ao aumento da aplicação de fertilizantes químicos e minerais. Esta situação tem causado preocupação em relação aos impactos ambientais devido ao uso crescente de fertilizantes minerais e, dentro deste contexto, a utilização de plantas leguminosas que estabelecem simbiose com rizóbios para fixação biológica de N (FBN) é uma alternativa para fornecimento deste elemento às plantas cultivadas em sucessão. Isto pode ser explorado em plantas de cobertura cultivadas durante o inverno, inclusive com uso forrageiro, ou o uso de plantas leguminosas em consórcio com gramíneas. Se a destinação do cultivo das plantas for servir como forragem aos animais, pode-se reduzir os gastos diretos com N e outros minerais, aumentar a qualidade e a diversificação da dieta consumida pelos animais, melhorar a disponibilidade de forragem pelo aporte de N fixado simbioticamente pela leguminosa com rizóbios e, por fim, aumentar também o período de utilização das pastagens.

Além do aporte de N pelas plantas cultivadas anteriormente ou em consórcio, a exploração da associação entre plantas e micro-organismos promotores de crescimento está ganhando grande importância e poderá ser uma forma limpa, barata e ecologicamente sustentável para o aumento da produtividade vegetal. Uma grande variedade de bactérias promotoras de crescimento pode significativamente aumentar o crescimento de diversas plantas quando estas são inoculadas. Estas bactérias, denominadas Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (PGPR, do inglês *Plant Growth Promotion Rhizobacteria*), tanto podem ser endofíticas, colonizando tecidos internos das plantas, quanto rizosféricas. Em ambos os casos, não causam danos visíveis às plantas hospedeiras e podem promover o crescimento pela combinação de vários mecanismos. Exemplos dos principais mecanismos incluem a fixação biológica de N (FBN), onde a bactéria capaz de executar esta função é denominada diazotrófica. Outros mecanismos incluem a produção de substâncias fitoreguladoras, como o ácido indol acético (AIA), a solubilização de fosfatos, e de uma forma indireta pela proteção das plantas contra patógenos por mecanismos tais como produção de sideróforos, quitinases, glucanases e antibióticos.

Os rizóbios estão entre os micro-organismos mais bem estudados, sendo muito utilizados na inoculação de plantas e, quando em simbiose com leguminosas, mostram capacidade de fixar quantidades expressivas de nitrogênio. Em plantas não-leguminosas, tem sido observada a capacidade de promoção de crescimento vegetal por alguns rizóbios inoculados em plantas como arroz, trigo e milho. Nestas plantas, os rizóbios não apresentam capacidade para fixar o nitrogênio, porém tem mostrado que podem promover o crescimento das plantas por outros mecanismos, como produção de substâncias fitoreguladoras, aumento da disponibilidade de fósforo, ou por mecanismos indiretos como o biocontrole de fitopatógenos.

Um segundo grupo bem estudado de bactérias promotoras de crescimento vegetal pertence ao gênero *Azospirillum*, que apresentam resultados positivos de promoção de crescimento em trigo, milho e milho. Além dos mecanismos de promoção citados acima para os rizóbios, estas bactérias têm a capacidade de fixação de N e fornecê-lo para as gramíneas.

No entanto, algumas dúvidas ainda persistem sobre a eficiência do uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal, pois há muitos trabalhos que mostram resultados frustrantes da inoculação de plantas com estas bactérias. Uma das principais razões apontadas para estes insucessos é a incapacidade da interação bactéria/planta em estabelecer populações bacterianas significativas na superfície radicular ou endofiticamente e o processo de infecção e colonização da planta ainda é desconhecido.

Além deste aspecto, desconhecem-se os efeitos das bactérias diazotróficas associativas e rizóbios em sistemas de produção em que as plantas estão em cultivo consorciado ou em sucessão. Aliado a isso, há dúvidas quanto ao potencial do uso combinado de bactérias associativas diazotróficas com rizóbios em promover o crescimento vegetal.

Dessa maneira, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a promoção de crescimento de plantas de arroz, azevém, trevo branco e milho pela inoculação de bactérias diazotróficas associativas e rizóbios. Como objetivos específicos: (a) avaliar a eficiência da inoculação de rizóbios, simbiotes em leguminosas, e bactérias diazotróficas associativas na promoção de crescimento de híbridos de milho; (b) avaliar a promoção de crescimento em plantas trevo branco e azevém, em cultivo exclusivo e consorciado, pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal; (c) estudar a eficiência da inoculação de rizóbios simbiotes em leguminosas e bactérias diazotróficas associativas na promoção de crescimento de milho em sucessão aos cultivos de inverno com azevém, trevo branco e o consórcio dos dois cultivos; (d) avaliar a eficiência da inoculação isolada e combinada de rizóbios isolados de leguminosas com bactérias diazotróficas endofíticas na promoção de crescimento de arroz irrigado; (e) quantificar a população de bactérias diazotróficas presentes em grãos de arroz e estudar a colonização radicular e de tecidos de plantas de arroz inoculadas com *Azospirillum* e rizóbios marcados com *gfp*.

2 CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por rizóbios e bactérias diazotróficas associativas

As raízes das plantas oferecem um nicho de proliferação de bactérias do solo que vivem à custa das rizodeposições e lisados radiculares. Neste ambiente, a densidade da população bacteriana pode ser 100% maior do que no solo não-rizosférico e mais de 15% da superfície radicular pode ser ocupada com colônias de um tipo de bactéria. Enquanto estas bactérias utilizam os nutrientes liberados pela planta hospedeira, elas também secretam metabólitos na rizosfera. Alguns destes metabólitos podem agir como compostos sinalizadores que são percebidos pelas bactérias presentes na rizosfera (Bais et al., 2004; Gray & Smith, 2005; Kiely et al., 2006).

O melhor e mais bem estudado exemplo de troca de sinais é a simbiose rizóbio-leguminosa, em que a planta libera flavonóides que agem como sinalizadores para a bactéria secretar os fatores Nod. Estes fatores Nod são percebidos nos pelos radiculares e induzem a formação de nódulos nas raízes nos quais o rizóbio poderá fixar nitrogênio (Gray & Smith, 2005). Esta simbiose é um exemplo primoroso de uma íntima relação entre uma bactéria do solo e seu hospedeiro, o que ilustra o conceito por trás do termo rizobactéria-promotora-do-crescimento-de-plantas (RPCP): em um ambiente pobre em N o rizóbio promove o crescimento da leguminosa ao prover o nutriente limitante (Van Loon, 2007).

Considera-se o processo de FBN a principal forma de entrada do N no sistema solo, tendo sido estimadas quantidades de até 180 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N em sistemas de pastagem, sendo que 70 a 90% estão presentes na parte aérea das plantas (Thomas, 1995). Assim, a FBN é certamente o principal

mecanismo de promoção de crescimento vegetal conhecido. A capacidade de FBN é possível pela presença do complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para transformar o N atmosférico gasoso (N₂) em amônia, subsequentemente assimilada em aminoácidos e proteínas. A capacidade de FBN (diazotrófica) está restrita à Bacteria e Archaea, incluindo cianobactérias e bactérias Gram positivas e Gram negativas (Young, 2006). As bactérias denominadas rizóbio são as mais bem estudadas e consideradas o principal grupo de diazotróficos, por sua importância agrônômica e pela FBN estando atualmente distribuídos em treze gêneros (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer/Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Cupriavidus*, *Devosia* e *Shinella*)(Weir, 2013).

Além dos rizóbios, que se estabelecem simbioticamente em nódulos de leguminosas, bactérias de importância agrícola que fixam nitrogênio podem ser tanto de vida livre, como associativas. No segundo caso, estas bactérias podem colonizar tanto a superfície radicular (rizoplano) como o interior da planta (bactérias endofíticas). Hallmann et al. (1997) definiram endofíticos como sendo as bactérias detectadas dentro de plantas superficialmente esterilizadas ou extraídas do interior destas e não tendo efeitos danosos visíveis sobre as plantas. Na categoria bactéria associativa um importante gênero estudado é o *Azospirillum*, considerada uma bactéria endofítica facultativa (Döbereiner et al., 1995).

A FBN é apenas um dos mecanismos utilizados por bactérias associativas promotoras de crescimento que tem sido pesquisados e descritos em trabalhos (García de Salamone et al., 1996; Iniguez et al., 2004; Montañez et al., 2009). Outros importantes mecanismos incluem a produção de fitoreguladores do crescimento vegetal como ácido indol acético (AIA), pertencente ao grupo das auxinas (Mishra et al., 2010), citocininas (Castro et al., 2008), giberelinas (Narula et al., 2006), inibição de etileno (Saleem et al., 2007), produção de óxido nítrico (Creus et al., 2005), a atividade 1-aminociclopropano-1-decarboxilato desaminase (ACC desaminase) (Prigent-Combaret et al., 2008), o antagonismo contra fitopatógenos pela produção de sideróforos (Scher & Baker, 1982), β -1,3-glucanase, quitinases, antibióticos, pigmentos fluorescentes e cianida (Pathma et al., 2011), competição por

nutrientes ou por indução de resistência sistêmica adquirida (Pieterse et al., 2001), ou por aumentar a disponibilidade de minerais como fósforo (Sessitsch et al., 2002; Sturz et al., 2000). Bactérias promotoras de crescimento podem usar mais do que um destes mecanismos para aumentar o crescimento vegetal. Evidências experimentais sugerem que o estímulo ao crescimento da planta seja o resultado líquido de múltiplos mecanismos que podem ser ativados simultaneamente (Martinez-Viveros et al., 2010).

Depois da FBN, a produção de fitoreguladores do crescimento vegetal talvez seja o mais importante modo de ação na promoção de crescimento vegetal por micro-organismos. Entre as auxinas o ácido indolacético (AIA) é o mais estudado e o mais produzido por bactérias (Radwan et al., 2005). O AIA atua principalmente na formação de raízes laterais e proliferação de pêlos radiculares que aumentam a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, aumenta o desenvolvimento da planta (Biswas et al., 2000; Hungria et al., 2010).

2.2 Colonização de gramíneas por bactérias promotoras de crescimento vegetal

A capacidade diferenciada de bactérias em colonizar raízes, disseminar e multiplicar em tecidos internos de plantas, assim como a capacidade de estabelecer uma população significativa sobre condições competitivas em substratos não-estéreis, é apontada como um dos principais aspectos que interferem na expressão da capacidade de promoção de crescimento da planta por estas bactérias (Larcher et al., 2003; Pedraza et al., 2010; Bhattacharjee et al., 2012).

A colonização por bactérias promotoras de crescimento vegetal nas raízes e a sua disseminação para a parte aérea das plantas é um sistema complexo que envolve uma série de etapas ainda não completamente elucidadas (Prayitno et al., 1999; Yanni et al., 1997; Yanni et al., 2001).

O processo de colonização da planta inicia com uma fase de reconhecimento pela bactéria de compostos específicos que são secretados pela raiz (Lugtenberg & Dekkers 1999). As bactérias reconhecem estes compostos e regulam as respostas ao seu ambiente via sistema sensorial com

um e dois componentes, sendo vários destes sistemas identificados e envolvidos no reconhecimento de compostos rizodepositados pelas raízes (Heeb & Haas, 2001; Brencic & Winans, 2005; Faure et al., 2009). Os fatores Nod dos rizóbios são provavelmente um dos melhores sistemas de dois componentes conhecidos. Neste caso, reconhecimento de flavonóides rizodepositados pelas leguminosas pela proteína NodD da membrana citoplasmática de rizóbios ativa o regulador transcricional LysR, levando a produção de lipoquilo-oligossacarídeos com indução na formação de nódulos no hospedeiro (Brencic & Winans, 2005).

Os rizodepósitos radiculares são compostos principalmente de açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, mas também incluem um complexo de metabólitos secundários, como os flavonóides, que podem atrair microorganismos específicos para a rizosfera (Bais et al., 2006). A produção de rizodepósitos radiculares pode variar significativamente entre as plantas, dependendo do estágio de desenvolvimento, das condições de crescimento e das interações bióticas (Mougel et al., 2006; Broeckling et al., 2008; Houlden et al., 2008; Badri e Vivanco 2009; Doornbos et al., 2011). Em virtude dessas variações na produção de rizodepósitos, há variantes espaciais e temporais de nichos que comunidades bacterianas específicas selecionadas ocupam nas diferentes zonas das raízes (por exemplo: zona pilífera, zona de divisão e alongação, zona suberosa, zona de ramificação, coifa). A colonização de raízes por *Azospirillum brasilense* 245 ocorre preferencialmente na zona pilífera e na zona de emergência de raízes laterais (Van de Broek et al., 1993), enquanto a colonização de raízes por *Azoarcus* sp. BH72 ocorre preferencialmente nas zonas de divisão e alongação logo após a coifa (Hurek et al., 1994) e os rizóbios que preferem zonas de emergência de raízes laterais (Chi et al., 2005).

Um dos aspectos mais interessantes que tem sido reconhecido pela pesquisa é que a variação na rizodeposição radicular (tempo, quantidade e/ou constituintes) tem sido um mecanismo pelas quais as plantas podem modular distintas comunidades rizobacterianas, tanto em composição quanto em abundância (Micallef et al., 2009; Bakker et al., 2012). Este aspecto é apontado como uma das principais justificativas na variabilidade da promoção de crescimento verificada entre espécies, cultivares e híbridos de plantas (García de Salamone et al., 1996; Montañez et al., 2009; Walker et al., 2011). Walker et

al. (2011) verificaram que as bactérias do gênero *Azospirillum* influenciavam o metabolismo secundário das plantas de milho de acordo com a interação bactéria/variedade de milho utilizada. Compostos benzoxazinonas do metabolismo secundário de milho são rizodepositados em maiores quantidades em plantas inoculadas (Raja et al., 2006) e parecem servir como sinalizadores para uma efetiva interação bactéria/milho. Estes compostos, além de seu papel nos mecanismos de defesa da planta contra patógenos e pragas, também interferem na funcionalidade de hormônios na planta. Neal et al. (2012) mostraram que raízes de milho produzindo um tipo de benzoxazinona, identificada como 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazina-3(4H)-1 (DIMBOA), atraem significativamente um maior número de *Pseudomonas putida*, uma espécie de bactéria promotora de crescimento e biocontroladora de fitopatógenos, do que raízes de milho mutantes do gene *bx1*, deficientes na produção de DIMBOA.

A partir da colonização da superfície radicular, as bactérias podem entrar nos tecidos da epiderme radicular tanto passivamente como ativamente. A colonização de maneira passiva pode se dar, por exemplo, pela penetração em locais com junção de células epidérmicas adjacentes (Benhamou et al., 1996), pontos de emergência de raízes laterais (Govindarajan et al., 2008) ou ferimentos causados por fitopatógenos ou herbívoros do solo (Hallmann et al., 1997). Já a colonização de forma ativa pode ocorrer com a produção de enzimas hidrolíticas (por exemplo: exoglucanases, endoglucanase e endopoligalacturonase) envolvidas na degradação da parede celular da planta (Reinhold-Hurek et al., 1993; Compant et al., 2005). Tem sido proposto que níveis de enzimas degradadoras de parede celular produzidas por bactérias endofíticas colonizadoras de raízes seriam em níveis bem mais baixos do que os altos níveis produzidos por fitopatógenos (Elbeltagy et al., 2001). Um estudo com três espécies de bactérias colonizadoras (*Pseudomonas fluorescens*, *P. serratia* e *Serratia plymuthica*) de raízes de beterraba açucareira mostrou que cada bactéria tem um padrão de colonização distinto (Zachow et al., 2010).

Embora isso não tenha sido provado, uma bactéria endofítica precisa transpor o sistema de defesa da planta, ou seja, requer fatores de virulência para transpor a resistência do hospedeiro (Van der Ent et al., 2009). O balanço entre a resistência do hospedeiro e a virulência da bactéria

endofítica é provavelmente um determinante central na capacidade de colonização e disseminação destas bactérias, com consequências no desenvolvimento da planta hospedeira (Eaton et al., 2011). O que tem sido demonstrado é que a colonização de rizóbios em gramíneas ocorre de forma diferente do que em leguminosas (Reddy et al., 1997; Chi et al., 2005). Por exemplo, Sharma et al. (2008) verificaram que *Burkholderia cepacia* entra nas raízes laterais emergentes sem a formação da linha de infecção como é o caso das rizobactérias simbióticas. O primeiro sinal sugerindo uma migração ascendente de uma estirpe de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* dentro de arroz foi identificado em estudos microscópicos que localizaram bactérias dentro de folhas e no colmo logo acima das raízes quando inoculado em cultura gnotobiótica (Yanni et al., 1997).

Em trabalho de Chi et al., (2005), quatro espécies de rizóbio marcados com proteína fluorescente *gfp* infectaram, disseminaram e colonizaram tecidos de arroz, indicando um processo dinâmico de infecção iniciando com a colonização superficial do rizoplane (especialmente nas raízes laterais emergentes), seguido por colonização endofítica dentro das raízes e então ascendendo por migração endofítica pelo colmo até as folhas, onde desenvolvem populações densas variando para mais de 9×10^{10} rizóbios por cm^3 de tecido infectado. 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.

Uma vez dentro das raízes, as bactérias endofíticas precisam passar a rede de Caspary na endoderme e sistemicamente disseminar-se para a parte aérea da planta (McCully, 2001; Dong et al., 2003; Zakria et al., 2007). Dentro da planta, as bactérias podem se multiplicar rapidamente podendo atingir 10^8 células g^{-1} de peso seco de tecido (Barraquio et al., 1997). Em plantas de arroz inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* marcado com o gene da proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* - GFP) e crescendo sob condições gnotobióticas, a população endofítica foi alta, atingindo 9×10^{10} células cm^{-3} de raiz e tecido foliar (Chi et al., 2005).

A migração vertical de bactérias endofíticas em plantas de arroz, cultivadas assepticamente, foi observada usando-se técnicas de isolamento de

bactérias em meio agarizado (Adams & Kloepper 2002; Kaga et al., 2009). Tem sido reportado que micro-organismos endofíticos ocorrem em virtualmente todos os tecidos das plantas hospedeiras, incluindo tecidos meristemáticos de plantas micropropagadas regenerados assepticamente (Dias et al., 2009; Lucero et al., 2008). Comparando as comunidades internas e externas de raízes de pepino (Mahaffee et al., 1997), algodão (Hallmann et al., 1999) e batata (Sturz, 1995), foi revelado que quase todas as bactérias endofíticas destas plantas também foram achadas na rizosfera. Também, a comunidade bacteriana endofítica em raízes de canola e trigo (Siciliano & Germida, 1999; Germida et al., 1998), algodão, milho doce (McInroy & Kloepper, 1995) e milho (Seghers et al., 2004), foram reportadas como sendo uma fração da comunidade do solo. População bacteriana endofítica e superficial de grãos (após remover as cascas) e folhas de plantas arroz cultivadas em solo irrigado foi investigada por Mano et al. (2006) e Mano et al. (2007) e verificou-se que entre as bactérias endofíticas dos grãos e folhas, 56 e 63% também foram isolados da superfície destas partes, respectivamente.

Embora as bactérias possam estar ausentes ou presentes em baixas densidades (10^1 - 10^3 UFC/g de tecido) em órgãos reprodutivos das plantas (Compant et al., 2010), os grãos de muitas plantas hospedeiras podem ser importantes vetores de disseminação endofítica (Okunishi et al., 2005; Mano et al., 2006; Mano et al., 2007). Apesar de ser ainda considerado um assunto controverso (Mano et al., 2008) a transmissão vertical de bactérias endofíticas tem sido observada pelo isolamento de bactérias em algodão e arroz cultivado assepticamente em meio agarizado (Adams & Kloepper 2002). Além disso, a eliminação de bactérias de tecidos superficiais das sementes e o crescimento de plântulas assepticamente em meio agarizado sugere que, uma vez germinadas, as bactérias endofíticas podem mover-se e mesmo colonizar a rizosfera de plantas (Kaga et al., 2009). A comunidade bacteriana dentro de plantas é propensa a ser influenciada pelas mudanças fisiológicas, portanto, vários fatores que modificam a fisiologia da planta, por exemplo, o estágio de crescimento, as propriedades químicas do solo, o manejo agrícola e até mesmo a densidade de bactérias, podem modificar significativamente a estrutura da comunidade endofítica (Hardoim et al., 2012).

Diante destas constatações, a disseminação de bactérias endofíticas via sementes pode ser mais comum do que se considerava previamente, e pode mesmo determinar vantagens ecológicas para a planta hospedeira carreadora de bactérias benéficas para superar condições ambientais adversas (Lopez-Lopez et al., 2010). Por meio da técnica de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (PCR-DGGE) para caracterização de produtos da amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do DNA extraído de sementes de arroz, observou-se que cerca de 45% da comunidade bacteriana das sementes da primeira geração de plantas foram localizadas na segunda geração (Hardoim et al., 2012). Apesar desta importância, poucos trabalhos na literatura buscaram determinar as populações de bactérias diazotróficas que colonizam as sementes do arroz (Elbeltagy et al., 2001; Verma et al., 2001; Rodrigues et al., 2008; Silva et al., 2011).

Para a grande maioria da população bacteriana endofítica presente em plantas, sua função ou ecologia dentro das plantas é ainda desconhecida. No entanto, as bactérias endofíticas particularmente podem ativamente influenciar a fisiologia do hospedeiro como resultado da produção de fito-hormônios e/ou modulação dos níveis de etileno do hospedeiro (Glick et al., 2007), promovendo o crescimento vegetal (Klironomos, 2002; Hardoim, 2012), conferindo às plantas hospedeiras uma vantagem competitiva sobre outras plantas presentes na comunidade (Himler et al., 2011) e inclusive aumentando a produtividade desta cultura (Anandham et al., 2008).

Para o estudo dos diferentes tipos de interação planta-microrganismo vários métodos podem ser utilizados para facilitar a visualização e a localização de microrganismos nas plantas. Tem sido usado uma variedade de marcadores tais como cromogênios (*gusA* e *lacZ*), compostos luminescentes (*luxAB*) e fluorescente como proteína verde-fluorescente (*gfp*). A proteína verde fluorescente (GFP), uma pequena proteína identificada originalmente na água-viva *Aequorea victoria*, é um excelente marcador para estudo de interações planta-bactérias (Chalfie et al., 1994; Gage et al., 1996; Errampalli et al., 1999). Como vantagens, aponta-se a fácil preparação das amostras para microscopia de fluorescência e a preservação da integridade dos tecidos e das estruturas das plantas e das bactérias que colonizam estas plantas.

2.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal em sistemas de rotação/consorciação de pastagens e sucessão de culturas

Tanto sistemas de rotação/consorciação de pastagens com leguminosas quanto culturas agrícolas cultivadas em sucessão a estas plantas podem ser beneficiadas pelo uso eficiente de bactérias promotoras de crescimento vegetal. Porém, para obter o máximo de eficiência de sistemas de produção, necessita-se a utilização de rizóbios e de outras bactérias diazotróficas que sejam eficientes para a promoção de crescimento destas plantas.

A utilização de gramíneas em consórcio com leguminosas é um excelente exemplo de como se pode aumentar a disponibilidade de N no solo, assim como a sustentabilidade dos sistemas pastoris (Assmann et al., 2004; Skonieski et al., 2011; Suriyagoda et al., 2011). Tem sido mostrado que o uso da inoculação de bactérias eficientes na FBN com leguminosas em consórcio com gramíneas pode reduzir os gastos diretos com N e outros minerais, aumentar a qualidade e a diversificação da dieta consumida pelos animais, melhorar a disponibilidade de forragem (Corre-Hellou et al., 2007; Olivo et al., 2010; Pappa et al., 2012) e, aumentar também o período de utilização das pastagens (Barcellos et al., 2008).

Além de suprir sua demanda por N, as leguminosas podem transferir este elemento às gramíneas durante seu crescimento (Høgh-Jensen & Schjoerring, 2000; Rasmussen et al., 2007). Ao mesmo tempo, o N também pode ser transferido da gramínea para a leguminosa (Gylfadottir et al., 2007; Rasmussen et al., 2007; Tomm et al., 1994), o que mostra que a transferência de N no solo é um processo bidirecional. Isto ocorre porque as plantas perdem diferentes componentes nitrogenados dos tecidos para o solo por rizodeposição pelas raízes e morte de nódulos e raízes (Hertenberger & Wanek, 2004; Paynel et al., 2008; Wichern et al., 2008; Dahlin & Stenberg, 2010; Fustec et al., 2010). Além desses mecanismos, o N pode ser transferido diretamente pelas micorrizas arbusculares que conectam as raízes de diferentes plantas (He et al., 2003; Moyer-Henry et al., 2006; Van der Heijden & Horton, 2009). Tem sido observada elevada variação nas quantidades de N

transferidas pelas leguminosas às gramíneas associadas, já tendo sido citados valores próximos de 80% do N fixado por plantas de trevo branco transferido para o azevém, em baixos níveis de adubação nitrogenada (Boller & Nösberger, 1987), assim como valores variando de 0 a 75% do N de trevo branco transferido às gramíneas associadas (Whitehead, 1995).

O trevo branco (*Trifolium repens*) é uma leguminosa forrageira perene que apresenta grande importância na composição de pastagens pela sua alta qualidade nutricional, aceitação pelos bovinos e alta capacidade de FBN em simbiose com rizóbios (Carlsson & Huss-Danell, 2003). Por isso é uma espécie muito utilizada na consorciação com gramíneas anuais ou perenes de inverno.

Sobre a capacidade de FBN do trevo branco, os valores têm variado de 54 a 291 kg.ha⁻¹ ano⁻¹ (Peoples et al., 1995), porém Elgersma & Hassink (1997), encontraram valores médios de N fixado de até 545 kg.ha⁻¹ ano⁻¹ na média de três cultivares de trevo e em quatro anos, associadas à azevém. Já Campillo et al., (2003) obtiveram, na média de quatro anos, valores que variaram de 232 a 396 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N fixado em trevo branco cultivado no Chile em monocultivo.

A inoculação de forrageiras dos gêneros *Lotus* e *Trifolium* com estirpes eficientes na FBN poderá também beneficiar a cultura de arroz em sucessão, seja pela decomposição de resíduos vegetais ou pelo aumento do teor de N do solo. Além disso, diversos trabalhos têm comprovado que rizóbios e outros gêneros de bactérias simbiotes podem estabelecer associações endofíticas e promover o crescimento de plantas de arroz (Yanni et al., 2001; Singh et al., 2006; Yanni & Dazzo, 2010). No Egito, os benefícios do cultivo do arroz em sucessão ao *Trifolium alexandrinum* são conhecidos pela população local há mais de sete séculos (Yanni et al., 1997) substituindo 25 a 33% da dose recomendada de N para o arroz em sucessão. Yanni et al., (2001) publicaram resultados de diversos estudos onde demonstraram o efeito de rizóbios sobre o rendimento da cultura do arroz, quando inserido em um bem implementado sistema de rotação de culturas com leguminosa forrageira. Nestes estudos, a inoculação de rizóbios isolados de plântulas de trevo alexandrino aumentou o rendimento de arroz em média 3,8 t ha⁻¹.

Em outro estudo (Rosenblueth e Martinez-Romero, 2004), sugere-se que em áreas onde milho é consorciado com feijão, parece haver uma seleção de rizóbios endofíticos pelas plantas de milho, semelhantemente ao visto com o arroz associado ao trevo alexandrino no trabalho de Yanni et al. (2001). Quando reinoculadas em plântulas de milho, algumas das estirpes provenientes dos tecidos da planta foram mais infectivas que as isoladas da rizosfera ou de nódulos de feijão.

2.4 Referências Bibliográficas

ADAMS, P.; KLOEPPER, J. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 240, p. 181-189, 2002.

ANANDHAM, R. et al. Potential plant growth promoting traits and bioacidulation of rock phosphate by thiosulfate oxidizing bacteria isolated from crop plants. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 48, p. 439-447, 2008.

ASSMANN, A. L. et al. Produção de gado de corte e acúmulo de matéria seca em sistema de integração lavoura-pecuária em presença e ausência de trevo branco e nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 37-44, 2004

BADRI, D. V.; VIVANCO, J. M. Regulation and function of root exudates. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 32, p. 666–681, 2009.

BAIS, H. P. et al. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, p. 26-32, 2004.

BAIS, H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.

BAKKER M. G. et al. Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 360, p. 1-13, 2012.

BARCELLOS, A. O. et al. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 51-67, 2008.

BARRAQUIO, W. L.; REVILLA, L.; LADHA, J. K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 15-24, 1997.

BÉCQUER, C. J. et al. Selection of rhizobium strains, inoculated in corn (*Zea mays*, L.), in field conditions in cattle ecosystems of Sancti Spiritus, Cuba. **Cuban Journal of Agricultural Science**, La Habana, v. 45, n. 4, 2011.

BENHAMOU, N. et al. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: Beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 45-56, 2000.

BHATTACHARJEE, R. B. et al. Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 48, n. 173-182, 2012.

BISWAS, J. C. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, p. 880-886, 2000.

BODDEY, R. M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 195-209, 1995.

BOLLER, B. C.; NÖSBERGER, J. Symbiotically fixed nitrogen from field-grown white and red clover mixed with ryegrasses at low levels of ¹⁵N-fertilization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 104, p. 219-226, 1987.

BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 69, p. 155-194, 2005.

BROECKLING, C. D. et al. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 74, p. 738-744, 2008.

CAMPILLO, R. et al. Estimación de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas forageras mediante la metodología del ¹⁵N. **Agricultura Técnica**, Santiago, v. 63, n. 2, p. 169-179, 2003.

CARLSSON, G.; HUSS-DANEL, K. Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 253, n. 2, p. 353-372, 2003.

CASTRO, R.O.; CANTERO, E.V.; BUCIO, J.L. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signalling. **Plant Signaling and Behaviour**, v. 3, n. 4, p. 263-265, 2008.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, Washington, v. 263, p. 802-805, 1994.

CHI, F. et al. 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.

COMPANT, S.; CLEMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.42, p. 669-678, 2010.

COMPANT, S. et al. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth promoting bacterium *Burkholderia* sp strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1685-1693, 2005.

CORRE-HELLOU, G. et al. Effect of root depth penetration on soil nitrogen competitive interactions and dry matter production in pea-barley intercrops given different soil nitrogen supplies. **Field Crops Research**, North Carolina, v. 103, p. 76-85, 2007.

CREUS, C. M. et al. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta**, Berlin, v. 221, p. 297-303, 2005.

DAHLIN, A.S.; STENBERG, M. Transfer of N from red clover to perennial ryegrass in mixed stands under different cutting strategies. **European Journal of Agronomy**, Montpellier, v. 33, p. 149–156, 2010.

DIAS, A. C. F. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 25, p. 189-195, 2009.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.; REIS, V. M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FRENDRIK, I. et al. (Ed.). ***Azospirillum* VI and related microorganisms**. Berlin: Springer, 1995. p. 3-14.

DONG, Y. M. et al. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1783-1790, 2003.

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 32, p. 227-243, 2011.

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**, 40: 452-461, 2007.

DUTTA, S.; MISHRA, A. K.; DILEEP KUMAR, B. S. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 452-461, 2008.

EATON, C. J.; COX, M. P.; SCOTT, B. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? **Plant Science**, Limerick, v. 180, n. 180, p. 190-195, 2011.

ELBELTAGY, A. et al. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 5285-5293, 2001.

ELGERSMA, A.; HASSINK, J. Effects of white clover (*Trifolium repens* L.) on plant and soil nitrogen and soil organic matter in mixtures with perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 197, p. 177-186, 1997.

ERRAMPALLI, D. et al. Applications of green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 35, p. 187-199, 1999.

FAURE, D.; VEREECKE, D.; LEVEAU, J. H. J. Molecular communication in the rhizosphere. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 321, p. 279-303, 2009.

FUSTEC, J. et al. Nitrogen rhizodeposition of legumes: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 30, p. 57-66, 2010.

GAGE, D. J.; BOBO, T.; LONG, S. R. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfafa (*Medicago sativa*). **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 7159-7166, 1996.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, n. 193-196, 1996.

GERMIDA J. J. et al. Diversity of root-associated bacteria associated with held-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford v. 26, p. 43-50, 1998.

GLICK, B.R.; TODOROVIC, B.; CZARNY, J.; CHENG, Z.; DUAN, J.; GLICK, B. R. et al. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Abingdom, v. 26, p. 227-242, 2007.

GOVINDARAJAN, M. et al. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 21-37, 2008.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plantbacterium signaling process. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 395-412, 2005.

GUTIERREZ-ZAMORA, M. L.; ROMERO, E. M. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 117-126, 2001.

GYLFADOTTIR, T.; HELGADOTTIR, A.; HØGH-JENSEN, H. Consequences of including adapted white clover in northern European grassland: transfer and deposition of nitrogen. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 297, p. 93-104, 2007.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 895-914, 1997.

HALLMANN, J.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J. W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 551, 1999.

HARDOIM, P. R. et al. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 2, e30438, 2012.

HE, X. H.; CRITCHLEY, C.; BLEDSOE, C. Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). **Critical Reviews in Plant Science**, Abingdom, v. 22, p. 531-567, 2003.

HEBBAR, K. P. et al. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: colonization of rhizosphere and roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 989-997, 1992.

HERTENBERGER, G.; WANEK, W. Evaluation of methods to measure differential N-15 labeling of soil and root N pools for studies of root exudation. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, New York, v. 18, p. 2415-2425, 2004.

HIMLER, A. G. et al. Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias. **Science**, Washington, v. 332, p. 254-256, 2011.

HØGH-JENSEN, H.; SCHJOERRING, J. K. Below-ground nitrogen transfer between different grassland species: direct quantification by N¹⁵ leaf feeding compared with indirect dilution of soil N¹⁵. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 227, p. 171-183, 2000.

HOULDEN, A. et al. Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 65, p. 193-201, 2008.

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

HUREK, T. et al. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, p. 1913-1923, 1994.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 10, p. 1078-1085, 2004.

KAGA, H. et al. Rice seeds as sources of endophytic bacteria. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 24, n. 2, p. 154-162, 2009.

KIELY, P. D. et al. Exploiting new systems-based strategies to elucidate plant-bacterial interactions in the rhizosphere. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, p. 257-266, 2006.

KLIRONOMOS, J. N. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. **Nature**, London, v. 417, p. 67-70, 2002.

LARCHER, M. et al. Early modifications of *Brassica napus* root system architecture induced by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* strain. **New Phytologist**, Cambridge, v. 160, p. 119-125, 2003.

LOPEZ-LOPEZ, A. et al. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 33, p. 322-327, 2010.

LUCERO, M. et al. A cryptic microbial community persists within micropropagated *Bouteloua eriopoda* (Torr.) Torr. cultures. **Plant Science**, Oxford, v. 174, p. 570-575, 2008.

LUGTENBERG, B. J. J.; DEKKERS, L. C. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? **Environmental Microbiology**, Washington, v. 1, p. 9-13, 1999.

MAHAFFEE, W. F.; KLOPPER, J. W. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Microbial Ecology**, New York, v. 34, n. 3, p. 210-23, 1997.

MANO, H.; MORISAKI, H. Endophytic bacteria in the rice plant. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 23, p. 109-117, 2008.

MANO, H. et al. endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 22, p. 175-185, 2007.

MANO, H. et al. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 21, n. 2, p. 86-100, 2006.

MARTINEZ-VIVEROS, O. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 10, p. 293-319, 2010.

MATTOS, K. A. et al. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p. 477-493, 2008.

McCULLY, M. E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 983-990, 2001.

MCINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 173, p. 337-342, 1995.

MICALLEF, S. A. et al. Plant age and genotype impact the progression of bacterial community succession in the *Arabidopsis* rhizosphere. **Plant Signaling and Behavior**, Vancouver, v. 4, p. 777-780, 2009.

MISHRA, M. et al. Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria for the enhancement of *Cicer arietinum* L. growth and germination under salinity. **Advances in Biology Research**, Dubai, v. 4, n. 2, p. 92-96, 2010.

MONTAÑEZ, A. et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 45, p. 253-263, 2009.

MOUGEL, C. et al. Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. **New Phytologist**, Cambridge, v. 170, p. 165-175, 2006.

MOYER-HENRY, K. A. et al. Nitrogen transfer between plants: a N¹⁵ natural abundance study with crop and weed species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 282, p. 7-20, 2006.

NARULA, N. et al. Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. **Plant, Soil and Environment**, Prague, v. 52, n. 3, p. 119-129, 2006.

NEAL, A. L. et al. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 4, 2012.

OKUNISHI, S. et al. Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 20, p. 168-177, 2005.

OLIVO, C. J. et al. Produção de forragem e carga animal de pastagens de *Coastcross* sobressemeadas com forrageiras de inverno. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 1, p. 68-73, 2010.

OSÓRIO FILHO, B. D. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. 2009. 113 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PAPPA, V. A. et al. Legumes intercropped with spring barley contribute to increased biomass production and carry-over effects. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 150, p. 584-594, 2012.

PATHMA, J.; KENNEDY, R. K.; SAKTHIVEL, N. Mechanisms of fluorescent pseudomonads that mediate biological control of phytopathogens and plant growth promotion of crop plants. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Bacteria in agrobiology: plant growth responses**. Berlin: Springer, 2011. p. 77–105.

PAYNEL, F.; LESUFFLEUR, F.; BIGOT, J.; DIQUELOU, S.; CLIQUET, J.B. A PAYNEL, F. et al. A study of N⁻¹⁵ transfer between legumes and grasses. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 28, p. 281–290, 2008.

PEDRAZA, R. O. et al. Growth promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 26, p. 265-272, 2010.

PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, n. 1-2, p. 3-28, 1995.

PIETERSE, C. M. J. et al. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 51-61, 2001.

PRAYITNO, J. et al. Interactions of rice seedlings with nitrogen-fixing bacteria isolated from rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 26, p. 521-535, 1999.

PRIGENT-COMBARET, C. et al. Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 65, p. 202-219, 2008.

RADWAN, T. S. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 997-1004, 2005.

RAJA, P. et al. Impact of bio inoculants consortium on rice root exudates, biological nitrogen fixation and plant growth. **Journal of Biological Sciences**, Adelaide, v. 6, p. 815-823, 2006.

RASMUSSEN, J. et al. *In situ* carbon and nitrogen dynamics in ryegrass-clover mixtures: transfers, deposition and leaching. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39 p. 804–815, 2007.

REDDY, P. M. et al. Rhizobial communication with rice: induction of phenotypic changes, mode of invasion, and extent of colonization in roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 81-99, 1997.

REINHOLD-HUREK, B. et al. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp, a root-invading diazotroph. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, p. 7056-7065, 1993.

RODRIGUES, E. P. et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 302, p. 249-261, 2008.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 181, p. 337-344, 2004.

SALEEM, M. et al. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 34, n. 10, p. 635-648, 2007.

SCHER, F.M.; BAKER, R. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt Pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 1567-1573, 1982.

SEGHERS, D. et al. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1475-1482, 2004.

SESSITSCH, A. et al. Advances in *Rhizobium* research. **Critical Reviews in Plant Science**, Abingdom, v. 21, p. 323-378, 2002.

SHARMA, S. et al. Colonization behavior of bacterium *Burkholderia cepacia* inside the *Oryza sativa* roots visualized using green fluorescent protein reporter. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 24, n. 7, p. 1169-1175, 2008.

SICILIANO, S. D.; GERMIDA, J. J. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 263-272, 1999.

SINGH, R.K. et al. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from rice (*Oryza sativa* L.) through rRNA gene PCR-RFLP and sequence analysis. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 345–349, 2006.

SKONIESKI, F. R. et al. Composição botânica e estrutural e valor nutricional de pastagens de azevém consorciadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 3, p. 550-556, 2011.

STURZ, A.V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 175, n. 2, p. 257-263, 1995.

SURIYAGODA, L. D. B. et al. Above-and below-ground interactions of grass and pasture legume species when grown together under drought and low phosphorus availability. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 348, p. 281–297, 2011.

THOMAS, R. J. Role of legumes in providing N for sustainable tropical pasture systems. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 103-118, 1995.

TOMM, G.O.; VANKESSEL, C.; SLINKARD, A.E. Bidirectional transfer of nitrogen between alfalfa and bromegrass – short and long-term evidence. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 164, p. 77–86, 1994.

VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. **Phytochemistry**, New York, v. 70, p. 1581-1588, 2009.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; HORTON, T.R. Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. **The Journal of Ecology**, Oxford, v. 97, p. 1139–1150, 2009.

VAN LOON, L.C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, p. 243-254, 2007.

VAN DE BROEK, A. et al. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 6, p. 592-600, 1993.

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**, Amsterdam, v. 91, n. 2-3, p. 127-141, 2001.

VESSEY, J.K; LUIT, B. The nitrate-tolerant symbiosis of *Glycine max* (L.) Merr, nts382 and *Bradyrhizobium japonicum* is also tolerant of ammonium. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 77, p. 1432-1438, 1999.

WALKER, V. et al. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 189, p. 494-506, 2011.

WICHERN, F. et al. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: methods, estimates and future prospects. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 30-48, 2008.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. In: VELAZQUEZ, E; BARRUECO, C. (Ed.) **First international meeting on microbial phosphate solubilization**. Berlin: Springer, 2007. p. 314

YANNI, Y. G.; DAZZO, F. B. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 336, p. 129-142, 2010.

YANNI, Y. G. et al. 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. et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 845-870, 2001.

YOUNG, J. P. W. et al. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. **Genome Biology**, London, v. 7, n. 4 (R34), 2006.

ZACHOW, C. et al. Strain-specific colonization pattern of *Rhizoctonia* antagonists in the root system of sugar beet. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 74, p. 124-135, 2010.

ZAKRIA, M. et al. Colonization and nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp strain B501 gfp1 and assessment of its growth-promoting ability in cultivated rice. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 22, p. 197-206, 2007.

3 CAPÍTULO II - PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE HÍBRIDOS DE MILHO INOCULADOS COM RIZÓBIOS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS

3.1 Introdução

O cultivo do milho apresenta grande importância econômica para o Brasil, que é o terceiro maior produtor mundial, com cerca de 56 milhões de toneladas na safra 2010/2011 e mais de 13 milhões de hectares cultivados (IBGE, 2012). No entanto, o rendimento médio das lavouras brasileiras é ainda baixo, $4200 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, em comparação ao produzido nos Estados Unidos, com cerca de $10000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, o que revela a necessidade de melhorias consideráveis no sistema de produção deste cereal.

Dentre os principais fatores determinantes para uma boa produção de milho está o fornecimento de nutrientes. O nitrogênio (N) se destaca por participar da composição dos aminoácidos, da clorofila e de muitas enzimas essenciais que estimulam o crescimento e o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular (Malavolta, 2006), sendo, por isso, o nutriente absorvido em maior quantidade e, também, o que causa maiores efeitos no aumento de produção da cultura do milho (Ohland et al., 2005). Infelizmente, menos que 50% do N aplicado via fertilizante é usado pelas plantas devido à ação de processos como a lixiviação, volatilização de amônia, desnitrificação, erosão e imobilização microbiana (Halvorson et al., 2002). O resultado desta baixa eficiência é a contaminação do solo e águas sub-superficiais, levando a danos na saúde e comprometendo a sustentabilidade agrícola (Tilman, 1998; Adesmoye & Kloepper 2009). Além disso, o uso de N via fertilizantes representa 75% dos custos da adubação do milho, o que corresponde a cerca de 40% dos custos totais de produção da cultura (Machado et al., 2001).

O aumento do fornecimento de N via fixação biológica (García de Salamone et al., 1996) ou o aumento de sua absorção pela planta (Hungria et al., 2010) seriam formas pelas quais os micro-organismos promotores de crescimento poderiam contribuir para melhorar a produção de milho sem a necessidade da utilização de maiores doses de nitrogênio mineral. Uma grande gama de bactérias promotoras de crescimento pode significativamente aumentar o crescimento e a produção de grãos de diversos cereais quando estas são inoculadas nas plantas (James & Olivares, 1997; Kennedy et al., 2004). Estas bactérias tanto podem ser endofíticas, colonizando tecidos internos das plantas, quanto rizosféricas. Em ambos os casos, não causam danos visíveis às plantas hospedeiras e podem promover o crescimento pela combinação de vários mecanismos. A promoção de crescimento pode ser uma consequência da FBN (Iniguez et al., 2004; Montañez et al., 2009), da produção de auxinas, citocininas, giberelinas e inibição de etileno (Arshad & Frankenberger, 1992), do antagonismo contra fitopatógenos pela produção de sideróforos (Scher & Baker, 1982) da competição por nutrientes, da indução de resistência sistêmica adquirida (Pieterse et al., 2003), ou pelo aumento da disponibilidade de minerais como fósforo (Sessitsch et al., 2002; Sturz et al., 2000).

Para o milho, é bem documentada a sua capacidade de estabelecer relações rizosféricas e/ou endofíticas, com promoção do crescimento das plantas, com vários gêneros bacterianos como *Pantoea*, *Herbaspirillum* e *Bacillus* (Palus et al., 1996), *Burkholderia* (Caballero-Mellado et al., 2004; Perin et al., 2006), *Azospirillum* (Chritansen-Weniger & Vanderleyden, 1994) e *Klebsiella* (Chelius e Triplett, 2000; Dong et al., 2001). No Brasil, o isolamento e seleção de estirpes de *A. brasilense* eficientes em promover o crescimento de milho por Hungria et al. (2010), permitiu o registro e comercialização do primeiro produto inoculante para esta cultura. Naquele trabalho, as cepas de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 aumentaram o rendimento de milho em 26%. Os autores afirmam que os efeitos da inoculação foram atribuídos ao aumento geral da absorção de macro e micronutrientes e não especificamente a FBN. Apesar disso, García de Salamone et al. (1996) relataram que algumas variedades de milho cultivadas em vasos a céu aberto puderam fixar por volta de 58% do seu requerimento em N, quando inoculadas com *Azospirillum*. Além

da capacidade de FBN, outros mecanismos de promoção de crescimento de *Azospirillum* são citados na literatura, como a produção de óxido nítrico (Creus et al., 2005), a atividade 1-aminociclopropano-1-decarboxilato desaminase (Prigent-Combaret et al., 2008), porém, a produção de fitoreguladores de crescimento vegetal, como as auxinas, é geralmente proposto como o mecanismo com os maiores benefícios às plantas pelo aumento do crescimento do sistema radicular (Dobbelaere et al., 2003).

Além destes gêneros, nos últimos anos, têm havido grande interesse em estudar e utilizar os próprios rizóbios isolados de nódulos de leguminosas como promotores de crescimento em inúmeras gramíneas. Resultados positivos na promoção de crescimento com a inoculação de rizóbios já foram obtidos em arroz (Yanni et al., 2001; Osório Filho, 2009; Yanni & Dazo, 2010; Bhattacharjee et al., 2012). Em plantas de milho, efeitos no aumento do crescimento também tem sido documentados, porém em menor número de trabalhos (Chabot et al., 1996; Gutierrez-Zamora & Romero, 2001, Bécquer et al., 2011).

Apesar dos resultados positivos na promoção de crescimento de plantas de milho com a inoculação de bactérias, tem sido mostrado que existem variações nas interações entre híbridos e cultivares de milho e bactérias diazotróficas (García de Salamone et al., 1996; Montañez et al., 2009; Walker et al. (2011). Estas observações sugerem que a promoção de crescimento seja dependente da interação entre o genótipo da planta e dos micro-organismos envolvidos nessas associações para expressar ao máximo sua capacidade de promoção de crescimento (Arsac et al., 1990; García de Salamone e Döbereiner, 1996; García de Salamone et al., 1996).

A interação de bactérias diazotróficas/genótipo de planta tem sido recentemente alvo de muitas investigações. Walker et al., (2011) verificaram que bactérias do gênero *Azospirillum* influenciavam diferentemente o metabolismo secundário das plantas de milho de acordo com a interação bactéria/variedade de milho utilizada. Compostos benzoxazinonas do metabolismo secundário de milho são rizodepositados em maiores quantidades em plantas inoculadas (Raja et al., 2006) e parecem servir como sinalizadores para uma efetiva interação bactéria/milho. Estes compostos, além de seu papel nos mecanismos de defesa da planta contra patógenos e pragas, também

interferem na funcionalidade de hormônios na planta. Neal et al., (2012) mostraram que raízes de milho produzindo um tipo de benzoxazinona, identificada como 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazina-3(4H)-1 (DIMBOA), atraem significativamente um maior número de *Pseudomonas putida*, uma espécie de bactéria promotora de crescimento e biocontroladora de fitopatógenos, do que raízes de milho mutantes do gene *bx1*, deficientes na produção de DIMBOA.

Diante da grande variabilidade de respostas das plantas de milho à inoculação com bactérias promotoras de crescimento, torna-se necessária a identificação das melhores associações entre bactérias diazotróficas e diferentes genótipos de milho com vistas a se obter o maior incremento no crescimento das plantas, maior aproveitamento dos nutrientes adicionados via fertilização mineral e aumentos na produção de grãos. Ainda é pouco estudada esta interação, especialmente a de rizóbios, eficientes na FBN em leguminosas, com plantas não-leguminosas (Mishra, 2006), e pouco sabe-se sobre a resposta de híbridos de milho cultivados no Rio Grande do Sul à inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal. O estudo dos efeitos das interações entre plantas e micro-organismos promotores de crescimento torna-se de fundamental importância para que se possa recomendar as melhores combinações entre estipes de bactérias selecionadas e híbridos de milho para cultivo comercial deste cereal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da inoculação de rizóbios e bactérias diazotróficas associativas na promoção de crescimento de híbridos de milho.

3.2 Material e métodos

O estudo foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os rizóbios avaliados foram UFRGS Vp16, pertencente à Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS, que foi isolado de nódulos de plantas de trevo branco coletadas em Veranópolis e selecionado pela eficiência na fixação de N em trevo branco (Alves, 2005; Alves et al., 2012) e a estirpe SEMIA 222, liberada para produção de inoculantes para trevo branco, obtida da Coleção de Culturas de Rizóbios da Fundação de Pesquisa Agropecuária do

Rio Grande do Sul (FEPAGRO). Avaliou-se também uma mistura de três isolados de *Azospirillum*, sendo UFRGS Lg1-R, obtido de raízes de plantas de milho coletadas em Eldorado do Sul (RS), UFRGS EI-S, obtido da rizosfera de plantas de milho coletadas em São Luiz Gonzaga (RS), e UFRGS M-S, obtido da rizosfera de plantas de milho coletadas em Marau (RS). Estes isolados foram selecionados pela produção de ácido indol acético (AIA) *in vitro* e pela alta eficiência na fixação biológica de N em milho cultivado no Rio Grande do Sul (Röesch et al. 2007).

Para a identificação dos isolados UFRGS Vp16, UFRGS Lg1-R, UFRGS EI-S e UFRGS M-S, o DNA total das bactérias foi extraído usando o Wizard kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A região de DNA do gene que codifica a porção 16S do ribossomo foi amplificada usando os primers universais F515 e R806 (Bates et al., 2011). Os fragmentos amplificados apresentaram tamanhos de aproximadamente 250 bp. As reações de PCR usando os primers universais foram realizadas em um volume de 20 µl contendo 1 µl de DNA, 1x tampão PCR, 2 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM dos primers e 1U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os ciclos empregados para amplificação foram: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, 25 ciclos incluindo desnaturação por 45 segundos a 94°C, anelamento por 45 segundos a 55°C, e extensão por 1 minuto a 72°C, seguido por uma etapa final de extensão de 6 minutos a 72°C (Bates et al., 2011). Os fragmentos foram sequenciados usando equipamento ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências parciais da região 16S DNAr dos isolados foram pesquisadas no GenBank com o programa BLAST 2.0.

Os três tratamentos com bactérias foram avaliados em cinco híbridos de milho comumente cultivados no estado do Rio Grande do Sul: híbrido AS 1572 (Agroeste Seeds), 30R50 e 30F53 (Pioneer Seeds) e NB 7205 e Fórmula (Syngenta Seeds). No experimento, foram usados vasos plásticos de 2 L contendo uma mistura 2:1 de vermiculita e areia, esterilizada em autoclave por 90 minutos a 120°C, e solução nutritiva estéril (Apêndice I) (Sarruge, 1975) diluída a 50% de concentração. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com quatro repetições.

Os cinco híbridos de milho e as inoculações dos três tratamentos com os isolados bacterianos foram combinados com duas doses de nitrogênio, uma dose equivalente a 60 kg.ha⁻¹ e uma dose equivalente a 120 kg.ha⁻¹. Além destes tratamentos, foram conduzidos dois tratamentos controle, controle N/2 – controle não inoculado com plantas dos híbridos de milho que receberam dose de N equivalente a 60 kg.ha⁻¹ e controle N, controle não inoculado com plantas dos híbridos de milho que receberam dose de N equivalente a 120 kg.ha⁻¹, totalizando 30 tratamentos.

As sementes de milho foram desinfestadas por imersões sucessivas em álcool (70%) por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) por um minuto e sete lavagens consecutivas com água destilada esterilizada em autoclave a 120°C por 15 minutos. Após, cinco sementes foram semeadas em cada vaso e cinco dias após, foi realizado o raleio, sendo mantidas duas plantas por vaso.

O N foi adicionado semanalmente, por meio de alíquotas de NH₄NO₃ (2,87 g.L⁻¹). Aplicou-se 5,0 e 10,0 mL desta solução por vaso nos tratamentos que receberam, respectivamente, uma dose equivalente a 60 e 120 kg.ha⁻¹ de N.

Para a produção do inóculo, os rizóbios (UFRGS Vp16 e SEMIA 222) foram inoculadas, isoladamente, em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio levedura manitol líquido (LM) (Vincent 1970) (Apêndice II), e os isolados de *Azospirillum* (UFRGS Lg1-R, UFRGS EI-S e UFRGS M-S) foram inoculados em meio de cultura Dygs (Rodrigues Neto et al., 1986) (Apêndice III). Os frascos foram colocados em incubador com agitação orbital de 120 rpm por seis dias a 28°C. A inoculação dos isolados nos vasos foi realizada seis dias após crescimento, com 5 mL de caldo de cultura contendo cerca de 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹, quantificados por contagem de células em microscopia em câmara de Neubauer. As plantas dos vasos que receberam os tratamentos com inoculação conjunta de *Azospirillum* foram inoculadas com 5 mL do caldo de cada um dos três isolados e os tratamentos controle receberam 5 mL de meio de cultura esterilizado.

Após 60 dias da semeadura, as plantas de milho foram cortadas, separando-se a parte aérea do sistema radicular. Após secagem em estufa, à

temperatura de 65 °C até peso constante, as amostras foram pesadas para quantificação da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular. Após foram trituradas para determinação do teor de nitrogênio na massa seca da parte aérea de acordo com Tedesco et al., (1995) e N total na massa seca da parte aérea.

Foi determinado também o Índice de Eficiência Relativa (IER) na produção de massa seca da parte aérea do milho e massa seca do sistema radicular. Para tal utilizou-se a equação abaixo, onde $TRAT_I$ corresponde ao valor da variável dos tratamentos inoculados com adição de N equivalente a 100% da dose completa de N, $CONT_{N/2}$ corresponde ao valor da variável dos tratamentos controle com adição de N equivalente a 50% da dose completa de N e $CONT_N$ corresponde ao valor da variável dos tratamentos controle com adição de N equivalente a 100% da dose completa de N.

$$IER (\%) = \left(\frac{(TRAT_I - CONT_{N/2}) - (CONT_N - CONT_{N/2})}{CONT_N - CONT_{N/2}} \right) X 100$$

Os resultados foram submetidos à análise da variância pelo programa estatístico ASSYSTAT (Silva et al., 2009) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

3.3 Resultados e discussão

O sequenciamento genético da região 16S rDNA dos isolados utilizados neste estudo identifica como pertencentes à *Burkholderia* sp. O isolado UFRGS Vp16 e *Azospirillum brasilense* os isolados UFRGS EI-S, UFRGS Lg1-R e UFRGS M-S (Tabela 3.1).

A inoculação das bactérias diazotróficas nas plantas mostrou haver respostas na promoção de crescimento dependente dos híbridos de milho. A inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 promoveu o crescimento das plantas de todos os híbridos, exceto as do híbrido de milho AS 1572 (Tabela 3.2), ao passo que a inoculação combinada dos três isolados de *Azospirillum* (UFRGS EI-S, UFRGS Lg1-R e UFRGS M-S) não teve efeito na promoção de crescimento dos híbridos 30R50 e Fórmula. Os efeitos diferenciados da inoculação das bactérias diazotróficas no crescimento das plantas de milho também pode ser visualizado pelos índices de eficiência relativa (IER) (Tabela

3.3). No híbrido 30F53, verificaram-se os maiores índices com a inoculação dos isolados de *Azospirillum* (29,2; 70,4 e 53,8%, respectivamente para MSPA, MSSR e N na MSPA) e do rizóbio UFRGS Vp16 (91,7; 88,9 e 109,2%, respectivamente para MSPA, MSSR e N na MSPA). Com a inoculação dos isolados de *Azospirillum*, os menores IER foram verificados no híbrido 30R50 e AS 1572 e, com a inoculação do rizóbio UFRGS Vp16, os menores IER foram verificados no híbrido AS 1572.

Tabela 3.1. Identificação dos rizóbios estudados pela sequência parcial dos genes 16S rRNA obtida com o programa BLASTn.

Isolados	Verossimilhança ⁽¹⁾	Id. (%) ⁽²⁾	Frag. ⁽³⁾	GenBank ⁽⁴⁾
UFRGS Vp16	<i>Burkholderia</i> sp.	100	276 pb	JN975051.1
SEMIA 222 ⁽⁵⁾	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	-	-	AY904729
UFRGS EI-S	<i>Azospirillum brasilense</i>	99	257 pb	GU256438.1
UFRGS Lg1-R	<i>A. brasilense</i>	100	268 pb	FN813475.1
UFRGS M-S	<i>A. brasilense</i>	99	275 pb	FN813475.1

⁽¹⁾Verossimilhança, gênero do organismo que possui a sequência com a qual a sequência parcial do gene 16S rRNA do isolado em estudo apresentou maior homologia. ⁽²⁾ Id.(%): identidade, porcentagem de identidade entre a sequência das estirpes estudadas e o organismo relacionado. ⁽³⁾Frag.: tamanho do fragmento, tamanho da sequência consenso. ⁽⁴⁾GenBank, número de acesso da sequência do organismo relacionado. ⁽⁵⁾ Informações sobre a estirpe obtidas em MAPA (2011).

Além de obter o menor IER com a inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 no híbrido de milho AS 1572 (-27,3; -4,1 e 1,7%, respectivamente para MSPA, MSSR e N na MSPA) (Tabela 3.3), este híbrido de milho não apresentou aumento na MSPA, MSSR e N na MSPA com a inoculação desta bactéria (Tabela 3.2). Por outro lado, a inoculação dos isolados de *Azospirillum* no híbrido 30R50 não teve nenhum efeito na MSPA, MSSR e N na MSPA, além de apresentar o menor IER em relação ao observado nos demais híbridos (Tabela 3.3).

Tabela 3.2. Massa seca da parte aérea, massa seca do sistema radicular e nitrogênio total na massa seca da parte aérea de híbridos de milho inoculados com bactérias diazotróficas em doses equivalentes a 60 e 120 kg.ha⁻¹ de nitrogênio.

Nitrogênio (kg.ha ⁻¹)		--- 60 ---					--- 120 ---					
Híbridos	30F53	NB 7205	30R50	AS 1572	Fórmula	30F53	NB 7205	30R50	AS 1572	Fórmula	CV	
Inoculantes	--- Massa seca da parte aérea (g) ---										%	
Controle	7,0 Ab	5,9 Ab	9,9 Aa	9,0 Aa	8,4 Aa	11,8 Ba	8,9 Ab	15,1 Ba	14,5 Aa	15,0 Aa	10,5	
<i>Azospirillum</i>	9,0 Aa	6,0 Ab	10,3 Aa	10,3 Aa	9,2 Aa	13,2 Bb	9,0 Ac	14,9 Ba	14,4 Aa	16,1 Aa		
SEMIA 222	7,8 Ab	5,8 Ab	9,5 Aa	9,4 Aa	8,9 Aa	11,8 Bb	8,9 Ac	14,8 Ba	14,7 Aa	15,9 Aa		
UFRGS Vp16	8,7 Ab	6,6 Ab	10,4 Aa	9,6 Aa	9,1 Aa	16,2 Aa	9,8 Ac	17,2 Aa	13,0 Ab	16,6 Aa		
--- Massa seca do sistema radicular (g) ---												
Controle	6,0 Bb	4,9 Bc	7,2 Aa	8,0 Aa	7,0 Aa	8,7 Bb	8,7 Ab	11,7 Ba	12,9 Aa	12,0 Ba	9,6	
<i>Azospirillum</i>	7,0 Ab	6,4 Ac	7,0 Ab	9,0 Aa	7,8 Aa	10,6 Ab	9,5 Ac	11,7 Bb	13,4 Aa	13,8 Ba		
SEMIA 222	6,2 Bb	4,9 Bb	8,2 Aa	7,8 Aa	7,7 Aa	9,2 Bb	8,3 Ab	11,1 Ba	11,6 Aa	12,7 Ba		
UFRGS Vp16	7,6 Aa	5,6 Ab	8,4 Aa	8,1 Aa	8,0 Aa	11,1 Ab	9,9 Ac	14,4 Aa	12,7 Ab	15,6 Aa		
--- Nitrogênio total na massa seca da parte aérea (mg) ---												
Controle	70,5 Bb	73,6 Ab	113,8 Aa	120,5 Ba	94,6 Ab	193,2 Cc	169,6 Bc	298,9 Aa	323,0 Aa	263,9 Bb	11,9	
<i>Azospirillum</i>	110,5 Aa	79,7 Ab	116,2 Aa	158,2 Aa	113,8 Aa	259,2 Bb	174,8 Bc	299,3 Aa	337,6 Aa	272,6 Bb		
SEMIA 222	81,9 Bb	77,2 Ab	106,4 Aa	124,1 Ba	96,0 Ab	203,0 Cc	173,2 Bc	298,5 Aa	323,4 Aa	273,4 Bb		
UFRGS Vp16	117,5 Aa	89,9 Ab	131,6 Aa	123,0 Ba	102,7 Aa	327,2 Aa	199,8 Ab	338,4 Aa	326,4 Aa	345,4 Aa		

Médias de tratamentos em cada dose de nitrogênio, seguidas de letra igual minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si (Scott-Knott<0,05). CV = coeficiente de variação.

Tabela 3.3. Índice de eficiência relativa (IER)^{*} (%) de bactérias diazotróficas inoculadas em cinco híbridos de milho na produção de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR) e nitrogênio na massa seca da parte aérea (N na MSPA).

Híbridos	Tratamentos	MSPA	MSSR	N na MSPA
30F53	<i>Azospirillum</i>	29,2	70,4	53,8
	SEMIA 222	0,0	18,5	8,0
	UFRGS Vp16	91,7	88,9	109,2
NB 7205	<i>Azospirillum</i>	3,3	21,1	5,4
	SEMIA 222	0,0	-10,5	3,7
	UFRGS Vp16	30,0	31,6	31,5
30R50	<i>Azospirillum</i>	-3,8	0,0	0,2
	SEMIA 222	-5,8	-13,3	-0,2
	UFRGS Vp16	40,4	60,0	21,3
AS 1572	<i>Azospirillum</i>	-1,8	10,2	7,2
	SEMIA 222	3,6	-26,5	0,2
	UFRGS Vp16	-27,3	-4,1	1,7
Fórmula	<i>Azospirillum</i>	16,7	56,0	5,1
	SEMIA 222	13,6	14,0	5,6
	UFRGS Vp16	24,2	72,0	48,1

(*) Valores positivos de IER do tratamento inoculado referem-se ao aumento do valor da variável em relação aos tratamentos controle com metade da dose de N (dose equivalente a 60 kg ha⁻¹ de N) e a dose completa de N (dose equivalente a 120 kg ha⁻¹ de N). Valores negativos referem-se a menores valores da variável em relação aos tratamentos controle.

De um modo geral, o híbrido de milho AS 1572 apresentou as maiores produções de MSPA, MSSR e N na MSPA e o híbrido de milho NB 7205 apresentou os menores valores destas variáveis (Tabela 3.2). Estes resultados ocorreram tanto para uma dose equivalente a 60 quanto 120 kg.ha⁻¹ de N, o que mostra haver diferenças no potencial genético entre os cinco híbridos testados (Santos et al., 2002).

Apesar das diferenças de crescimento entre os híbridos, foi no híbrido 30F53 que se obtiveram as maiores respostas às inoculações do rizóbio UFRGS Vp16 e dos três isolados de *Azospirillum* (Tabela 3.2), o que também pode ser visualizado nas figuras 3.1 e 3.2. No entanto, não foram observados estímulos em relação à produção de massa seca da parte aérea com a

inoculação dos isolados de *Azospirillum* e do rizóbio UFRGS Vp16 nas plantas deste híbrido de milho que receberam nitrogênio equivalente à 60 kg.ha⁻¹. Este resultado, provavelmente, se deve ao baixo fornecimento de nitrogênio às plantas. No entanto, em comparação ao tratamento controle, a inoculação dos isolados de *Azospirillum*, produziu aumentos de 16,2% na massa seca do sistema radicular e de 56,7% no teor de N total na massa seca da parte aérea das plantas que receberam 60 kg.ha⁻¹ de N. Nas plantas que receberam 120 kg.ha⁻¹ de N, a inoculação com o rizóbio UFRGS Vp16 aumentou em 26,7% a massa seca do sistema radicular e em 69,4% o teor de N total na massa seca da parte aérea.

Estes resultados comprovam a alta capacidade dos isolados de *Azospirillum* e do rizóbio UFRGS Vp16 em promover o crescimento de plantas de milho. A bactéria UFRGS Vp16 foi isolada de nódulos de trevo branco (*Trifolium repens*) e mostrou capacidade em solubilizar fosfato tricálcico (Alves, 2005). Esta bactéria pertence à espécie *Burkholderia* sp. pelo sequenciamento parcial do DNAr 16S, caracterizada com 100% de similaridade (Tabela 3.1). Espécies de *Burkholderia* são muito diversas no ambiente e possuem grande capacidade de promoção de crescimento de plantas, como demonstrado para arroz (Tran van et al., 2000; Chen et al., 2005; Govindarajan et al., 2008) e trigo (Kennedy et al., 1998; Kennedy & Islam, 2001; Okon & Labandera-Gonzalez, 1994). Para a cultura do milho, há poucos trabalhos com inoculação de bactérias deste gênero (Riggs et al., 2001; Miyauchi et al., 2008), apesar de ser frequentemente isolado da rizosfera ou de tecidos de plantas de milho (Viallard et al., 1998; Balandreau et al., 2001; Estrada-de-los-Santos et al., 2001; Fiore et al., 2001; Estrada-de-los-Santos et al., 2002; Caballero-Mellado et al., 2004; Perin et al., 2006; Arruda et al., 2013). Neste trabalho, a promoção de crescimento das plantas de milho pela inoculação do rizóbio UFRGS Vp 16 pode ser uma consequência da produção de auxinas, citocininas, giberelinas e inibição de etileno (Arshad & Frankenberger, 1992), antagonismo contra fitopatógenos pela produção de sideróforos (Scher & Baker, 1982), competição por nutrientes ou indução de resistência sistêmica adquirida (Pieterse et al., 2003), ou aumento da disponibilidade de minerais como fósforo (Sessitsch et al., 2002; Sturz et al., 2000).



Figura 3.1 Plantas de milho, híbrido 30F53, inoculadas com o rizóbio UFRGS Vp16 e sem inoculação, nos tratamentos que receberam N em doses equivalentes a 60 e 120 kg.ha⁻¹.

Os três isolados de *Azospirillum* usados neste experimento foram isolados por Roesch et al., (2007) de raízes (UFRGS Lg1-R) e da rizosfera (UFRGS EI-S e UFRGS M-S) de plantas de milho coletadas no estado do Rio Grande do Sul. Estes isolados destacaram-se entre 30 isolados pela produção de ácido indol acético (AIA), um fitoregulador de crescimento vegetal do grupo das auxinas, e pela capacidade de FBN. A capacidade do gênero *Azospirillum* em promover o crescimento de plantas de milho é bem documentada (Fallik et al., 1988; Chritansen-Weniger & Vanderleyden, 1994; Fallik & Okon, 1996; Jacoud et al., 1999; Joe et al., 2012). Neste trabalho, a promoção de crescimento das plantas de milho pode ser atribuída a diferentes mecanismos de promoção de crescimento, como a produção de fitoreguladores de crescimento vegetal como as auxinas (Dobbelaere et al., 2003), o aumento geral da absorção de macro e micronutrientes (Hungria et al., 2010), FBN (García de Salamone et al., 1996), produção de óxido nítrico (Creus et al.,

2005), e atividade 1-aminociclopropano-1-decarboxilato desaminase (Prigent-Combaret et al., 2008).

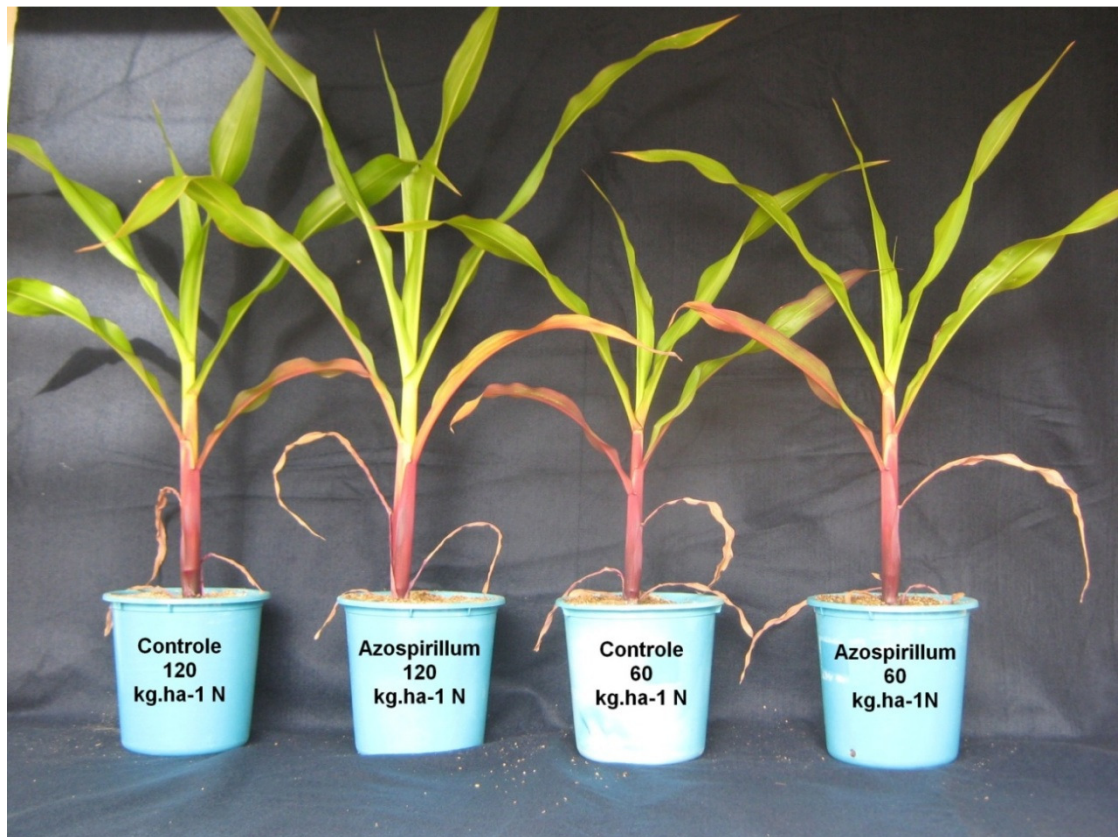


Figura 3.2 Inoculação dos isolados de *Azospirillum* (UFRGS EI-S, UFRGS Lg1-R e UFRGS M-S) e o tratamento controle sem inoculação no híbrido de milho 30F53 com doses equivalentes a 60 e 120 kg.ha⁻¹ de N.

Nas plantas dos híbridos 30R50 e Fórmula não se observou promoção de crescimento pela inoculação combinada dos isolados de *Azospirillum*, assim como no híbrido AS 1572 com a inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 (Tabela 3.2). Observou-se ainda que a inoculação da estirpe recomendada para trevo branco, a SEMIA 222, não promoveu o crescimento das plantas dos híbridos de milho. Pode-se inferir que as variações nestes resultados são devidas às interações entre híbridos de milho e bactérias diazotróficas e/ou promotoras de crescimento, as quais são dependentes dos genótipos da planta e dos micro-organismos envolvidos. Em estudos com espécies de *Azospirillum* tem sido demonstrado o efeito do genótipo da planta na promoção de crescimento para trigo (*Triticum aestivum* L.) (Kapulnik et al., 1987; Caballero-Mellado et al., 1992), milheto (*Pennisetum americanum* (L.) K. Shum.) (Bouton et al., 1985), assim como milho (*Zea mays* L.) (García de

Salamone et al., 1996). A influência da interação do genótipo da planta com bactérias diazotróficas na FBN também foi observada em experimento com 19 genótipos de milho cultivados em casa de vegetação, usando-se o método de diluição isotópica de ^{15}N , sendo que nas plantas a porcentagem de nitrogênio derivada do ar variou entre 12 e 33% (Montañez et al., 2009).

Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, Hebbar et al., (2002) e Bevivino (2000) não verificaram efeito de diferentes híbridos e cultivares de milho na promoção de crescimento com a inoculação de bactérias da espécie *Burkholderia cepacia*.

As respostas diferenciadas dos cinco híbridos de milho à inoculação dos rizóbios simbiotes de leguminosas, SEMIA 222 e UFRGS VP16, e da inoculação combinada de três isolados de *Azospirillum* sugere que, para haver um efeito estimulante nas plantas, seja de FBN, produção de fitoreguladores vegetais ou outro mecanismo de promoção de crescimento, é necessário haver um reconhecimento no nível bioquímico entre as duas partes e a interação bactéria/planta deve ser capaz de estabelecer populações bacterianas significativas na superfície radicular ou endofiticamente (Rothballer, et al., 2003), onde os micro-organismos podem ter um efeito significativo sobre a fisiologia da planta hospedeira. Uma consequência disso é que bactérias promotoras de crescimento podem diferir na capacidade de colonização das raízes e/ou tecidos internos, o que interfere na expressão da capacidade de promoção de crescimento da planta (Larcher et al., 2003; Pedraza et al., 2010; Bhattacharjee et al., 2012).

3.4 Conclusões

A inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 aumenta a produção de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e o nitrogênio na massa seca da parte aérea dos híbridos de milho 30F53, NB 7205, 30R50 e Fórmula, porém não tem efeito de promoção de crescimento sobre o híbrido de milho AS 1572.

A inoculação combinada de três isolados de *Azospirillum* (UFRGS EI-S, UFRGS Lg1-R e UFRGS M-S) aumenta a produção de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e o nitrogênio na massa seca da parte aérea

dos híbridos de milho 30F53, NB 7205 e AS 1572, porém nos híbridos 30R50 e Fórmula não têm efeito de promoção de crescimento pela inoculação com estas bactérias.

Entre os híbridos, o 30F53 foi o mais responsivo às inoculações.

3.5 Referências bibliográficas

ADESMOYE, A. O.; KLOEPPER, J.W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer use efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, n. 1, p. 1-12, 2009.

ALVES, J. B. **Seleção de rizóbios para trevo branco**. 2005. 68 f. (Dissertação) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ALVES, J. B.; SÁ, E. L. S.; MUNIZ, A. L. Seleção de rizóbios para o *Trifolium repens* em condições de solo alagado. **Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n. 1, 39-45, 2012.

ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 63, n. 15-22, 2013.

ARSAC, J. F. et al. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. **Agronomie**, Paris, v. 10, p. 649-654, 1990.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. JR. Microbial biosynthesis of ethylene and its influence on plant growth. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 12, p. 69-111, 1992.

BALANDREAU, J. et al. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 982-985, 2001.

BATES, S.T. et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME Journal**, Wageningen, v. 5, p. 908-917, 2011.

BÉCQUER, C. J. et al. Selection of rhizobium strains, inoculated in corn (*Zea mays*, L.), in field conditions in cattle ecosystems of Sancti Spiritus, Cuba. **Cuban Journal of Agricultural Science**, La Habana, v. 45, n. 4, 2011.

BEVIVINO, A. S. et al. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 31, p. 225-231, 2000.

BHATTACHARJEE, R. B. et al. Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 48, n. 173-182, 2012.

BOUTON, J. H.; ALBRECHT, S. L.; ZUBERER, D. A. Screening and selection of pearl millet for root associated bacterial nitrogen fixation. **Field Crops Research**, North Carolina, v. 11, p. 131-139, 1985.

CABALLERO-MELLADO, J.; CARCANO-MONTIEL, M. G.; MASCARUA-ESPARZA, M. A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 243-253, 1992.

CABALLERO-MELLADO, J. et al. *Burkholderia unamae* sp. nov. and N₂ fixing rizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CABALLERO-MELLADO, J.; CARCANO-MONTIEL, M. G.; MASCARUA-ESPARZA, M. A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 243-253, 1992.

CABALLERO-MELLADO, J. et al. *Burkholderia unamae* sp. nov. and N₂ fixing rizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumonia* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 66, p. 783-787, 2000.

CHEN, X. et al. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 2540-2548, 2005.

CHRITANSEN-WENIGER, C.; VANDERLEYDEN, J. Ammonium-excreting *Azospirillum* sp become intracellular established in maize (*Zea mays*) par-nodules. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 17, p. 1-8, 1994.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400 p.

CREUS, C. M. et al. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta**, Berlin, v. 221, p. 297-303, 2005.

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

DONG, Y. M. et al. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1783-1790, 2003.

ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, E.; BUSTILLO-CRISTALES, R.; CABALLERO MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

FALLIK, E.; OKON, Y.; FISHER, M. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 20, p. 45-49, 1988.

FALLIK, E.; OKON, Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 12, p. 511-515, 1996.

FIORE, A. et al. *Burkholderia cepacia* complex: distribution of genomovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy. **Environment Microbiology**, Oxford, v. 3, p. 137-143, 2001.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, n. 193-196, 1996.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E. et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 23, p. 249-256, 1996.

GOVINDARAJAN, M. et al. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 21-37, 2008.

GUTIERREZ-ZAMORA, M. L.; ROMERO, E. M. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 117-126, 2001.

HALVORSON, A. D.; PETERSON, G. A.; REULE, C. A. Tillage system and crop rotation effects on dry land crop yields and soil carbon in the Central Great Plains. **Agronomy Journal**, Madison, v. 94, p. 1429-1436. 2002.

HEBBAR, K. P. et al. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: colonization of rhizosphere and roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 989-997, 1992.

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

IBGE. **Levantamento Sistemático da produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. v. 25 n. 2 p.1-88, 2012.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 10, p. 1078-1085, 2004.

JACOUD, C. et al. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 339-342, 1999.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. B. Inoculation and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, p. 77-119, 1997.

JOE, M. M. et al. Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 50, p. 198-206, 2012.

KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Yield response of spring wheat (*Triticum aestivum*) to inoculation with *Azospirillum brasilense* under field conditions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 4, p. 27-35, 1987.

KENNEDY, I. R. et al. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems; can their potential for plant growth promotion be latter exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KENNEDY, I. R.; ISLAM, N. The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 41, p. 447-457, 2001.

LARCHER, M. et al. Early modifications of *Brassica napus* root system architecture induced by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* strain. **New Phytologist**, Cambridge, v. 160, p. 119-125, 2003.

MACHADO, A. T.; SODEK, L.; FERNANDES, M. S. N partitioning, nitrate reductase and glutamine synthetase activities in two contrasting varieties of maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 249-256, 2001.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 2006. 638 p.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABSTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 13, de 24 de março de 2011. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 mar. 2011. Seção 1.

MISHRA, R. P. N. et al. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 383-389, 2006.

MIYAUCHI, M. Y. H. et al. Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 5, p. 525-531, 2008.

MONTAÑEZ, A. et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 45, p. 253-263, 2009.

NEAL, A. L. et al. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 4, 2012.

OHLAND, R. A. A. et al. Culturas de cobertura do solo e adubação nitrogenada no milho em plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 538-544, 2005.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p.1591-1601, 1994.

OSÓRIO FILHO, B. D. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. 2009. 113 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PALUS, J. A. et al. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea mays* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 186, p. 135-142, 1996.

PEDRAZA, R. O. et al. Growth promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 26, p. 265-272, 2010.

PERIN, I. et al. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field grown maize and sugarcane. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3103-3110, 2006.

PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. **Symbiosis**, Rehovot, v. 35, p. 39-54, 2003. Suppl. 1-3.

PRIGENT-COMBARET, C. et al. Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 65, p. 202-219, 2008.

RAJA, P. et al. Impact of bio inoculants consortium on rice root exudates, biological nitrogen fixation and plant growth. **Journal of Biological Sciences**, Adelaide, v. 6, p. 815-823, 2006.

RIGGS, P. J. et al. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 829-836, 2001.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 12, p. 16, 1986.

RÖESCH, L. F. W. et al. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 23, p. 1377-1383, 2007.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. *In situ* localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. **Symbiosis**, Rehovot, v. 34, p. 261-279, 2003.

SANTOS, P. G. et al. Avaliação do desempenho agrônômico de híbridos de milho em Uberlândia, MG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 5, p. 597-602, 2002.

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

SCHER, F.M.; BAKER, R. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt Pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 1567-1573, 1982.

SESSITSCH, A. et al. Advances in *Rhizobium* research. **Critical Reviews in Plant Science**, Abingdom, v. 21, p. 323-378, 2002.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7., 2009, Reno. [**Proceedings...**] Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews of Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 1-30, 2000.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174 p.

TILMAN D. The greening of the green revolution. **Nature**, London, v. 396, p. 211-221, 1998.

TRAN VAN, V. et al. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 218, p. 273-284, 2000.

VIALLARD, V. et al. *Burkholderia graminis* sp. a now rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of (*Pseudomonas*) *phenazinium*, (*Pseudomonas*) *pyrrocinia* and (*Pseudomonas*) *glathei* as *Burkholderia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 48, p. 549-563, 1998.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific; 1970. 164 p.

WALKER, V. et al. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 189, p. 494-506, 2011.

YANNI, Y. G.; DAZZO, F. B. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 336, p. 129-142, 2010.

YANNI, Y. G. et al. 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. et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 845-870, 2001.

4 CAPÍTULO III - PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL PELA INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS EM TREVO BRANCO E AZEVÉM EM CULTIVO EXCLUSIVO E CONSORCIADO

4.1 Introdução

A pecuária leiteira é um sistema de produção que vem aumentando sua participação na economia do Rio Grande do Sul, representando uma alternativa viável em áreas tradicionalmente destinadas aos cultivos de arroz, soja, milho e feijão. No sul do Brasil, a principal fonte de alimento para os bovinos leiteiros são as pastagens formadas por gramíneas perenes e anuais. No entanto, tal prática traz um grande desafio para os pecuaristas devido à necessidade de aumento da disponibilidade de pastagem durante a estação fria. Isso tem levado à busca por informações sobre o desempenho e o manejo de espécies forrageiras temperadas, principalmente as adaptadas para o período de inverno, como o azevém e o trevo branco.

O nitrogênio (N) é o elemento que mais limita o crescimento e a persistência das gramíneas forrageiras (Whitehead, 1995) e contribui de forma expressiva no aumento dos custos da produção de leite (Alvim & Botrel, 2001). A disponibilidade de N no solo, assim como a sustentabilidade dos sistemas pastoris, podem ser melhoradas com a utilização de gramíneas em consórcio com leguminosas (Assmann et al., 2004; Skonieski et al., 2011; Suriyagoda et al., 2011). Tem sido mostrado que o uso de leguminosas em consórcio com gramíneas pode reduzir os gastos diretos com N e outros minerais, aumentar a qualidade e a diversificação da dieta consumida pelos animais, melhorar a disponibilidade de forragem pelo aporte de N fixado simbioticamente pela leguminosa com rizóbios (Corre-Hellou et al., 2007; Olivo et al., 2010; Pappa et

al., 2012) e, por fim, aumentar também o período de utilização das pastagens (Barcellos et al., 2008).

Além de suprir sua demanda por N, as leguminosas podem transferir este elemento às gramíneas durante seu crescimento (Høgh-Jensen & Schjoerring, 2000; Rasmussen et al., 2007). Ao mesmo tempo, o N também pode ser transferido da gramínea para a leguminosa (Gylfadottir et al., 2007; Rasmussen et al., 2007; Tomm et al., 1994), o que mostra que a transferência de N no solo é um processo bi-direcional. Isto ocorre porque plantas perdem diferentes componentes nitrogenados dos tecidos para o solo por rizodeposição pelas raízes e morte de nódulos e raízes (Hertenberger & Wanek 2004; Paynel et al., 2008; Wichern et al., 2008; Dahlin & Stenberg 2010; Fustec et al., 2010). Além desses mecanismos, o N pode ser transferido diretamente por micorrizas arbusculares que conectam raízes de diferentes plantas (He et al., 2003; Moyer-Henry et al., 2006; Van der Heijden & Horton 2009). Tem sido observada elevada variação nas quantidades de N transferidas pelas leguminosas às gramíneas associadas, já tendo sido citados valores próximos de 80% do N fixado por plantas de trevo branco transferido para o azevém, em baixos níveis de adubação nitrogenada (Boller e Nösberger, 1987), assim como valores variando de 0 a 75% do N de trevo branco transferido às gramíneas associadas (Whitehead, 1995).

O trevo branco (*Trifolium repens*) é uma leguminosa forrageira perene que possui grande importância na composição de pastagens pela sua alta qualidade nutricional, aceitação pelos bovinos e alta capacidade de FBN em simbiose com rizóbios (Carlsson & Huss-Danell, 2003). Por isso é uma espécie muito utilizada na consorciação com gramíneas anuais ou perenes de inverno. Sobre a capacidade de FBN do trevo branco, os valores têm variado de 54 a 291 kg.ha⁻¹ ano⁻¹ (Peoples et al., 1995), porém Elgersma & Hassink (1997), encontraram valores médios de N fixado de até 545 kg.ha⁻¹ ano⁻¹ na média de três cultivares de trevo e em quatro anos, associadas à azevém. Já Campillo et al. (2003) obtiveram, na média de quatro anos, valores que variaram de 232 a 396 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N fixado em trevo branco cultivado no Chile em monocultivo. A aplicação de N em pastagens de gramíneas consorciadas com trevo branco, além de constituir um alto custo relativo, pode diminuir a FBN por atrasar a nodulação (Crush, 1987), reduzir o número e o

tamanho de nódulos (Cowling, 1961), reduzir a atividade da enzima nitrogenase (Eltlib & Ledgard, 1988) e, indiretamente, pode diminuir a proporção do trevo branco na pastagem. No entanto, tem sido demonstrado que, mesmo com altas doses de N, estirpes de rizóbios são eficientes na FBN para leguminosas, o que mostra haver uma variação do efeito do nitrogênio sobre a interação entre a estirpe de rizóbio e a espécie ou cultivar de leguminosa (Gibson & Harper, 1985; Schtroschein, 2011).

Além da consagrada relação simbiótica entre leguminosas e rizóbios, que proporciona vantagens aos sistemas de produção, as gramíneas também podem ter seu crescimento estimulado pela inoculação de bactérias diazotróficas. Os próprios rizóbios isolados de nódulos de leguminosas têm sido estudados como promotores de crescimento em inúmeras gramíneas (Yanni et al., 2001, Osório Filho, 2009, Chi et al., 2005, Jha et al., 2009). Os rizóbios podem infectar as plantas e viver no interior de raízes, caules e folhas e estimular o crescimento por um ou mais dos seguintes mecanismos: produção de substâncias fitoreguladoras, como o ácido indol acético (AIA) (Biswas et al., 2000; Mantelin & Touraine, 2004; Chen et al., 2005), solubilização de fosfatos (Rodriguez & Fraga, 1999; Alikhani, 2006), e de forma indireta pela proteção das plantas contra patógenos (Mishra et al., 2006; Dutta et al., 2008) e por mecanismos como produção de sideróforos, quitinases, glucanases e antibiose (Whipps, 2001).

Outro grupo importante e bem estudado de bactérias promotoras de crescimento em gramíneas pertence ao gênero *Azospirillum*. A maioria das pesquisas com inoculação destas bactérias é realizada com gramíneas tropicais (Bashan & de-Bashan, 2010), sendo poucos trabalhos descritos na literatura com inoculação de gramíneas forrageiras temperadas (Kostov & Lynch, 1998; Monk et al., 2009). Além dos mesmos mecanismos de promoção de crescimento descritos para os rizóbios, bactérias do gênero *Azospirillum* possuem a capacidade de FBN em associação com gramíneas (James, 2000; Baldani & Baldani, 2005), podendo contribuir com 5 a 18% da quantidade de N requerida (Bashan & de-Bashan, 2010).

A eficiência da promoção de crescimento de leguminosas e gramíneas forrageiras depende de uma série de fatores, como a interação entre o genótipo das plantas e o micro-organismo, das condições climáticas e

do solo, da adubação nitrogenada e do manejo das plantas, que podem interferir no fluxo de N em um sistema de pastagem. Portanto, para obter o máximo de eficiência de sistemas de produção de pastagens com gramíneas e leguminosas, pode-se utilizar rizóbios e outras bactérias diazotróficas que sejam eficientes para a promoção de crescimento destas plantas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a promoção de crescimento em plantas de trevo branco e azevém, em cultivo exclusivo e consorciado, pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal.

4.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido a campo, em área da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizada no município de Eldorado do Sul, região ecoclimática da Depressão Central do RS. O clima, de acordo com a classificação de Köppen, é subtropical úmido com verão quente, do tipo fundamental Cfa. O solo do experimento é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico típico (EMBRAPA, 2006). Na implantação do experimento, o solo apresentou as seguintes características (0-20 cm de profundidade): pH em água 5,6, 280 g kg⁻¹ de argila, 24 g kg⁻¹ de matéria orgânica, 12,5 mg dm⁻³ de fósforo, 76 mg dm⁻³ de potássio, 2,6 cmol_c dm⁻³ de cálcio, 1,1 cmol_c dm⁻³ de magnésio e 0,5 cmol_c dm⁻³ de alumínio.

O experimento foi implantado em 2010 e conduzido por dois anos. No inverno foram cultivados trevo branco (*Trifolium repens*) cultivar Zapicán Estanzuela e azevém (*Lolium multiflorum*) cultivar comum, em cultivo exclusivo e consorciado. Após os cultivos de inverno de 2010 e 2011, foi cultivado milho durante o verão. Tanto os cultivos de inverno quanto de milho no verão foram combinados com dois tratamentos com doses de N, uma dose correspondente à dose completa de N e outra correspondente a 50% da dose completa, assim como três tratamentos de inoculação com rizóbios simbiotes em leguminosas e bactérias diazotróficas associativas e um tratamento controle, sem inoculação. Dessa forma, o experimento foi arranjado em um fatorial 3x2x4, ou seja, três cultivos com plantas de inverno, duas doses de N, e três inoculantes mais o tratamento controle.

Os rizóbios inoculados nas plantas foram: UFRGS Vp16 (*Burkholderia* sp.), pertencente à Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS, isolado de nódulo de trevo branco e selecionado pela sua alta eficiência de fixação biológica de N (FBN) (Alves, 2005 e Alves et al., 2012), SEMIA 222 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*), estirpe recomendada para produção de inoculantes de *Trifolium repens*, obtida da Coleção de estirpes SEMIA da FEPAGRO-RS. Também foi inoculada a mistura de três isolados de *Azospirillum brasilense*, UFRGS EI-S UFRGS Lg1-R e UFRGS M-S (, pertencente à Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS e que foram selecionados por sua alta eficiência na FBN em milho cultivado no Rio Grande do Sul e produção de ácido-indol-acético (AIA) *in vitro* (Röesch et al. 2007).

Nos tratamentos com azevém em cultivo exclusivo e consorciado com trevo branco, as doses de N utilizadas foram equivalentes a 50 kg.ha⁻¹ e a 100 kg.ha⁻¹, que corresponde à dose recomendada de N para o azevém, definida com base na análise do solo de acordo com COMISSÃO... (2004). No primeiro ano do experimento, em 2010, foram aplicados 20 kg.ha⁻¹ de N na semeadura e 80 kg.ha⁻¹ em cobertura no perfilhamento das plantas. No segundo ano, em 2011, quando foram realizados três cortes da parte aérea das plantas, foram aplicados 20 kg.ha⁻¹ na semeadura, 30 kg.ha⁻¹ em cobertura no perfilhamento e duas aplicações de 25 kg.ha⁻¹ cada aplicação em cobertura após cada corte da parte aérea. Nos tratamentos que receberam 50 kg.ha⁻¹ de N metade da dose foi aplicada na semeadura e a outra metade em cobertura no perfilhamento das plantas. No cultivo exclusivo de trevo branco, somente nas parcelas que receberam o tratamento controle sem inoculação foram aplicados 200 kg.ha⁻¹ de N, sendo no primeiro ano aplicados 80 kg.ha⁻¹ na semeadura e 120 kg.ha⁻¹ em cobertura 60 dias após a semeadura. No segundo ano, quando foram realizados dois cortes da parte aérea das plantas, a adubação nitrogenada foi parcelada, sendo 80 kg.ha⁻¹ aplicados na semeadura, 60 kg.ha⁻¹ aplicados em cobertura (60 dias após a semeadura) e mais 60 kg.ha⁻¹ após o primeiro corte.

A fonte de N empregada foi uréia (45% de N). Além da adubação nitrogenada, foram aplicados 120 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ nas parcelas com cultivo exclusivo de azevém e em consórcio com trevo branco, e 145 kg.ha⁻¹ de P₂O₅

naquelas com cultivo exclusivo de trevo branco. A fonte de fósforo utilizada foi superfosfato triplo (41% P_2O_5).

Foram semeadas quantidades proporcionais a $30 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de sementes de azevém e $6 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de sementes de trevo branco nos cultivos exclusivos e metade destas nos consorciados. As sementes foram distribuídas manualmente em toda a área no mês de junho e incorporadas pela passagem de uma grade leve.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições, tendo as parcelas dimensões de 4,0 m de comprimento por 3,0 m de largura.

Para a produção do inóculo, os rizóbios UFRGS Vp16 e SEMIA 222 foram inoculados em erlenmeyers de 250 mL com meio Levedura-Manitol líquido (LM) e os isolados de *Azospirillum* inoculados em erlenmeyers de 250 mL com meio Dygs líquido e colocadas em incubador orbital a 28°C , com agitação de 120 rpm por seis dias. Os caldos das bactérias foram misturados em água esterilizada e aplicados manualmente com regador sobre a área total da parcela logo após a semeadura. Para os tratamentos com os isolados UFRGS Vp16 e SEMIA 222 foram misturados 5 mL de caldo com 8×10^8 células mL^{-1} em 8 L de água, obtendo uma suspensão de 5×10^5 células mL^{-1} de água, sendo que $3,3 \times 10^8$ células foram aplicados por m^2 de parcela. Para os tratamentos que receberam a mistura dos três isolados de *Azospirillum*, 5 mL de caldo com $7,5 \times 10^8$ células mL^{-1} de cada isolado foram misturados em 8 L de água, obtendo uma suspensão de $1,4 \times 10^6$ células mL^{-1} de água, sendo que 9×10^8 células foram aplicados por m^2 de parcela. A contagem da concentração de células foi realizada em câmara de Neubauer.

No primeiro ano de experimento (2010), as avaliações da produção de massa seca da parte aérea e do teor de N da parte aérea das plantas foram realizadas em amostras coletadas em área de $0,25 \text{ m}^2$ ($0,50 \times 0,50 \text{ m}$) no mês de novembro por corte, manual e aleatório, a cinco cm do solo, sendo coletadas duas subamostras por parcela. No segundo ano de experimento (2011), as amostras foram formadas pelo corte da parte aérea, a cinco cm do solo, quando as plantas de azevém apresentavam altura média de 15 cm e as de trevo branco 10 cm. As amostras foram secadas em estufa a 65°C até peso constante e a determinação da concentração de N na massa seca da parte

aérea foi realizada de acordo com Tedesco et al., (1995). Nos tratamentos com trevo branco em cultivo exclusivo e em consórcio com azevém avaliou-se também o número de nódulos radiculares de 10 plantas por parcela. Estas plantas foram escolhidas aleatoriamente, retiradas das parcelas com todo o sistema radicular e levadas ao laboratório para contagem dos nódulos.

Foi determinado também o Índice de Eficiência Relativa (IER) na produção de massa seca da parte aérea do milho e massa seca do sistema radicular. Para tal utilizou-se a equação abaixo, onde $TRAT_I$ corresponde ao valor da variável dos tratamentos inoculados com adição de N equivalente a 100% da dose completa de N, $CONT_{N/2}$ corresponde ao valor da variável dos tratamentos controle com adição de N equivalente a 50% da dose completa de N e $CONT_N$ corresponde ao valor da variável dos tratamentos controle com adição de N equivalente a 100% da dose completa de N.

$$IER (\%) = \left(\frac{(TRAT_I - CONT_{N/2}) - (CONT_N - CONT_{N/2})}{CONT_N - CONT_{N/2}} \right) \times 100$$

A cobertura relativa da superfície do solo com trevo branco nas parcelas dos tratamentos com cultivo consorciado com azevém foi determinada pela análise de duas imagens por parcela obtidas com câmera fotográfica digital antes do último corte das plantas. As imagens foram analisadas utilizando-se o programa SisCob (EMBRAPA, 2003).

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se a análise da variância pelo programa estatístico ASSYSTAT (Silva et al., 2009) e comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3 Resultados e discussão

No cultivo exclusivo de azevém com adição de 50 e 100 kg ha⁻¹ de N, nos dois anos do experimento (2010 e 2011), não foram observadas diferenças na produção de massa seca da parte aérea (MSPA) entre os tratamentos com a inoculação das bactérias diazotróficas (Tabela 4.1). No entanto, considerando-se separadamente os valores de produção de MSPA em cada corte em 2011 (Figura 4.1), observa-se que no primeiro corte de azevém

aumentos de 160 kg.ha⁻¹ (19,5%) na produção de MSPA das plantas do tratamento com a inoculação dos três isolados de *Azospirillum* (UFRGS Lg1-R, UFRGS EI-S e UFRGS M-S), e aumentos de 273 kg.ha⁻¹ (33%) nas inoculadas com o rizóbio UFRGS Vp16, em comparação com o tratamento controle sem inoculação com 50 kg.ha⁻¹ de N. Observa-se também que a produção de MSPA das plantas inoculadas com UFRGS Vp16 com 50 kg.ha⁻¹ também se equivale à produzida pelas plantas do tratamento controle sem inoculação que receberam adição de 100 kg ha⁻¹ de N.

Ainda no cultivo exclusivo de azevém, no ano de 2010, não se obteve diferenças entre os tratamentos com inoculação de bactérias diazotróficas para N total na MSPA das plantas (Tabela 4.1). No entanto, em 2011, com adição de 50 kg ha⁻¹ de N, observou-se que o N total na MSPA das plantas que receberam a inoculação combinada dos três isolados de *Azospirillum*, que são capazes de fixar nitrogênio em gramíneas, foi maior do que o obtido nas plantas do tratamento controle sem inoculação com 50 kg ha⁻¹ de N, equivalendo a um aumento de 15,7 kg.ha⁻¹ de N. Porém, os valores foram equivalentes aos obtidos nas plantas dos tratamentos inoculados com os rizóbios SEMIA 222 e UFRGS Vp16 que não são capazes de fixar nitrogênio em gramíneas. Estes resultados mostram que, possivelmente, o estímulo ao crescimento das plantas de azevém não se deveu à FBN, mas sim a outros mecanismos. Os mecanismos de ação que têm sido documentados para explicar a promoção de crescimento por *Azospirillum* em plantas inclui a FBN (James, 2000; Baldani e Baldani, 2005), produção de óxido nítrico (Creus et al., 2005), e atividade de 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACC desaminase) (Prigent-Combaret et al., 2008). Porém, a produção de fitohormônios tais como auxinas tem sido comumente proposta como mecanismo principal (Dobbelaere et al., 2003).

O rizóbio UFRGS Vp16 foi isolado de nódulos de trevo branco (*Trifolium repens*) por Alves (2005). Bactérias do gênero *Burkholderia* são muito diversas no ambiente e tem sido comprovada a grande capacidade de promoção de crescimento que possuem, principalmente em plantas de arroz (Tran van et al., 2000; Chen et al., 2005; Govindarajan et al., 2008). Provavelmente, mecanismos semelhantes de promoção de crescimento de *Azospirillum* podem ser empregados pelo rizóbio UFRGS Vp16.

Tabela 4.1 Produção de massa seca da parte aérea e nitrogênio total na massa seca da parte aérea em azevém com a inoculação de bactérias diazotróficas em dois anos de cultivo e aplicação de duas doses de nitrogênio.

Nitrogênio (kg.ha ⁻¹)	Ano 2010				
	Controle	<i>Azospirillum</i>	SEMIA 222	UFRGS Vp16	CV
	Massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹)				(%)
50	2710,4 Aa	3035,9 Aa	2673,1 Ba	2830,7 Aa	11,5
100	2977,8 Aa	3424,8 Aa	3127,5 Aa	3145,5 Aa	
	Nitrogênio total na massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹)				
50	68,2 ns	64,7 ns	62,0 ns	63,2 ns	10,4
100	68,4 ns	68,2	69,4	71,8	
	Ano 2011				
	Massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹)				
50	3306,2 Aa	3555,1 Aa	3290,7 Ba	3488,1 Aa	14,7
100	3785,9 Aa	3760,6 Aa	4004,7 Aa	3910,7 Aa	
	Nitrogênio total na massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹)				
50	106,7 Bb	122,4 Ba	108,6 Bab	111,0 Bab	16,7
100	143,4 Aa	143,1 Aa	146,7 Aa	153,6 Aa	

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem entre si (Tukey, P<0,05). ns = não significativo.

Não se pode descartar a possibilidade de que a variação observada nos resultados de produção de MSPA e de teor de N total na MSPA em azevém se deva à interação ineficiente entre as bactérias e o genótipo de azevém utilizado. Isto poderia ser mais acentuado ainda ao se inocular bactérias em plantas diferentes daquelas de onde foram isoladas. Neste estudo o rizóbio UFRGS Vp16 foi isolado de nódulos de trevo branco por Alves (2005), e os três isolados de *Azospirillum* foram isolados por Roesch (2007) a partir da rizosfera de plantas de milho. Já foi anteriormente demonstrado que em trigo, isolados de *Azospirillum* obtidos da mesma espécie vegetal (homólogas), foram mais eficientes do que aqueles provenientes de plantas de espécies diferentes (Baldani e Döbereiner, 1980; Baldani et al., 1986). Em outras plantas, como milho (*Zea mays* L.) (Garcia de Salamone et al., 1996), e milheto (*Pennisetum*

americanum (L.) K. Shum.) (Bouton et al., 1985) o efeito do genótipo da planta na interação com as bactérias também tem sido demonstrado.

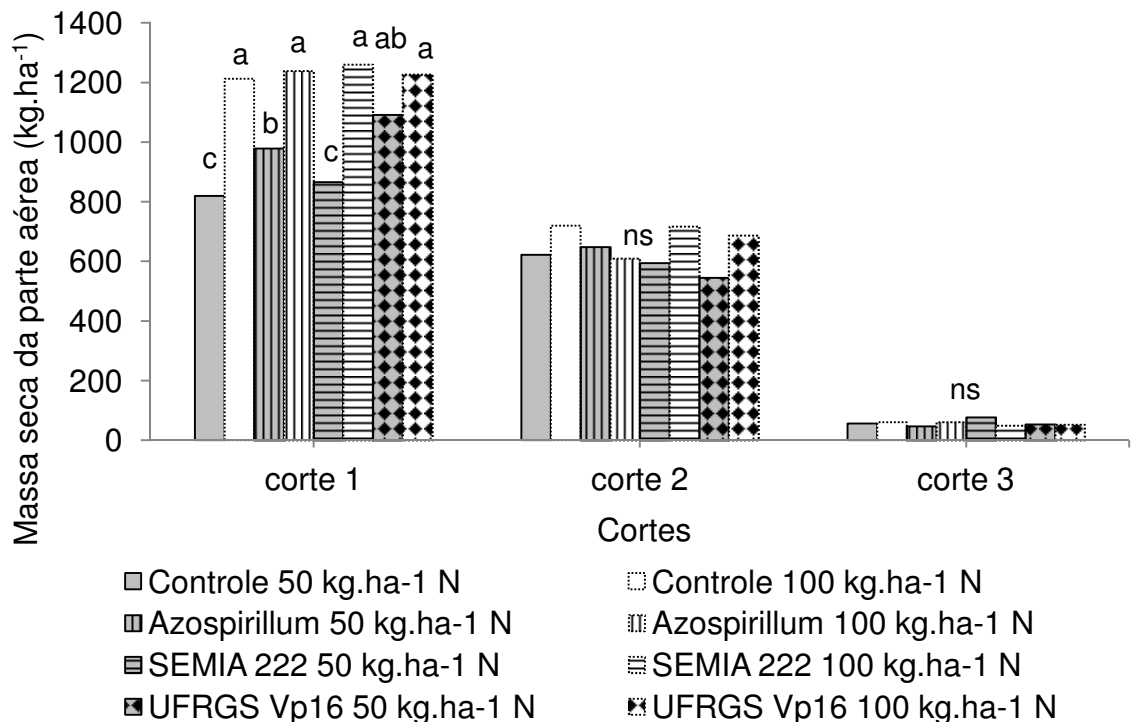


Figura 4.1 Produção de massa seca da parte aérea em três cortes de azevém inoculado com a inoculação de bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio no ano de 2011. Médias seguidas de letras iguais em cada corte não diferem entre si (Tukey, $P < 0,05$). ns = não significativo.

No cultivo de azevém consorciado com trevo branco não foram observadas diferenças entre os tratamentos com a inoculação das bactérias diazotróficas, tanto na produção de MSPA como no teor de N total na MSPA em relação ao tratamento controle nos dois anos de cultivo (Tabela 4.2), assim como na produção de MSPA no segundo e terceiro corte da parte aérea de azevém realizados no ano de 2011 (Figura 4.2). No primeiro corte da parte aérea de azevém houve maior produção de MSPA com 100 kg.ha⁻¹ de N. O cultivo de trevo branco em consórcio com azevém pode ter beneficiado o azevém pela transferência de N, pois mesmo no tratamento controle sem inoculação de rizóbios houve formação de nódulos nas plantas (Tabela 4.4), demonstrando a presença de rizóbios no solo local compatíveis com trevo branco. O N fixado pelo trevo branco e sua transferência para o azevém podem explicar a igualdade nas variáveis deste tratamento.

O argumento de que as plantas de azevém se beneficiaram pelo consórcio com plantas de trevo branco, é reforçado ao observarmos que a produção de MSPA e do N total na MSPA das plantas de azevém cultivado em consórcio com trevo branco nos tratamentos controle sem inoculação, foram semelhantes, mesmo com a adição de 100 kg ha^{-1} de N (Tabela 4.2). Somente no primeiro corte no ano de 2011 houve aumento na produção de MSPA (Figura 4.2) e do N total na MSPA (Figura 4.3). Ao contrário, foi verificado que o aumento da dose de N de 50 para 100 kg ha^{-1} aumentou a produção de MSPA do azevém em cultivo exclusivo quando inoculado com a SEMIA 222 nos dois anos de experimento, e aumentou, no ano de 2011, o N total na MSPA em todos os tratamentos (Tabela 4.1).

Tabela 4.2 Produção de massa seca da parte aérea e nitrogênio total da na massa seca da parte aérea em plantas de azevém, em cultivo consorciado com trevo branco em dois anos de cultivo, inoculadas com bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio.

Nitrogênio (kg ha^{-1})	Ano 2010				CV (%)
	Controle	<i>Azospirillum</i>	SEMIA 222	UFRGS Vp16	
	Massa seca da parte aérea (kg ha^{-1})				
50	3069,0 ns	3000,6 ns	2946,7 ns	2922,7 ns	10,3
100	2979,4 ns	2916,8	2986,0	2976,7	
	Nitrogênio total na massa seca da parte aérea (kg ha^{-1})				
50	54,4 ns	61,0 ns	56,6 ns	56,8 ns	11,6
100	62,2 ns	61,5	74,4	65,1	
	Ano 2011				
	Massa seca da parte aérea (kg ha^{-1})				
50	3594,4 ns	3428,9 ns	3456,9 ns	3891,6 ns	21,7
100	4035,7 ns	4161,4	4042,9	4335,2	
	Nitrogênio total na massa seca da parte aérea (kg ha^{-1})				
50	138,7 ns	162,9 ns	134,3 ns	128,1 ns	12,6
100	162,9 ns	162,3	158,8	159,1	

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem entre si (Tukey, $P < 0,05$). ns = não significativo.

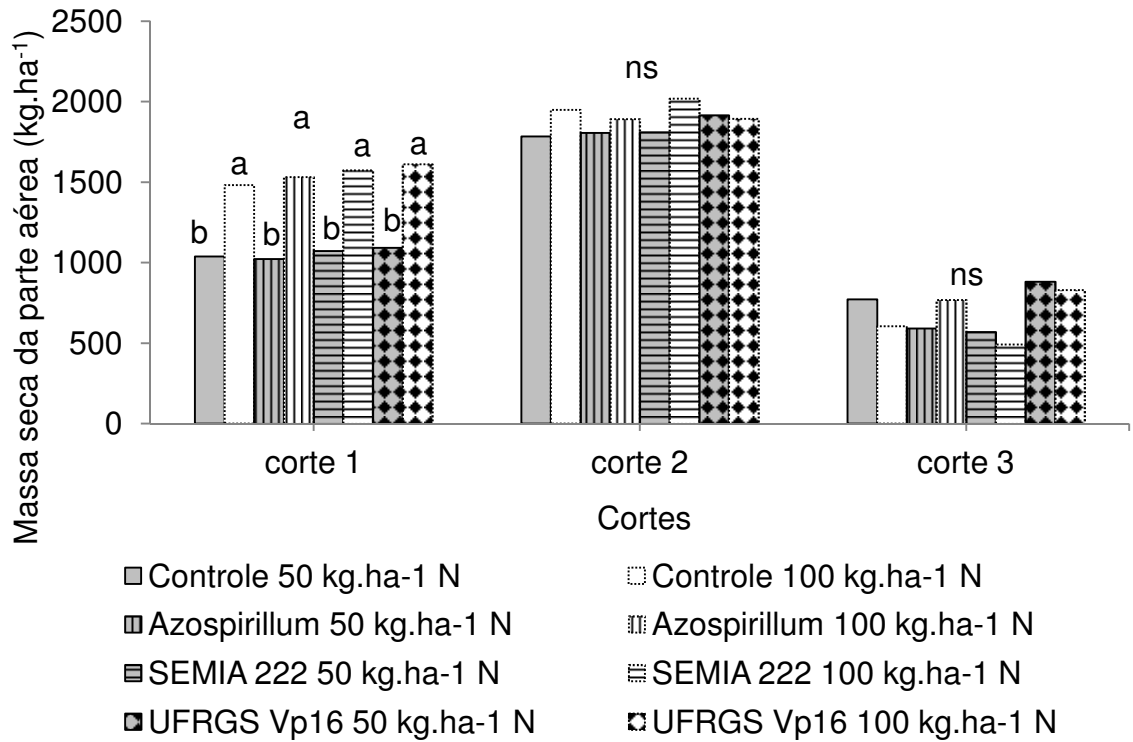


Figura 4.2 Produção de massa seca da parte aérea em três cortes de azevém consorciado com trevo branco inoculado com bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio na safra 2011. Médias seguidas de letras iguais em cada corte não diferem entre si (Tukey, $P < 0,05$). ns = não significativo.

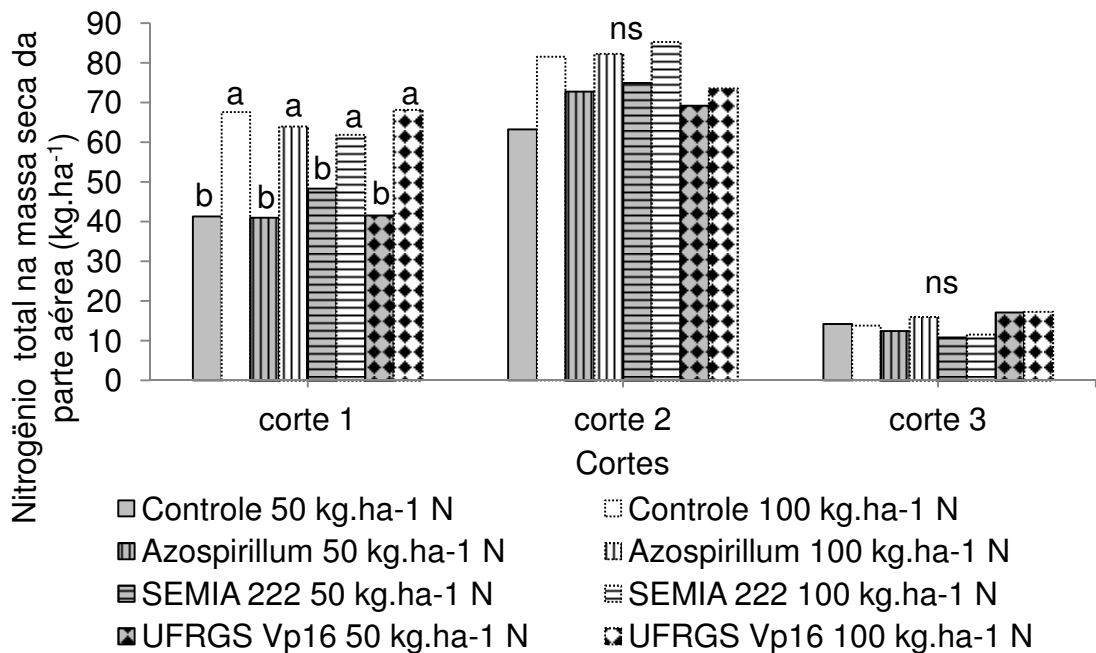


Figura 4.3 Nitrogênio total na massa seca da parte aérea em três cortes de azevém consorciado com trevo branco inoculado com bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio na safra 2011.

Médias seguidas de letras iguais em cada corte não diferem entre si (Tukey, $P < 0,05$). ns = não significativo.

A inoculação da estirpe recomendada para trevo branco SEMIA 222 proporcionou aumento do crescimento das plantas de trevo branco (Tabelas 4.3 e 4.4 e Figuras 4.4, 4.5 e 4.6) em relação ao tratamento controle sem inoculação e sem aplicação de N e ao tratamento inoculado com *Azospirillum*, principalmente no ano de 2011. Além disso, observou-se que no cultivo exclusivo de trevo branco (Tabela 4.3), no ano de 2011, houve maior produção de MSPA nas plantas do tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 222 em comparação ao tratamento controle com aplicação de 200 kg.ha^{-1} de N, demonstrando a sua alta eficiência na FBN. Os índices de eficiência relativa (IER) da produção de MSPA e N na MSPA mostram a maior capacidade de crescimento das plantas de trevo branco nos tratamentos inoculados com esta estirpe (Tabela 4.5). No cultivo de trevo branco exclusivo o IER para SEMIA 222 foi de 194,6 em 2010 e 223,6 em 2011 para produção de MSPA e 205,9 em 2010 e 237,5 em 2011 para N na MSPA.

A inoculação do isolado UFRGS Vp16 apresentou o mesmo desempenho na promoção de crescimento do trevo branco que a utilização de 200 kg.ha^{-1} e um desempenho um pouco abaixo ao da estirpe SEMIA 222 (Tabela 4.3). Somente no cultivo consorciado com azevém no ano de 2010 com 50 kg.ha^{-1} de N (Tabela 4.4) que a inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 apresentou menor produção de MSPA em relação à produção de MSPA do cultivo consorciado com azevém inoculado com a estirpe SEMIA 222. Para a variável N total na MSPA de trevo branco, tanto no cultivo exclusivo quanto no consorciado, a inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 e da estirpe SEMIA 222 não mostraram diferença. Os altos valores de índice de Eficiência Relativa (IER) do rizóbio UFRGS Vp16 (Tabela 4.5) comprovam a eficiência deste isolado na promoção de crescimento do trevo branco. No cultivo de trevo branco exclusivo o IER foi de 127,8 em 2010 e 113,9 em 2011. Já em 2011 o IER foi de 43,7 em 2010 e 329,1 em 2011. O rizóbio UFRGS Vp16 foi isolado por Alves (2005) e nos experimentos em casa de vegetação, em solo com umidade próximo da capacidade de campo ou sob um período de 30 dias de alagamento, demonstrou eficiência semelhante à estirpe SEMIA 222 na produção de MSPA e N total da MSPA em trevo branco.

Tabela 4.3 Massa Seca da Parte Aérea (MSPA), Nitrogênio total na Massa Seca da Parte Aérea (N total MSPA) e número de nódulos de trevo branco em cultivo exclusivo inoculado com bactérias diazotróficas em dois anos de cultivo.

		Ano 2010					
Variáveis	Controle	Controle	<i>Azospirillum</i>	SEMIA	UFRGS	CV (%)	
	- N	+ N		222	Vp16		
MSPA (kg.ha ⁻¹)	1855,2 b	2046,7 ab	1908,1 b	2227,8 a	2100,0 ab	12,8	
N total MSPA (kg.ha ⁻¹)	59,4 b	69,5 ab	61,1 b	80,2 a	73,6 a	15,2	
Número de Nódulos*	27,25 b	22,0 c	29,6 b	46,6 a	38,8 a	42,0	
		Ano 2011					
	Controle	Controle	<i>Azospirillum</i>	SEMIA	UFRGS		
	- N	+ N		222	Vp16		
MSPA total (kg.ha ⁻¹)	2993,4 d	3671,5 bc	3244,7 cd	4509,7 a	3765,6 bc	15,2	
N total MSPA (kg.ha ⁻¹)	95,8 b	121,9 b	103,8 b	157,8 a	128,0 ab	13,2	
Número de Nódulos*	19,9 b	25,9 b	21,3 b	34,4 a	37,4 a	51,2	

Médias seguidas de letra igual não diferem entre si (Tukey<0,05). ns = não significativo. * Dados transformados por raiz quadrada de x+1.

Tabela 4.4 Massa seca da parte aérea, Nitrogênio total na massa seca da parte aérea, número de nódulos e percentagem de cobertura do solo de trevo branco em consórcio com azevém inoculado com bactérias diazotróficas em dois anos de cultivo e aplicação de duas doses de nitrogênio.

Ano 2010					
Nitrogênio (kg.ha ⁻¹)	Controle	<i>Azospirillum</i>	SEMIA 222	UFRGS Vp16	CV (%)
Massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹)					
50	190,6 Ab	210,9 Ab	617,4 Aa	245,1 Ab	44,9
100	65,8 Bc	98,2 Bc	245,9 Ba	179,5 Bab	
Nitrogênio total na massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹)					
50	7,0 Ab	7,6 Ab	21,7 Aa	8,6 Ab	43,2
100	2,2 Bb	3,2 Bb	8,3 Ba	6,3 Aa	
Número de nódulos*					
50	24,3 Ab	23,8 Ab	37,6 Aa	38,5 Aa	42,0
100	11,0 Bb	27,9 Aab	41,2 Aa	39,0 Aa	
--- Cobertura do solo (%) ---					
50	12,4 Ab	11,4 Ab	19,2 Aa	13,4 Aab	44,8
100	7,5 Ab	5,8 Ab	11,0 Ba	14,2 Aa	
Ano 2011					
Massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹)					
50	186,2 Ab	210,0 Ab	377,2 Aa	334,3 Aa	44,9
100	141,2 Bb	133,1 Bb	237,1 Ba	223,8 Ba	
Nitrogênio total na massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹)					
50	7,7 Ab	8,7 Ab	16,6 Aa	14,7 Aa	43,2
100	6,4 Ab	5,4 Ab	11,5 Aa	10,0 Aa	
Número de nódulos*					
50	8,0 Ab	7,7 Ab	25,3 Aa	13,4 Bab	35,7
100	4,3 Bc	4,5 Ac	23,3 Ab	33,9 Aa	
Cobertura do solo (%)					
50	7,3 Ab	8,0 Ab	17,0 Aa	15,9 Aa	39,6
100	5,0 Aa	4,7 Aa	4,3 Ba	5,2 Ba	

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem entre si (Tukey, P<0,05). ns = não significativo. Dados transformados por raiz de x + 1.

A inoculação da estirpe SEMIA 222 nas plantas de trevo em cultivo consorciado com azevém aumentou mais de 320% a produção de MSPA de

trevo branco em relação ao tratamento controle com 50 kg.ha⁻¹ de N e mais de 370% em relação ao controle com 100 kg.ha⁻¹ de N no ano de 2010 e mais de 200 e 160%, respectivamente para 50 e 100 kg.ha⁻¹ de N, no ano de 2011 (Tabela 4.4). Estas diferenças também podem ser visualizadas na produção de MSPA (Figura 4.6) e de N na MSPA (Figura 4.7) nos três cortes realizados em 2011. Os dados obtidos reforçam a eficiência da simbiose com SEMIA 222 e por consequência da inoculação do trevo branco.

Tabela 4.5 Índice de eficiência relativa (IER)* (%) da inoculação com isolados bacterianos em azevém e trevo branco em cultivo exclusivo e em consórcio.

Cultivos	Isolados	2010		2011	
		MSPA	N MSPA	MSPA	N MSPA
Azevém	<i>Azospirillum</i>	167,2	-100,0	-5,3	-0,8
	SEMIA 222	56,0	50,0	45,6	9,0
	UFRGS Vp16	62,7	170,0	26,0	27,8
Azevém consorciado com trevo branco	<i>Azospirillum</i>	69,9	-9,0	28,5	-2,5
	SEMIA 222	-7,4	156,4	1,6	-16,9
	UFRGS Vp16	3,0	37,2	67,9	-15,7
Trevo branco	<i>Azospirillum</i>	27,6	16,8	37,1	30,7
	SEMIA 222	194,6	205,9	223,6	237,5
	UFRGS Vp16	127,8	140,6	113,9	123,4
Trevo branco consorciado com azevém	<i>Azospirillum</i>	-26,0	-20,8	18,0	76,9
	SEMIA 222	-144,3	-127,1	-213,1	-392,3
	UFRGS Vp16	-91,1	-85,4	-183,6	-276,9

(*) Valores positivos de IER do tratamento inoculado referem-se ao aumento do valor da variável em relação aos tratamentos controle com metade da dose de N e a dose completa de N. Valores negativos referem-se a menores valores da variável em relação aos tratamentos controle.

A inoculação de trevo branco com estirpes simbióticas eficientes na FBN é importante para seu cultivo consorciado, o que aumenta consideravelmente a capacidade de competição do trevo branco com a gramínea e contribui para o aumento da produção de forragem nestas áreas. Na Nova Zelândia, país onde a produção de leite é baseada principalmente no consórcio de azevém com trevo branco, dados de 10 experimentos sumarizados por Lowther & Kerr (2011) mostram que a efetividade no aumento

da produção de massa seca com a inoculação de rizóbios em trevo branco variou em média de 69 a 85%.

Em relação à superfície do solo coberta por plantas de trevo branco em cultivo consorciado com azevém, observou-se que houve maior área de solo coberto nos tratamentos inoculados com a estirpe SEMIA 222 e com o isolado UFRGS Vp16 em relação ao tratamento controle com 50 kg.ha⁻¹ de N e ao tratamento com inoculação dos isolados de *Azospirillum* com 50 kg.ha⁻¹ de N nos dois anos de avaliação (Tabela 4.4 e Figura 4.8). A cobertura do solo com plantas de trevo branco nos tratamentos inoculados com estes dois isolados foi, em média, duas a três vezes maior do que a observada nos demais tratamentos. Estes resultados, muito provavelmente, se devem ao maior aporte de N das plantas da leguminosa devido à FBN eficiente realizada pelos rizóbios inoculados. No entanto, nos cultivos realizados no ano de 2011 com a adição de 100 kg.ha⁻¹ de N, não se observaram diferenças na cobertura do solo com plantas de trevo (Figura 4.6), provavelmente devido ao fato de a avaliação ter sido realizada antes do terceiro corte das plantas, quando não houve mais diferenças na produção de MSPA entre os tratamentos.

De um modo geral, a produção de MSPA e de N total na MSPA do trevo branco em consórcio foram maiores nos tratamentos conduzidos nas parcelas que receberam 50 kg.ha⁻¹ de N do que naquelas que receberam 100 kg.ha⁻¹ (Tabela 4.4). Há vários relatos que mostram haver diminuição do crescimento da leguminosa em pastagem consorciada com o aumento da adubação nitrogenada (Davis & Evans 1990; Harris, 1990), o que seria atribuída a maior competitividade do azevém por água, luz e nutrientes, o que desfavorecia a leguminosa. Somente no primeiro corte no ano de 2011 houve maior produção de MSPA (Figura 4.2) e N total na MSPA (Figura 4.3) das plantas de azevém em consórcio com trevo branco nas parcelas com aplicação de 100 kg.ha⁻¹ de N em relação às parcelas que receberam 50 kg.ha⁻¹ de N. No ano de 2010, quando apenas um corte foi realizado (Tabela 4.2) e no ano de 2011, no segundo e terceiro corte, não houve efeito do N na produção de MSPA e N total na MSPA do azevém.

A nodulação das plantas de trevo branco, tanto no cultivo exclusivo (Tabela 4.3) quanto no consorciado com azevém (Tabela 4.4) aumentou com a inoculação dos isolados SEMIA 222 e UFRGS Vp16. Houve formação de

nódulos nas plantas dos tratamentos controle sem inoculação de rizóbios, demonstrando a presença de rizóbios no solo local compatíveis com trevo branco. Porém, estes apresentaram menor eficiência simbiótica demonstrada pelo fato de que a produção de MSPA e a quantidade de N total na MSPA do tratamento controle sem inoculação e com adição de 50 kg.ha⁻¹ de N foi menor em relação aos demais. Observa-se também que, mesmo a utilização de quantidades maiores de N (100 kg.ha⁻¹) no cultivo de trevo branco em consórcio com azevém não ocorreu diminuição no número de nódulos radiculares nos tratamentos inoculados com os isolados SEMIA 222 e UFRGS Vp16. Tem sido constatado que em leguminosas forrageiras, a exemplo da alfafa, o processo de FBN é mantido mesmo com uso de maiores concentrações de N (Schtroschein, 2011). Altas concentrações de N podem ou não reduzir a nodulação, pois o grau de inibição pode mudar de acordo com a especiação química do N (NO₃⁻ ou NH₄⁺), a sua concentração próxima às raízes e, por outros agentes, como temperatura e pH na zona radicular (Vessey & Luit, 1999). Além dos fatores ambientais, deve-se considerar a variação do efeito do N em função da estirpe do rizóbio e da espécie ou cultivar da leguminosa (Gibson & Harper, 1985).

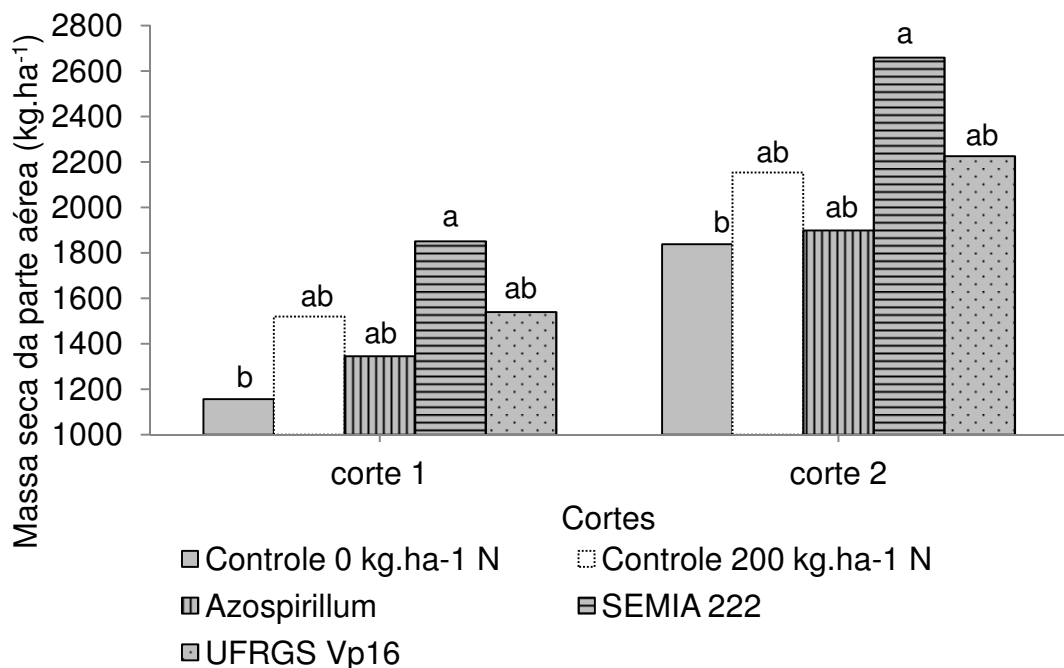


Figura 4.4 Massa seca da parte aérea em dois cortes de trevo branco inoculado com bactérias diazotróficas e com aplicação de duas doses de nitrogênio no ano de 2011. Médias seguidas de letras iguais em cada corte não diferem entre si (Tukey, $P < 0,05$). ns = não significativo.

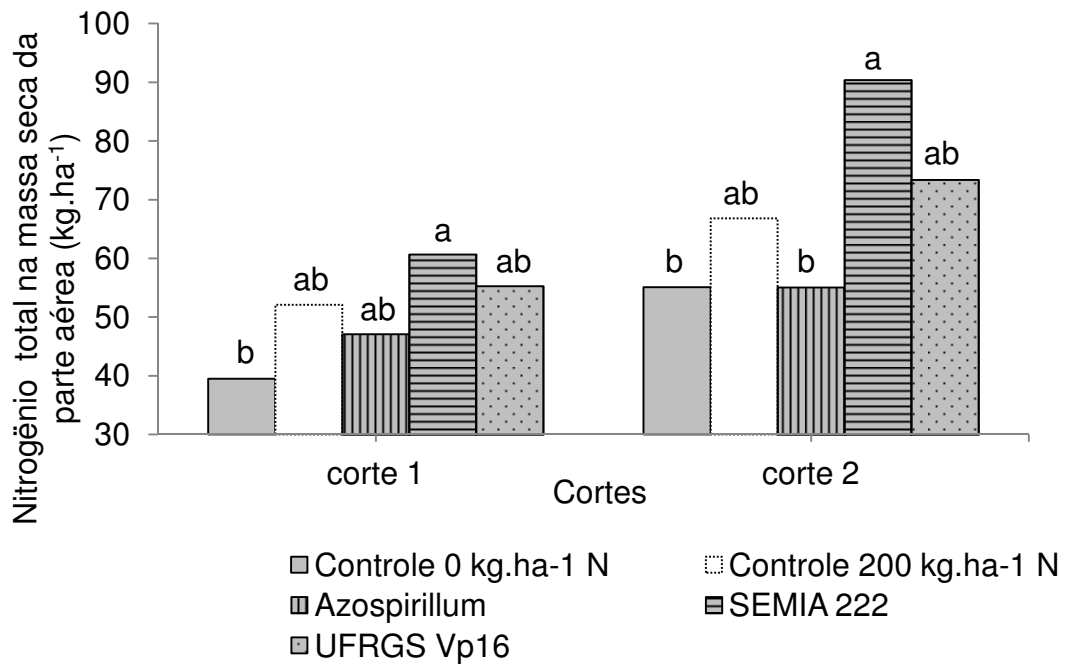


Figura 4.5 Nitrogênio total na massa seca da parte aérea em dois cortes de trevo branco inoculado com bactérias diazotróficas e com aplicação de duas doses de nitrogênio no ano de 2011. Médias seguidas de letras iguais em cada corte não diferem entre si (Tukey, $P < 0,05$). ns = não significativo.

Os resultados obtidos no tratamento com a inoculação da mistura dos três isolados de *Azospirillum* em trevo branco foram semelhantes aos obtidos no tratamento controle sem inoculação (Tabelas 4.3 e 4.4). A inoculação dos rizóbios SEMIA 222 e UFRGS Vp16 nas parcelas com trevo branco determinou maior crescimento das plantas pela FBN em relação ao tratamento com a inoculação dos isolados de *Azospirillum*.

Tabela 4.6 Produção de massa seca da parte aérea e nitrogênio total na massa seca da parte aérea em plantas de azevém, em cultivo exclusivo e consorciado com trevo branco em dois anos de cultivo, inoculadas com bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio.

		Ano 2010				
Nitrogênio (kg.ha ⁻¹)	Cultivo	Controle	<i>Azospirillum</i>	SEMIA 222	UFRGS Vp16	CV (%)
		Massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹)				
50	Exclusivo	2710,4 ns	3035,9 ns	2673,1 ns	2830,7 ns	14,3
	ConSORCIADO	3069,0	3000,6	2946,7	2922,7	
100	Exclusivo	2977,8 ns	3424,8 ns	3127,5 ns	3145,5 ns	
	ConSORCIADO	2979,4	2916,8	2986,0	2976,7	
Nitrogênio total na massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹)						
50	Exclusivo	68,2 ns	64,7 ns	62,0 ns	63,2 ns	15,9
	ConSORCIADO	54,4	61,0	56,6	56,8	
100	Exclusivo	68,4 ns	68,2 ns	69,4 ns	71,8 ns	
	ConSORCIADO	62,2	61,5	74,4	65,1	
Ano 2011						
Massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹)						
50	Exclusivo	3306,2 ns	3555,1 ns	3290,7 ns	3488,1 ns	20,3
	ConSORCIADO	3794,4	3621,9	3650,9	4091,0	
100	Exclusivo	3785,9 ns	3760,6 ns	4004,7 ns	3910,7 ns	
	ConSORCIADO	3935,6	4091,4	3982,9	4235,2	
Nitrogênio total na massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹)						
50	Exclusivo	106,7 ns	122,4 ns	108,6 ns	111,0 ns	12,5
	ConSORCIADO	121,7	126,3	135,0	128,1	
100	Exclusivo	143,4 ns	143,1 ns	146,7 ns	153,6 ns	
	ConSORCIADO	152,9	152,3	168,7	153,0	

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, P<0,05). ns = não significativo.

A produção de MSPA e o N total na MSPA do azevém consorciado não apresentaram diferenças para os tratamentos com cultivo de azevém exclusivo nos dois anos de cultivo e nas duas doses de N (Tabela 4.6). O que pode explicar este desempenho similar do azevém consorciado é a presença

das plantas de trevo branco nestas parcelas, o que provavelmente pode ter estimulado o crescimento do azevém pela transferência de N entre as plantas. Trabalhos mostram que as leguminosas suprem sua demanda de N pela fixação simbiótica com rizóbios e podem transferir parte deste elemento às gramíneas durante seu crescimento (Høgh-Jensen & Schjoerring, 2000; Rasmussen et al., 2007). Boller & Nösberger (1987) observaram que cerca de 80% do N absorvido pelo azevém era proveniente do N fixado pelo trevo branco enquanto Whitehead (1995) cita valores entre 0-75% do N fixado por leguminosas forrageiras é transferido para gramíneas em consórcio. A decomposição de material morto, incluindo raízes, estolões e folhas, assim como a rizodeposição de compostos nitrogenadas pelas raízes das plantas de trevo provavelmente favoreceram as plantas de azevém no cultivo consorciado, o que permitiu que equivalassem seu crescimento ao cultivo de azevém em cultivo exclusivo.

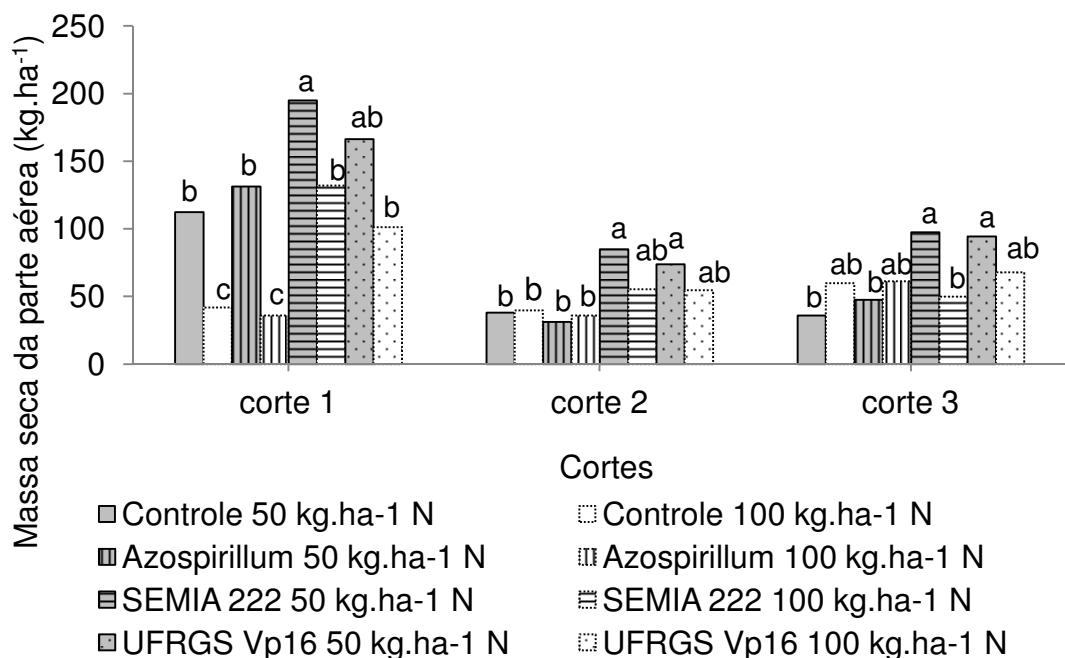


Figura 4.6 Produção de massa seca da parte aérea em três cortes de trevo branco consorciado com azevém inoculado com bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio na safra 2011. Médias seguidas de letras iguais em cada corte não diferem entre si (Tukey, $P < 0,05$). ns = não significativo.

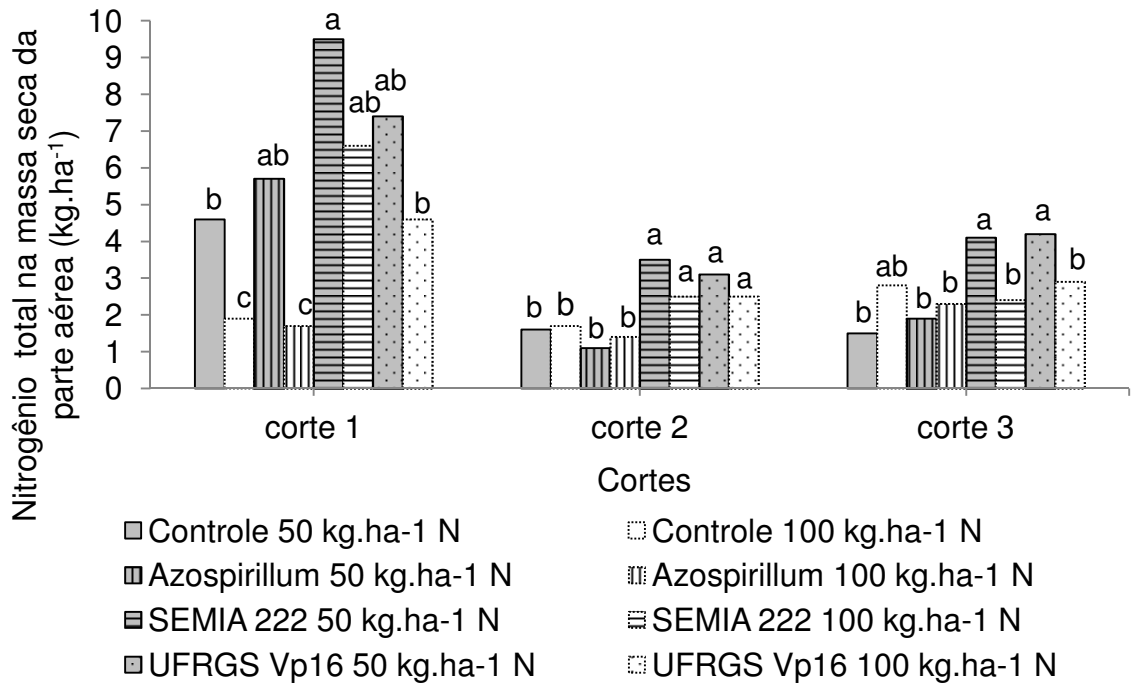


Figura 4.7 Nitrogênio na massa seca da parte aérea em três cortes de trevo branco consorciado com azevém inoculado com bactérias diazotróficas e aplicação de duas doses de nitrogênio na safra 2011. Médias seguidas de letras iguais em cada corte não diferem entre si (Tukey, $P < 0,05$). ns = não significativo.

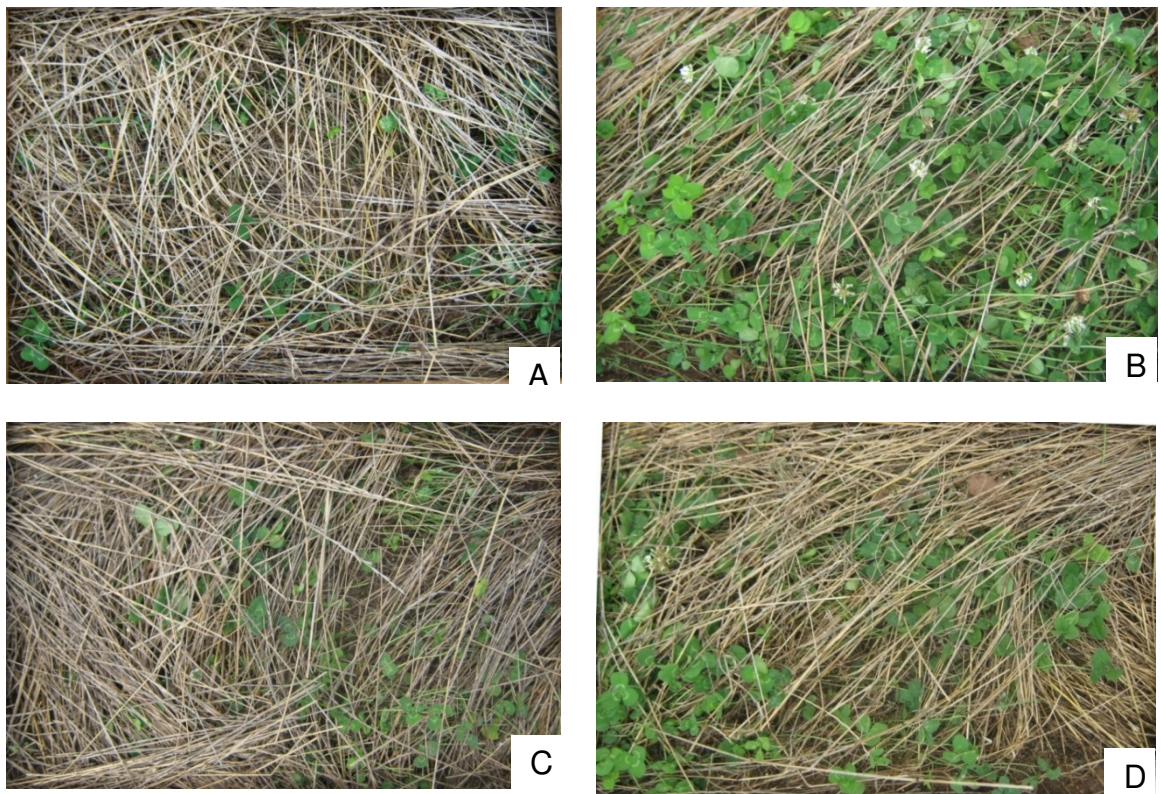


Figura 4.8 Cobertura do solo com cultivo de trevo branco em consórcio com azevém. A) tratamento controle sem inoculação com 50 kg.ha⁻¹ de N. B) inoculação da estirpe SEMIA 222 com 50 kg.ha⁻¹ de N; C)

inoculação da mistura dos isolados de *Azospirillum* (UFRGS LG1-R, UFRGS EL-S e UFRGS M-S) com 50 kg.ha⁻¹ de N; D) inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 com 50 kg.ha⁻¹ de N. Imagens obtidas no fim do experimento, antes do último corte da parte aérea das plantas.

Na comparação entre o cultivo de azevém exclusivo com o cultivo de azevém consorciado com o trevo branco, observa-se um aumento na produção total de MSPA dos dois anos de experimento no cultivo consorciado em relação ao cultivo exclusivo de azevém com a inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 e da estirpe SEMIA 222 com 50 kg.ha⁻¹ de N (Figura 4.9). Com 100 kg.ha⁻¹ de N, não foram observado diferenças na produção de MSPA total entre os dois cultivos. Resultados semelhantes foram obtidos para N total da MSPA, com maior produção no cultivo consorciado em relação ao cultivo exclusivo de azevém com a inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 e da estirpe SEMIA 222 com 50 kg.ha⁻¹ de N (Figura 4.10). Já com 100 kg.ha⁻¹ de N a inoculação da estirpe SEMIA 222 proporcionou maior valor de N total na MSPA no cultivo consorciado em relação ao cultivo exclusivo de azevém. Como não houve diferenças na produção de MSPA e N total na MSPA quando comparamos o cultivo de azevém exclusivo com o azevém consorciado (Tabela 4.6), atribuímos estas diferenças à importante contribuição do trevo branco no cultivo consorciado.

Estes resultados mostram a importância da inoculação de isolados bacterianos eficientes na promoção de crescimento de gramíneas e leguminosas forrageiras em cultivo consorciado. Em outros experimentos, Kostov & Lynch (1998) obtiveram aumento de 21% no rendimento de massa seca e de 24% na quantidade de N total em um cultivo consorciado de cornichão (*Lotus corniculatus*) e azevém com a inoculação de uma mistura contendo um isolado de *Rhizobium lotus* e um isolado de *Azospirillum brasilense*. Hardarson et al. (1988) argumentam que a presença de gramíneas em cultivo consorciado com leguminosas estimula a FBN, pois diminui a disponibilidade de N no solo, estimulando a leguminosa a fixar mais N.

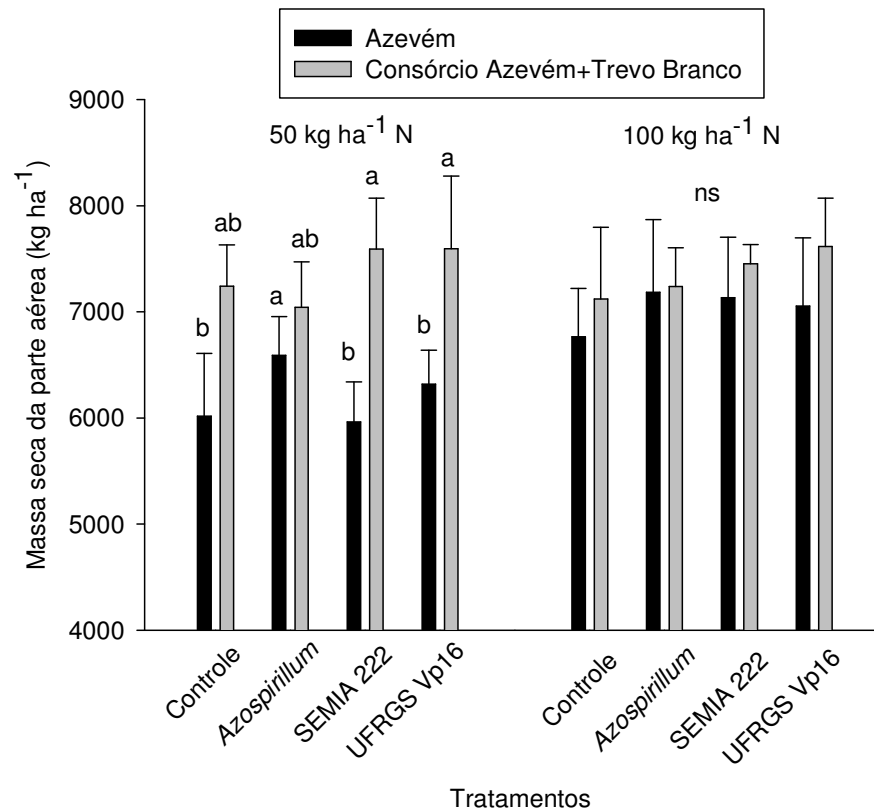


Figura 4.9 Massa seca da parte aérea de azevém em cultivo exclusivo e em consórcio com trevo branco inoculados com bactérias diazotróficas e com adição de duas doses de N. Médias seguidas de letra igual em cada dose de nitrogênio não diferem entre si (Tukey<0,05). ns = não significativo.

A inoculação com rizóbios se mostrou indispensável para aumentar a FBN e o crescimento das plantas de trevo branco, e estes benefícios se estenderam ao azevém cultivado em consórcio. Resultados semelhantes são demonstrados em vários trabalhos com inoculação de leguminosas e gramíneas em cultivo consorciado, como por exemplo, feijão fava (*Vicia faba*) e trigo (Yan-bo et al., 2006), leucena (*Leucaena leucocephala*) e sesbania (*Sesbania sesban*) com gramíneas anuais (cevada, milho, capim Rhodes, azevém e capim sudão) (Abbas et al., 2001), *Coastcross* (*Cynodon dactylon* L. Pers.) sobressemeado com trevo branco (Olivo et al., 2010) e cevada com trevo branco ou ervilha (Pappa et al., 2012).

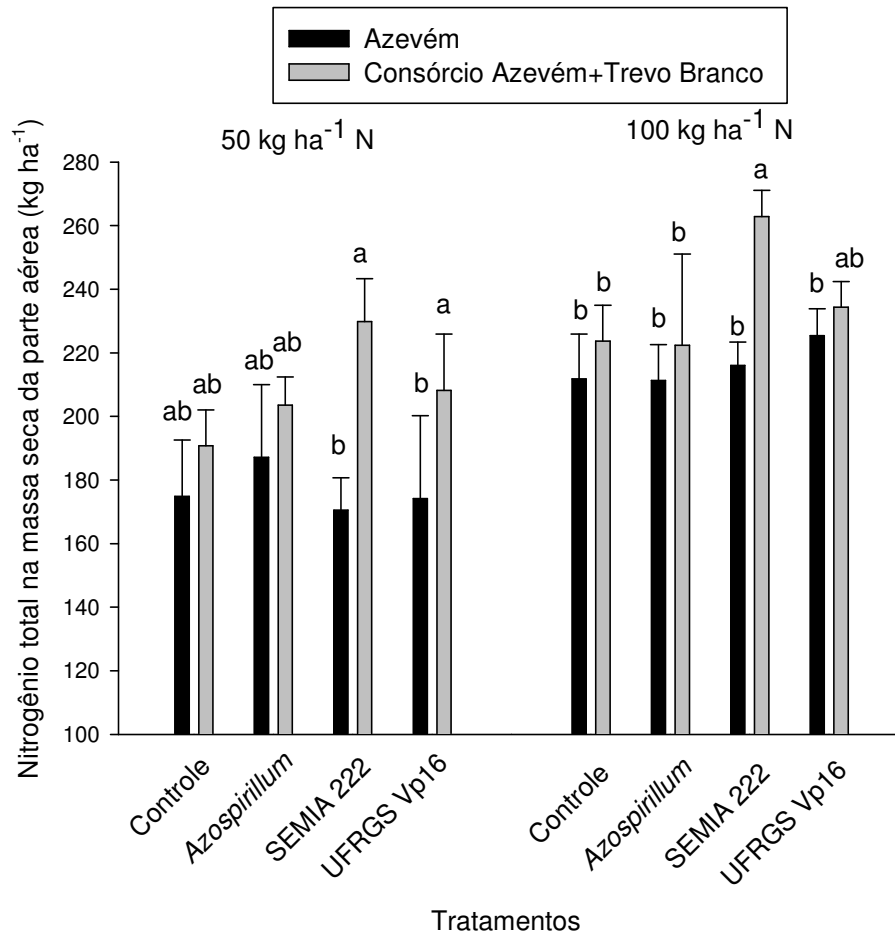


Figura 4.10 Nitrogênio total na massa seca da parte e parte aérea de azevém em cultivo exclusivo e em consórcio com trevo branco inoculados com bactérias diazotróficas em duas doses de N. Médias seguidas de letra igual em cada dose de nitrogênio não diferem entre si (Tukey<math>P < 0,05</math>). ns = não significativo.

Deve-se buscar isolados que tenham efeito de promoção de crescimento em um maior número de plantas, aproveitando sua inoculação em plantas sob o cultivo consorciado ou em sucessão. Isto pode ser conseguido com a inoculação de rizóbios altamente eficientes na FBN em trevo branco, como o isolado UFRGS Vp16, mas que também proporcionam efeito de promoção de crescimento em azevém.

4.4 Conclusões

As bactérias diazotróficas inoculadas em plantas de azevém apresentam respostas variáveis em promoção de crescimento. A inoculação combinada de três isolados de *Azospirillum* (UFRGS EI-S UFRGS Lg1-R e

UFRGS M-S) aumenta o nitrogênio total na massa seca da parte aérea, com equivalência à inoculação dos rizóbios UFRGS Vp16 e da estirpe SEMIA 222.

A inoculação da estirpe SEMIA 222 e do rizóbio UFRGS Vp16 aumenta a nodulação e a produção de matéria seca da parte aérea de plantas de trevo branco, tanto em cultivo isolado quanto consorciado com azevém.

A inoculação da estirpe SEMIA 222 e do rizóbio UFRGS Vp16 eficientes na fixação biológica de N em trevo branco aumenta a produção de massa seca da parte aérea e de nitrogênio total da massa seca da parte aérea por área em cultivo consorciado com azevém em comparação ao cultivo de azevém exclusivo.

4.5 Referências Bibliográficas

ABBAS, M. et al. Intercropping of *Sesbania* (*Sesbania sesban*) and leucaena (*Leucaena leucocephala*) with five annual grasses under semi-arid conditions as affected by inoculation with specific rhizobia and associative diazotrophs. **Agronomie**, Paris, v. 21, n.6-7, p. 517-515, 2001.

ALIKHANI, H. A.; SALEH-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 287, p. 35-41, 2006.

ALVES, J. B. **Seleção de rizóbios para trevo branco**. 2005. 68 f. (Dissertação) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ALVES, J. B.; SÁ, E. L. S.; MUNIZ, A. L. Seleção de rizóbios para o *Trifolium repens* em condições de solo alagado. **Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n. 1, 39-45, 2012.

ALVIM, M. J.; BOTREL, M. A. Efeitos de doses de nitrogênio na produção de leite de vacas em pastagem de coast-cross. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 577-583, 2001.

ASSMANN, A. L. et al. Produção de gado de corte e acúmulo de matéria seca em sistema de integração lavoura-pecuária em presença e ausência de trevo branco e nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 37-44, 2004

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen Fixation Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 485-491, 2000.

BARCELLOS, A. O. et al. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 51-67, 2008.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 108, p. 77-136, 2010.

BISWAS, J. C. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, p. 880-886, 2000.

BOLLER, B. C.; NÖSBERGER, J. Symbiotically fixed nitrogen from field-grown white and red clover mixed with ryegrasses at low levels of ¹⁵N-fertilization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 104, p. 219-226, 1987.

BOUTON, J. H.; ALBRECHT, S. L.; ZUBERER, D. A. Screening and selection of pearl millet for root associated bacterial nitrogen fixation. **Field Crops Research**, North Carolina, v. 11, p. 131-139, 1985.

CAMPILLO, R.; URQUIAGA, S.; PINO, C.I.; MONTENEGRO, A. Estimación de CAMPILLO, R. et al. Estimación de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas forageras mediante la metodología del ¹⁵N. **Agricultura Técnica**, Santiago, v. 63, n. 2, p. 169-179, 2003.

CARLSSON, G.; HUSS-DANELL, K. Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 253, n. 2, p. 353-372, 2003.

CHEN, X. et al. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 2540-2548, 2005.

CHI, F. et al. 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, p. 7271-7278, 2005.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre, SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400p.

CORRE-HELLOU, G. et al. Effect of root depth penetration on soil nitrogen competitive interactions and dry matter production in pea-barley intercrops

given different soil nitrogen supplies. **Field Crops Research**, North Carolina, v. 103, p. 76-85, 2007.

COWLING, D. W. The effect of nitrogenous fertiliser on established white clover sward. **Journal of the British Grassland Society**, Aberystwyth, v. 16, p. 65-68, 1961.

CREUS, C. M. et al. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta**, Berlin, v. 221, p. 297-303, 2005.

CRUSH, J. R. Nitrogen fixation. In: BAKER, M. J.; WILLIAMS, V. M. (Ed.). **White clover**. Wallingford: CAB International, 1987. p. 185-201.

DAHLIN, A.S.; STENBERG, M. Transfer of N from red clover to perennial ryegrass in mixed stands under different cutting strategies. **European Journal of Agronomy**, Montpellier, v. 33, p. 149-156, 2010.

DAVIS, A.; EVANS, M. E. Effects of spring defoliation and fertilizer nitrogen on the growth of white clover in ryegrass/clover swards. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 45, p. 345-356, 1990.

DENISON, R. F.; KIERS, E. T. Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 237, p. 187-193, 2004.

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

DUTTA, S.; MISHRA, A. K.; DILEEP KUMAR, B. S. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 452-461, 2008.

ELGERSMA, A.; HASSINK, J. Effects of white clover (*Trifolium repens* L.) on plant and soil nitrogen and soil organic matter in mixtures with perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 197, p. 177-186, 1997.

ELTILIB, A. M.; LEDGARD, S. F. Production and N fixation by Grassland Kopu and Grassland Huia white clovers under different N regimes. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 31, p. 325-330, 1988.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro, 2006. 306 p.

EMBRAPA. **SisCob**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2003.

FUSTEC, J. et al. Nitrogen rhizodeposition of legumes: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 30, p. 57–66, 2010.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, n. 193-196, 1996.

GIBSON, A. H.; HARPER, J. E. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop Science**, Madison, v. 25, p. 497-501, 1985.

GOVINDARAJAN, M. et al. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 21-37, 2008.

GYLFADOTTIR, T.; HELGADOTTIR, A.; HØGH-JENSEN, H. Consequences of including adapted white clover in northern European grassland: transfer and deposition of nitrogen. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 297, p. 93-104, 2007.

HARDARSON, G.; DANSO, S. K. A.; ZAPATA, F. Dinitrogen fixation measurements in alfalfa-ryegrass swards using nitrogen-15 and influence of the reference crop. **Crop Science**, Madison, v. 28, p. 101-105, 1988.

HARRIS, W. Pasture as an ecosystem. In: LANGER, R. H. M. **Pastures: their ecology and management**. Auckland: Ed. Oxford University Press, 1990. p. 75-131.

HE, X. H.; CRITCHLEY, C.; BLEDSOE, C. Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). **Critical Reviews in Plant Science**, Abingdom, v. 22, p. 531-567, 2003.

HERTENBERGER, G.; WANEK, W. Evaluation of methods to measure differential N-15 labeling of soil and root N pools for studies of root exudation. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, New York, v. 18, p. 2415-2425, 2004.

HØGH-JENSEN, H.; SCHJOERRING, J. K. Below-ground nitrogen transfer between different grassland species: direct quantification by N¹⁵ leaf feeding compared with indirect dilution of soil N¹⁵. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 227, p. 171-183, 2000.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, North Carolina, v. 65, p. 197-209, 2000.

JHA, B. et al. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 45, p. 62-72, 2009.

KOSTOV, O.; LYNCH, J. M. Composted sawdust as a carrier for *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* and *Azospirillum* in crop inoculation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 14, p. 389-397, 1998.

LOWTHER, W. L.; KERR, G. A. White clover seed inoculation and coating in New Zealand. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, New Plymouth, v. 73, p. 93-102, 2011.

MANTELIN, S.; TOURAINE, 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.

MISHRA, R. P. N. et al. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 383-389, 2006.

MONK, J. et al. Isolation and identification of plant growth-promoting bacteria associated with tall fescue. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, New Plymouth, v. 71, p. 211-216, 2009.

MOYER-HENRY, K. A. et al. Nitrogen transfer between plants: a N¹⁵ natural abundance study with crop and weed species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 282, p. 7–20, 2006.

OLIVO, C. J. et al. Produção de forragem e carga animal de pastagens de *Coastcross* sobressemeadas com forrageiras de inverno. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 1, p. 68-73, 2010.

OSÓRIO FILHO, B. D. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. 2009. 113 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PAPPA, V. A. et al. Legumes intercropped with spring barley contribute to increased biomass production and carry-over effects. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 150, p. 584-594, 2012.

PAYNEL, F. et al. A study of N¹⁵ transfer between legumes and grasses. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 28, p. 281–290, 2008.

PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, n. 1-2, p. 3-28, 1995.

PRIGENT-COMBARET, C. et al. Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 65, p. 202-219, 2008.

RASMUSSEN, J. et al. *In situ* carbon and nitrogen dynamics in ryegrass-clover mixtures: transfers, deposition and leaching. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39 p. 804–815, 2007.

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

RÖESCH, L. F. W. et al. Screening of diazotrophic bacteria *Azopirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 23, p. 1377-1383, 2007.

SCHTROSCHEIN, M. **Seleção de rizóbios e efeito do nitrogênio na simbiose com alfafa e cornichão**. 2011. 140 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7., 2009, Reno. [**Proceedings...**] Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SKONIESKI, F. R. et al. Composição botânica e estrutural e valor nutricional de pastagens de azevém consorciadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 3, p. 550-556, 2011.

SURIYAGODA, L. D. B. et al. Above-and below-ground interactions of grass and pasture legume species when grown together under drought and low phosphorus availability. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 348, p. 281–297, 2011.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174 p.

TOMM, G.O.; VANKESSEL, C.; SLINKARD, A.E. Bidirectional transfer of nitrogen between alfalfa and bromegrass – short and long-term evidence. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 164, p. 77–86, 1994.

TRAN VAN, V. et al. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 218, p. 273-284, 2000.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; HORTON, T.R. Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. **The Journal of Ecology**, Oxford, v. 97, p. 1139–1150, 2009.

VESSEY, J.K; LUIT, B. The nitrate-tolerant symbiosis of *Glycine max* (L.) Merr, nts382 and *Bradyrhizobium japonicum* is also tolerant of ammonium. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 77, p. 1432-1438, 1999.

WHIPPS, J. M. Microbial Interations and biocontrol in the rizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 487-511, 2001.

WHITEHEAD, D. C. **Grassland nitrogen**. Wallingford: CAB International, 1995. 397 p.

WICHERN, F. et al. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: methods, estimates and future prospects. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 30-48, 2008.

YAN-BO, X.; LONG, L. E.; FU-SUO, Z. The enhancement of growth and nutrients uptake by crops with inoculating rhizobium strain NM353 in wheat and faba bean intercropping system. **Plant Nutrition and Fertilizer Science**, Beijing, v. 12, n. 1, p. 89-96, 2006.

YANNI, Y. G. et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 845-870, 2001.

5 CAPÍTULO IV - PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MILHO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM SUCESSÃO AO AZEVÉM E TREVO BRANCO EM CULTIVO EXCLUSIVO E CONSORCIADO

5.1 Introdução

O nitrogênio (N) é o nutriente absorvido do solo em maior quantidade pelas plantas e, também o elemento que causa maiores efeitos no aumento de produção dos cultivos de milho (Ohland et al., 2005). Infelizmente, menos de 50% do N aplicado via fertilizante é usado pelas plantas devido à ação de processos como a lixiviação, volatilização de amônia, desnitrificação, erosão e imobilização microbiana (Halvorson et al., 2002). O resultado desta baixa eficiência é a contaminação do solo, das águas sub-superficiais e do ar, levando a danos na saúde e comprometendo a sustentabilidade agrícola (Tilman, 1998; Adesmye & Kloepper 2009). Além disso, o uso de N via fertilizantes representa 75% dos custos da adubação do milho, o que corresponde a cerca de 40% dos custos totais de produção da cultura (Machado et al., 2001).

Em contrapartida ao aumento da produção de milho pelo uso de maiores doses de nitrogênio mineral, a utilização de plantas de cobertura durante o inverno, inclusive com uso forrageiro, é uma alternativa para fornecimento de N ao milho cultivado em sucessão (Souza et al., 1997; Assmann et al., 2003; Carvalho et al., 2004). Estas culturas melhoram propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Lal, 1986; Giacomini et al., 2003), principalmente pela sua relação direta com o aumento do material orgânico rico em N adicionado ao solo, especialmente quando plantas leguminosas são cultivadas nestas áreas (Diekow et al., 2005). O resultado

da melhoria das propriedades do solo é o aumento no rendimento de grãos do milho em sucessão a culturas leguminosas de inverno (Ceretta et al., 1994; Assmann et al., 2003).

Uma segunda alternativa para um melhor fornecimento de N para o cultivo de milho é via FBN por bactérias associativas (García de Salamone et al., 1996) ou o aumento de sua absorção pela planta (Hungria et al., 2010). Diversas bactérias promotoras de crescimento podem aumentar significativamente o crescimento e a produção de grãos de diversos cereais quando estas são usadas como inoculantes (James & Olivares, 1997; Kennedy et al., 2004). Estas bactérias podem promover o crescimento pela combinação de vários mecanismos como FBN (Iniguez et al., 2004; Montañez et al., 2009), produção de auxinas, citocininas, giberelinas e inibição de etileno (Arshad & Frankenberger, 1992), antagonismo contra fitopatógenos pela produção de sideróforos (Scher & Baker, 1982), competição por nutrientes ou por indução de resistência sistêmica adquirida, ou por aumentar a disponibilidade de minerais como fósforo (Sessitsch et al., 2002; Sturz et al., 2000).

Em plantas de milho a inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum* como promotoras do crescimento de plantas de milho é provavelmente a mais bem estudada e vários trabalhos mostram resultados positivos (Fallik et al., 1988; Chritansen-Weniger & Vanderleyden, 1994; Fallik e Okon, 1996; Jacoud et al., 1999; Joe et al., 2012). No Brasil, o isolamento e seleção de estirpes de *A. brasilense* eficientes em promover o crescimento de milho por Hungria et al., (2010), permitiu o registro e comercialização do primeiro produto inoculante para esta cultura.

Além das bactérias do gênero *Azospirillum*, nos últimos anos, tem havido grande interesse em se estudar e utilizar os próprios rizóbios isolados de nódulos de leguminosas como promotores de crescimento em inúmeras gramíneas. Resultados positivos na promoção de crescimento com a inoculação de rizóbios já foram obtidos em arroz (Yanni et al., 2001; Osório Filho, 2009; Bhattacharjee et al., 2012). Em plantas de milho, poucos trabalhos têm sido realizados estudando os efeitos da inoculação com rizóbios no aumento do crescimento das plantas (Chabot et al., 1996; Gutierrez-Zamora & Romero, 2001, Bécquer et al., 2011).

O uso de rizóbios, já selecionados pela eficiência na simbiose em leguminosas apresenta uma grande vantagem em relação às bactérias não simbiotes uma vez que o aumento de sua população no solo poderá beneficiar tanto as plantas leguminosas como as gramíneas cultivadas durante o inverno, e cereais, como o milho, cultivados em sucessão. O exemplo mais emblemático dessa situação ocorre no Egito, onde os benefícios do cultivo do arroz em sucessão ao *Trifolium alexandrinum* são conhecidos pela população local há mais de sete séculos (Yanni et al., 1997) substituindo 25 a 33% da dose recomendada de N para o arroz em sucessão. Experimentos a campo demonstram que a inoculação dos rizóbios que nodulam *Trifolium alexandrinum* aumentam o rendimento de arroz em média 3,8 t ha⁻¹ (Yanni et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi estudar a eficiência da inoculação de rizóbios simbiotes em leguminosas e bactérias diazotróficas associativas na promoção de crescimento de milho em sucessão aos cultivos de inverno com azevém, trevo branco e o consórcio dos dois cultivos.

5.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido à campo, em área da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizada no município de Eldorado do Sul, região eco-climática da Depressão Central do RS. O clima, de acordo com a classificação de Köppen, é subtropical úmido com verão quente, do tipo fundamental Cfa, e o solo classificado como Argissolo Vermelho Distrófico típico (EMBRAPA, 2006). Na implantação, o solo apresentou as seguintes características (0-20 cm de profundidade): pH H₂O 5,6, 280 g kg⁻¹ de argila, 24 g kg⁻¹ de matéria orgânica, 12,5 mg dm⁻³ de fósforo, 76 mg dm⁻³ de potássio, 2,6 cmol_c dm⁻³ de cálcio, 1,1 cmol_c dm⁻³ de magnésio e 0,5 cmol_c dm⁻³ de alumínio.

O experimento foi implantado em 2010 e conduzido por dois anos, nas safras 2010/2011 e 2011/2012. No inverno foram cultivados trevo branco (*Trifolium repens*), cultivar Zapicán Estanzuela, e azevém (*Lolium multiflorum*), cultivar comum, em cultivo exclusivo e consorciado. Entre o cultivo de inverno de 2010 e após o cultivo de inverno de 2011, durante o verão, foi cultivado

milho. Tanto os cultivos de inverno quanto de milho no verão foram combinados com dois tratamentos com doses de N, uma dose correspondente à dose completa de N e outra correspondente a 50% da dose completa, assim como três tratamentos de inoculação com rizóbios simbiotes em leguminosas e bactérias diazotróficas associativas e um tratamento controle, sem inoculação. Dessa forma, o experimento foi arranjado em um fatorial 3x2x4, ou seja, cultivo de milho em sucessão após três cultivos com plantas de inverno, duas doses de N, e três inoculantes mais o tratamento controle.

Os rizóbios inoculados nas plantas foram: UFRGS Vp16 (*Burkholderia* sp.), pertencente à Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS, que foi isolado de nódulo de trevo branco e selecionado pela sua alta eficiência de FBN (Alves, 2005; Alves et al., 2012); SEMIA 222 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*), estirpe recomendada para produção de inoculantes para *Trifolium repens*, obtida da Coleção de estirpes SEMIA da FEPAGRO-RS. Também foi inoculada a mistura de três isolados de *Azospirillum* brasilense, UFRGS EI-S UFRGS Lg1-R e UFRGS M-S, pertencente à Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS e que foram selecionados por sua alta eficiência na FBN em milho cultivado no Rio Grande do Sul e produção de ácido-indolacético (AIA) *in vitro* (Röesch et. al., 2007). Além da inoculação dos isolados bacterianos, foram testadas duas doses de N: 140 kg.ha⁻¹, o que corresponde à dose completa de N para o milho, definida pela análise do laudo de análise do solo (Comissão..., 2004), e metade da dose (70 kg.ha⁻¹ de N).

O híbrido de milho Pioneer 30F53, selecionado em casa de vegetação como o mais responsivo às culturas bacterianas estudadas (Capítulo II), foi semeado no mês de dezembro tanto na safra 2010/2011 quanto na safra 2011/2012. A semeadura foi realizada após dessecação das culturas de inverno com 1,5 L de glifosato. Nas parcelas com trevo branco foi feita uma re-aplicação de 1,5 L de glifosato 15 dias após a primeira aplicação. Antes da semeadura, as sementes de milho foram tratadas com um produto inseticida comercial a base de imidacloprido (45 g.ha⁻¹) e tiodicarbe (135 g.ha⁻¹) em dose correspondente à 150 mL/60.000 sementes. O milho foi semeado em sistema de semeadura direta, com auxílio de semeadora manual (saraquá). Foram semeadas cinco linhas de milho espaçadas 0,6 m nas entre-linhas, para uma população final de 65.000 plantas ha⁻¹.

A adubação na semeadura foi definida com base na análise do solo (Comissão..., 2004). Foram aplicados na linha de semeadura 15, 90 e 45 kg.ha⁻¹, respectivamente de N, P₂O₅ e K₂O, usando 300 kg.ha⁻¹ de adubo formulado (5-30-15), além de aplicado manualmente na superfície das parcelas 55 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato triplo (41% P₂O₅) e 25 kg.ha⁻¹ de K₂O na forma de cloreto de potássio (60% K₂O). O ajuste da densidade de plantas foi realizado no estágio V₂₋₃, aos 14 dias após a emergência, pelo desbaste manual.

Nos tratamentos com dose completa de N (140 kg.ha⁻¹), além dos 15 kg.ha⁻¹ de N via adubo formulado, foi aplicada ureia (45% de N) à lanço, manualmente na superfície das parcelas, correspondendo à 15 kg.ha⁻¹ de N após a semeadura e à 110 kg.ha⁻¹ de N em cobertura quando as plantas estavam no estágio V₄₋₅. Nos tratamentos com metade da dose de N (70 kg.ha⁻¹), foram aplicados 55 kg.ha⁻¹ de N em cobertura quando as plantas estavam no estágio V₄₋₅.

Nos dois anos de experimento o controle de plantas daninhas foi efetuado em pós-emergência, quando as plantas de milho estavam no estágio V₃, utilizando-se a mistura dos herbicidas simazina e atrazina, nas doses de 1,0 kg.ha⁻¹ de cada um dos produtos, e nicosulfuron, na dose de 32 g.ha⁻¹. A irrigação foi realizada por aspersão em períodos de déficit hídrico.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições, tendo as parcelas dimensões de 4,0 m de comprimento e 3,0 m de largura.

Para a produção do inóculo bacteriano, os rizóbios UFRGS Vp16 e SEMIA 222 foram inoculados em erlenmeyers de 250 mL com meio Levedura-Manitol líquido (LM) e os isolados de *Azospirillum* inoculados em erlenmeyers de 250 mL com meio Dygs líquido e colocadas em incubador orbital a 28°C, com agitação de 120 rpm por seis dias. Os caldos das bactérias foram misturados em água esterilizada e aplicados manualmente com regador sobre a área total da parcela logo após a semeadura. Para os tratamentos com os isolados UFRGS Vp16 e SEMIA 222 foram misturados 5 mL de caldo com 8 x 10⁸ células mL⁻¹ em 8 L de água, obtendo uma suspensão de 5 x 10⁵ células mL⁻¹ de água, sendo que 3,3 x 10⁸ células foram aplicados por m⁻² de parcela. Para os tratamentos que receberam a mistura dos três isolados de

Azospirillum, 5 mL de caldo com $7,5 \times 10^8$ células mL^{-1} de cada isolado foram misturados em 8 L de água, obtendo uma suspensão de $1,4 \times 10^6$ células mL^{-1} de água, sendo que 9×10^8 células foram aplicados por m^2 de parcela. A contagem da concentração de células foi realizada em câmara de Neubauer.

Foram avaliados os teores relativos de clorofila na folha pela leitura dos valores de Índice de clorofila Falker (ICF) nos estádios V_{6-7} (seis a sete folhas expandidas) e R_1 , embonecamento e polinização, de acordo com a escala de Ritchie et al. (1993). Esta avaliação foi realizada em dez plantas escolhidas aleatoriamente dentro das três linhas centrais da parcela, excluindo-se 0,5 m das extremidades. Para as leituras foi usado clorofilômetro marca ClorofiLOG, modelo CFL 1030, operado conforme as instruções do fabricante (FALKER Automação Agrícola, 2008). Este aparelho utiliza fotodiodos emissores em três comprimentos de onda: dois emitem dentro da banda do vermelho, próximos aos picos de cada tipo de clorofila (635 e 660 nm, respectivamente para clorofila A e B), e um terceiro comprimento de onda na banda do infravermelho próximo (880 nm). A partir desses dados, o aparelho fornece os valores ICF proporcionais à absorbância das clorofilas. No estádio V_{6-7} os valores de ICF foram determinados na última lâmina foliar totalmente expandida (a primeira com lígula visível a partir do ápice da planta) e no estádio R_1 foram determinados na folha oposta e abaixo da espiga. Em cada folha foram feitas três leituras, no terço médio da lâmina, para se obter um valor médio.

A altura das plantas foi determinada nos estádios V_8 (oito folhas expandidas) e R_1 nas mesmas plantas escolhidas para a leitura dos valores ICF. No estádio V_8 a altura foi determinada a partir da medição do comprimento da base da planta ao ápice da última folha totalmente expandida. Já em R_1 a altura foi determinada com a medição do comprimento da base da planta ao ápice do pendão.

Foram determinadas a produção de matéria seca da parte aérea a partir do corte das dez plantas anteriormente identificadas no estádio R_6 , caracterizado pela maturidade fisiológica. Após secagem em estufa, à temperatura de 65°C , as amostras foram pesadas e trituradas para determinação da massa seca da parte aérea. O rendimento de grãos foi obtido com a colheita manual das espigas das plantas dentro das três linhas centrais

da parcela, excluindo-se 0,5 m das extremidades, e corrigido para 130 g.kg⁻¹ de umidade. A partir dos grãos colhidos, determinou-se a massa de 200 grãos e o teor de N dos grãos de acordo com Tedesco et al., (1995).

Foi determinado também o Índice de Eficiência Relativa (IER) na produção de massa seca da parte aérea e do rendimento de grãos do milho em sucessão aos três cultivos de inverno. Para tal utilizou-se a equação abaixo, onde $TRAT_I$ corresponde ao valor da variável dos tratamentos inoculados com adição de N equivalente a 100% da dose completa de N, $CONT_{N/2}$ corresponde ao valor da variável dos tratamentos controle com adição de N equivalente a 50% da dose completa de N e $CONT_N$ corresponde ao valor da variável dos tratamentos controle com adição de N equivalente a 100% da dose completa de N.

$$IER (\%) = \left(\frac{(TRAT_I - CONT_{N/2}) - (CONT_N - CONT_{N/2})}{CONT_N - CONT_{N/2}} \right) X 100$$

Os resultados foram submetidos à análise da variância pelo programa estatístico ASSYSTAT (Silva et al., 2009), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

5.3 Resultados e discussão

Em relação ao tratamento controle com 70 kg.ha⁻¹ de N, a inoculação combinada dos três isolados de *Azospirillum* promoveu o crescimento das plantas de milho. Isto pode ser observado no aumento da produção de MSPA na sucessão ao azevém com o uso de 70 kg.ha⁻¹ de N na safra de 2011/2012, em sucessão ao trevo branco na safra 2011/2012 com 140 kg.ha⁻¹ de N (Tabela 5.1) e no aumento da altura das plantas em V₈, tanto na sucessão ao trevo branco com o uso de 140 kg.ha⁻¹ de N na safra 2010/2011, quanto na sucessão ao consórcio com o uso de 140 kg.ha⁻¹ de N nas duas safras. Além destes resultados, a inoculação dos isolados de *Azospirillum* aumentou os valores do índice de clorofila Falker (ICF) em R₁ em sucessão ao azevém e ao trevo branco na safra 2010/2011 com 70 kg.ha⁻¹ de N, o teor de nitrogênio no grão em sucessão ao consórcio com 70 kg.ha⁻¹ de N na safra

2010/2011, e o rendimento de grãos de milho em sucessão ao consórcio com 70 kg.ha⁻¹ de N na safra 2010/2011. O aumento no crescimento das plantas de milho também pode ser observado nos valores de Índice de Eficiência Relativa (IER) (Tabela 5.2). A inoculação dos isolados de *Azospirillum* apresentou o maior IER no rendimento de grãos (224,1%), sendo obtido na safra 2011/2012 em sucessão ao consórcio, e apresentou também o maior IER na produção de MSPA (82,6%), sendo obtido na safra 2010/2011, também em sucessão ao consórcio (Tabela 5.1).

A inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* para promoção de crescimento de milho apresenta resultados positivos em vários trabalhos (Fallik et al., 1988; Chritansen-Weniger & Vanderleyden, 1994; Fallik & Okon, 1996; Jacoud et al., 1999; Hungria et al., 2010; Joe et al., 2012). As três culturas de *Azospirillum* usadas neste experimento foram isoladas por Roesch et al., (2007) de raízes (UFRGS Lg1-R) e da rizosfera (UFRGS EI-S e UFRGS M-S) de plantas de milho coletadas no estado do Rio Grande do Sul. Estes isolados destacaram-se pela produção de ácido indol acético (AIA), um fitoregulador de crescimento vegetal do grupo das auxinas, e pela capacidade de FBN.

Em nosso trabalho, a promoção de crescimento das plantas de milho provavelmente deve-se a diferentes mecanismos de promoção de crescimento, como a produção de fitoreguladores de crescimento vegetal como as auxinas (Dobbelaere et al., 2003), ao aumento geral da absorção de macro e micronutrientes (Hungria et al., 2010), FBN (García de Salamone et al., 1996; James, 2000), produção de óxido nítrico (Creus et al., 2005) e atividade 1-aminociclopropano-1-decarboxilato desaminase (Prigent-Combaret et al., 2008).

Destaca-se neste estudo que no ano de 2010/2011, com 70 kg.ha⁻¹ de N e em sucessão ao consórcio, a inoculação dos isolados de *Azospirillum* estimulou o aumento do rendimento de grãos em comparação ao tratamento controle sem inoculação, o que equivale a um aumento de 14% ou 1.100 kg.ha⁻¹ de grãos. Porém, como no tratamento com a inoculação com os isolados de *Azospirillum*, que são capazes de FBN em gramíneas, não se observaram diferenças em relação aos tratamentos inoculados com os rizóbios SEMIA 222 e UFRGS Vp16, que não são fixadores de nitrogênio em não-leguminosas, pode-se inferir que tais resultados se devam a existência de outros

mecanismos de promoção de crescimento que não a FBN, tais como maior capacidade de absorção de nutrientes do solo (Hungria et al., 2010), produção de óxido nítrico (Creus et al., 2005), atividade de 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACC desaminase) (Prigent-Combaret et al., 2008) e, à produção de fitohormônios (Dobbelaere et al., 2003).

A inoculação do rizóbio UFRGS Vp16, em relação ao tratamento controle, também promoveu o crescimento das plantas de milho (Tabela 5.1). Isto pode ser observado no aumento da produção de MSPA em sucessão ao trevo branco na safra 2011/2012 com 140 kg.ha^{-1} de N e em sucessão ao consórcio na safra 2011/2012 nas duas doses de N. Quanto à altura das plantas em V_8 , a inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 apresentou efeito de promoção de crescimento na safra 2011/2012 com 140 kg.ha^{-1} de N em sucessão ao azevém, e em sucessão ao consórcio com o uso das duas doses de N na safra 2011/2012 e com 70 kg.ha^{-1} de N na safra 2010/2011. Quanto ao estado geral das plantas avaliado pelo ICF V_{5-6} , a inoculação das bactérias deste tratamento aumentou os valores nas plantas em sucessão ao consórcio nas duas doses de N na safra 2011/2012. A inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 em sucessão ao azevém com 70 kg.ha^{-1} de N na safra 2010/2011 e em sucessão ao trevo branco com 70 kg.ha^{-1} de N na safra 2010/2011 aumentou os valores de ICF R_1 . Já o rendimento de grãos de milho foi aumentado nas plantas em sucessão ao azevém com 70 kg.ha^{-1} de N na safra 2010/2011. Nas plantas inoculadas com o rizóbio UFRGS Vp16 também observaram-se valores de IER mais altos, como pode ser observado na safra de 2011/2012 para produção de MSPA (97,8%) e rendimento de grãos (62,2%) das plantas cultivadas em sucessão ao consórcio (Tabela 5.2).

Tabela 5.1 Produção de massa seca da parte aérea (MSPA) de milho inoculado com bactérias diazotróficas nas safras 2010/2011 e 2011/2012 e com 70 e 140 kg.ha⁻¹ de nitrogênio.

Nitrogênio (kg.ha ⁻¹)		--- 70 ---				--- 140 ---			
Safr	Cultivo Anterior	--- MSPA (Mg.ha ⁻¹) ---							
		Controle	<i>Azospirillum</i>	SEMIA 222	UFRGS Vp16	Controle	<i>Azospirillum</i>	SEMIA 222	UFRGS Vp16
2010/2011	Azevém	18,8 Aa	20,9 Aa	19,1 Ba	20,6 Aa	24,3 Aa	25,2 Aa	25,5 Aa	24,0 Aa
	Trevo Branco	16,9 Ba	17,9 Ba	16,9 Ca	17,9 Ba	18,3 Ca	18,6 Ba	18,8 Ba	19,0 Ba
	Consórcio	19,8 Aa	21,4 Aa	21,4 Aa	20,6 Aa	22,5 Ba	24,8 Aa	24,1 Aa	23,9 Aa
2011/2012	Azevém	17,3 Bb	19,2 Aa	17,9 Aab	18,9 Bab	22,3 Aa	22,1 Ba	23,4 Aa	23,0 Aa
	Trevo Branco	19,2 Aa	20,2 Aa	19,9 Aa	21,9 Aa	22,3 Ab	24,3 Aa	22,4 Aab	24,0 Aa
	Consórcio	18,8 ABb	20,5 Aab	19,7 Aab	21,5 Aa	21,5 Ab	21,8 Bb	21,9 Ab	24,3 Aa
CV = 8,4%									
--- Altura das plantas V ₈ (cm) ---									
2010/2011	Azevém	86,5 Aa	88,4 Aa	85,0 Aa	88,9 Aa	94,4 Aa	95,3 Aa	94,7 Aa	98,4 Aa
	Trevo Branco	56,0 Ba	55,1 Ba	52,9 Ba	57,1 Ba	53,9 Bb	58,1 Ba	55,9 Bab	55,8 Bab
	Consórcio	85,8 Ab	84,6 Ab	89,3 Aab	91,3 Aa	92,2 Ab	99,9 Aa	93,3 Ab	95,8 Ab
2011/2012	Azevém	88,4 Aa	83,9 Ba	93,6 Ba	96,3 Ba	104,1 Ab	105,8 Bab	104,3 ABb	108,3 Ba
	Trevo Branco	100,9 Aa	99,3 Aa	102,4 Aa	106,0 Aa	110,6 Aab	118,0 Aa	111,4 Ab	116,8 Aa
	Consórcio	98,4 Ab	99,7 Ab	95,6 ABb	104,9 Aa	109,4 Ab	117,9 Aa	102,3 Bb	119,6 Aa
CV = 8,4%									
--- Altura das plantas R ₁ (cm) ---									
2010/2011	Azevém	257,3 Aa	265,9 Aa	258,8 Aa	273,2 Aa	281,9 Aa	288,6 Aa	281,9 Aa	288,6 Aa
	Trevo Branco	233,5 Aa	237,4 Aa	227,4 Aa	238,6 Ba	240,4 Ba	246,4 Ba	235,4 Ba	243,4 Ba
	Consórcio	264,3 Aa	270,2 Aa	265,2 Aa	267,3 ABa	287,2 Aa	289,1 Aa	282,6 Aa	299,0 Aa
2011/2012	Azevém	271,7 Aa	252,7 Aa	268,9 Aa	271,2 Aa	294,8 Aa	301,6 Aa	302,1 Aa	293,2 Aa
	Trevo Branco	262,0 Aa	280,2 Aa	280,4 Aa	286,0 Aa	301,4 Aa	301,7 Aa	302,8 Aa	304,6 Aa
	Consórcio	268,5 Aa	278,0 Aa	274,6 Aa	272,3 Aa	290,0 Aa	297,9 Aa	297,9 Aa	290,5 Aa
CV = 14,5%									

Tabela 5.1. Continuação...

Nitrogênio (kg.ha ⁻¹)		--- 70 ---				--- 140 ---			
Safr	Cultivo Anterior	--- Índice de clorofila Falker em V ₅₋₆ ---							
		Controle	<i>Azospirillum</i>	SEMIA 222	UFRGS Vp16	Controle	<i>Azospirillum</i>	SEMIA 222	UFRGS Vp16
2010/ 2011	Azevém	45,0 ABa	48,2 Aa	46,0 Aa	48,0 ABa	49,9 Aa	50,4 Aa	51,0 Aa	49,2 Aa
	Trevo Branco	41,6 Ba	43,9 Ba	40,2 Ba	45,1 Ba	42,9 Ba	44,5 Ba	43,3 Ba	44,6 Ba
	Consórcio	46,0 Aa	49,9 Aa	46,8 Aa	49,6 Aa	49,0 Aa	50,1 Aa	49,6 Aa	50,5 Aa
2011/ 2012	Azevém	44,7 Aa	44,3 Ba	47,2 Aa	46,5 Ba	50,1 Aa	50,9 Aa	49,6 ABa	51,2 Ba
	Trevo Branco	47,7 Aa	48,3 Aa	48,2 Aa	51,0 Aa	55,1 Aa	53,2 Aa	53,2 Aa	54,2 ABa
	Consórcio	47,7 Ab	49,6 Aab	48,3 Ab	52,6 Aa	50,9 Ab	50,2 Ab	48,4 Bb	55,6 Aa
CV = 4,6%									
		--- Índice de clorofila Falker em R ₁ ---							
2010/ 2011	Azevém	44,7 Bb	55,6 Aa	43,6 Bb	50,3 Aa	53,0 ABa	55,6 Aa	52,2 ABa	52,0 Ba
	Trevo Branco	41,8 Bc	48,2 Ba	42,5 Bc	47,3 Ab	50,0 Ba	51,3 Ba	49,0 Ba	52,9 Ba
	Consórcio	49,7 Aa	53,7 Aa	52,1 Aa	50,9 Aa	56,7 Aba	56,0 Aa	56,3 Aa	57,2 Aa
2011/ 2012	Azevém	44,8 Aa	45,0 Aa	43,2 Aa	47,8 Aa	49,4 Aa	49,7 Aa	47,7 Aa	50,3 Aa
	Trevo Branco	45,1 Aa	47,6 Aa	46,0 Aa	45,0 Aa	50,3 Aa	49,7 Aa	46,0 Aa	48,3 Aa
	Consórcio	45,1 Aa	47,6 Aa	46,0 Aa	45,0 Aa	48,4 Aa	49,6 Aa	47,9 Aa	47,1 Aa
CV = 10,5%									
		--- Massa 200 grãos (g) ---							
2010/ 2011	Azevém	59,1 ns	62,6 ns	60,4 ns	64,4 ns	65,2 ns	68,5 ns	66,0 ns	65,7 ns
	Trevo Branco	49,8 ns	51,5	52,8	52,8	51,9 ns	63,3	58,3	59,2
	Consórcio	57,9 ns	56,1	51,3	52,3	62,2 ns	79,9	73,3	74,8
2011/ 2012	Azevém	54,2 ns	58,8	59,9	60,3	65,2 ns	69,2	66,0	65,7
	Trevo Branco	64,4 ns	65,4	67,9	67,4	72,6 ns	77,5	78,7	85,6
	Consórcio	63,8 ns	65,9	59,9	63,8	68,5 ns	67,1	68,3	67,6
CV = 12,1%									

Tabela 5.1. Continuação...

Nitrogênio (kg.ha ⁻¹)		--- 70 ---				--- 140 ---			
Safr	Cultivo Anterior	--- Teor de nitrogênio no grão (g.kg ⁻¹) ---							
		Controle	<i>Azospirillum</i>	SEMIA 222	UFRGS Vp16	Controle	<i>Azospirillum</i>	SEMIA 222	UFRGS Vp16
2010/ 2011	Azevém	13,8 Aa	13,3 Aa	13,9 Aa	13,6 Aa	14,8 Aa	14,0 Aa	14,0 Aa	14,5 ABa
	Trevo Branco	11,6 Ba	11,4 Ba	11,8 Ba	11,3 Ba	11,0 Ba	11,4 Ba	11,0 Ba	11,8 Ba
	Consórcio	13,9 Ab	14,8 Aa	13,9 Ab	14,9 Ab	12,5 ABa	13,8 Aa	13,0 ABa	12,5 ABa
2011/ 2012	Azevém	12,8 Aa	13,6 Aa	12,4 Aa	14,5 Aa	15,5 Aa	12,5 Aa	14,8 Aa	15,5 Aa
	Trevo Branco	13,1 Aa	14,1 Aa	13,1 Aa	14,3 Aa	14,8 Aa	15,3 Aa	14,5 Aa	15,0 Aa
	Consórcio	13,1 Aa	14,0 Aa	13,6 Aa	14,5 Aa	13,8 Aa	14,7 Aa	13,8 Aa	15,0 Aa
CV = 8,4%									
		--- Rendimento de grãos (Mg.ha ⁻¹) ---							
2010/ 2011	Azevém	7,9 Ab	8,5 Aab	8,2 Aab	9,0 Aa	9,9 Aa	9,5 Aa	9,4 Aa	9,9 Aa
	Trevo Branco	6,2 Ba	6,3 Ba	6,3 Ba	6,1 Ba	7,2 Ba	7,1 Ba	7,3 Ba	7,1 Ba
	Consórcio	7,6 Ab	8,7 Aa	8,0 Aab	8,1 Aab	9,0 Aa	9,9 Aa	9,4 Aa	9,6 Aa
2011/ 2012	Azevém	7,6 Ba	7,6 Ba	8,0 Ba	8,5 Ba	9,5 Ba	9,7 Aa	9,6 Ba	9,9 Ba
	Trevo Branco	9,4 Aa	10,0 Aa	9,7 Aa	9,9 Aa	11,3 Aa	11,1 Aa	11,2 Aa	11,5 Aa
	Consórcio	8,5 ABa	9,9 Aa	8,5 Ba	9,6 Aa	8,9 Ba	9,7 Aa	9,1 Ba	9,1 Ba
CV = 12,1%									

Médias de tratamentos seguidas de letra igual minúscula na linha em cada dose de nitrogênio e maiúscula na coluna para cada safra, não diferem entre si (Tukey, P<0,05). CV = coeficiente de variação.

Tabela 5.2 Índice de eficiência relativa (IER)* (%) da inoculação dos tratamentos com bactérias diazotróficas no crescimento da massa seca da parte aérea (MSPA) e rendimento de grãos de milho cultivado em sucessão à azevém, trevo branco e o consórcio dos dois cultivos nas safras 2010/2011 e 2011/2012.

Cultivo Anterior	Tratamentos	2010/2011		2011/2012	
		MSPA	Rendimento de grãos	MSPA	Rendimento de grãos
Azevém	<i>Azospirillum</i>	15,7	-18,6	15,9	11,7
	SEMIA 222	22,3	-24,1	22,3	4,6
	UFRGS Vp16	-5,6	3,1	13,8	19,3
Trevo branco	<i>Azospirillum</i>	21,6	-6,9	64,0	-10,8
	SEMIA 222	33,1	10,7	-28,1	-2,7
	UFRGS Vp16	44,5	-5,6	55,1	12,3
Consórcio	<i>Azospirillum</i>	82,6	65,8	10,5	224,1
	SEMIA 222	58,0	25,3	-59,4	58,0
	UFRGS Vp16	51,5	41,4	97,8	62,2

(*) Valores positivos de IER do tratamento inoculado referem-se ao aumento do valor da variável em relação aos tratamentos controle com metade da dose de N (70 kg ha^{-1} de N) e a dose completa de N (140 kg ha^{-1} de N). Valores negativos referem-se a menores valores da variável em relação aos tratamentos controle.

Para a cultura do milho, há poucos trabalhos com inoculação de bactérias do gênero *Burkholderia*, ao qual pertence o rizóbio UFRGS Vp16 (Riggs et al., 2001; Miyauchi et al., 2008), apesar de ser um gênero frequentemente isolado da rizosfera ou de tecidos internos de plantas de milho (Viallard et al., 1998; Balandreau et al., 2001; Caballero-Mellado et al., 2004; Perin et al., 2006; Arruda et al., 2013). Diferentemente das bactérias do gênero *Burkholderia* descrito nos trabalhos acima, o rizóbio UFRGS Vp16 foi isolado de nódulo de trevo branco e selecionado pela sua alta eficiência de FBN (Alves, 2005; Alves et al., 2012). Inoculação de rizóbios simbiotes fixadores de N em leguminosas tem sido realizada em vários cereais, principalmente arroz (Yanni et al., 2001; Singh et al., 2006), sendo poucos os trabalhos com inoculação em milho (Gutierrez-Zamora & Romero, 2001; Bécquer et al., 2011).

A promoção de crescimento pela inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 nas plantas de milho pode ser uma consequência da produção de auxinas, citocininas, giberelinas e inibição de etileno (Arshad & Frankenberger, 1992),

antagonismo contra fitopatógenos pela produção de sideróforos (Scher e Baker, 1982) e competição por nutrientes, ou indução de resistência sistêmica adquirida (Pieterse et al., 2001), ou aumento da disponibilidade de minerais como fósforo (Sessitsch et al., 2002; Sturz et al., 2000). Assim como ocorreu com a inoculação dos isolados de *Azospirillum*, a inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 também aumentou o rendimento de grãos em comparação ao tratamento controle sem inoculação no ano de 2010/2011 com 70 kg.ha⁻¹ de N, o que equivale a um aumento de 13,9% ou 1.100 kg.ha⁻¹ de grãos.

O cultivo de milho em sucessão ao trevo branco na safra 2010/2011 apresentou de modo geral, em comparação ao cultivo de milho em sucessão ao azevém e ao consórcio de azevém e trevo branco, menores valores para as variáveis testadas (Tabela 5.1). Estes resultados somente não foram observados para a massa de 200 grãos, porém, foram verificados tanto com a aplicação de 70 quanto 140 kg.ha⁻¹ de N, assim como para os tratamentos com inoculação das bactérias diazotróficas quanto ao tratamento controle nas duas doses de N. O menor crescimento das plantas de milho em sucessão ao trevo branco deveu-se, provavelmente, à competição por água, luz e nutrientes no período vegetativo das plantas de milho com as plantas de trevo branco remanescentes do inverno, e que não dessecaram completamente com a aplicação anterior de glifosato à semeadura do milho. O período de crescimento do milho que estende-se do estágio V₀ (emergência) até V₇ (sete folhas desenvolvidas) é considerado o mais crítico pela competição com outras plantas, e a redução do rendimento de grãos da cultura devido à competição estabelecida com as plantas daninhas pode variar de 12 até 100% (Kozłowski, 2002).

De modo contrário à safra 2010/2011, na safra de 2011/2012 observa-se de modo geral, maiores valores para as variáveis avaliadas neste experimento no cultivo de milho em sucessão ao trevo branco em relação ao milho cultivado em sucessão ao consórcio e, principalmente, em relação ao milho cultivado em sucessão ao azevém (Tabela 5.1). Estes resultados somente não foram verificados para altura das plantas em R₁ e teor de N nos grãos. No ano de 2011/2012 as plantas de trevo branco foram totalmente controladas antes da semeadura do milho, não havendo competição com as plantas de milho como aconteceu no ano de 2010/2011.

O maior crescimento das plantas de milho obtido em sucessão ao trevo branco no ano de 2011/2012 pode ser explicado pelo fornecimento de N das plantas de trevo branco, tanto por componentes nitrogenados rizodepositados pelas raízes e que enriqueceram o solo com N, quanto pelo N mineralizado por micro-organismos pela decomposição de material vegetal residual de trevo branco após a dessecação da área anterior à semeadura do milho (Hertenberger & Wanek 2004; Paynel et al., 2008; Wichern et al., 2008; Dahlin & Stenberg 2010; Fustec et al., 2010). Vários trabalhos mostram que o cultivo de milho pode ser favorecido pelo cultivo em sucessão às plantas leguminosas no inverno (Ceretta et al., 1994; Souza et al., 1997; Carvalho et al., 2004). Assmann (2003) verificou em trabalho conduzido no Paraná que a presença de trevo não influenciou o rendimento de grãos de milho quando cultivado em sucessão à leguminosa, porém as plantas de milho acumularam mais N-foliar que aquelas plantas de milho cultivadas em parcelas que não tinham trevo.

5.4 Conclusão

A inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 e da mistura de três isolados de *Azospirillum* sp., UFRGS EI-S UFRGS Lg1-R e UFRGS M-S, aumenta o crescimento das plantas de milho do híbrido 30F53 cultivadas em sucessão ao azevém, trevo branco e o consórcio de azevém e trevo branco.

5.5 Referências bibliográficas

ADESMOYE, A. O.; KLOEPPER, J.W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer use efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, n. 1, p. 1-12, 2009.

ALVES, J. B. **Seleção de rizóbios para trevo branco**. 2005. 68 f. (Dissertação) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ALVES, J. B.; SÁ, E. L. S.; MUNIZ, A. L. Seleção de rizóbios para o *Trifolium repens* em condições de solo alagado. **Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n. 1, 39-45, 2012.

ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to

improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 63, n. 15-22, 2013.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. JR. Microbial biosynthesis of ethylene and its influence on plant growth. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 12, p. 69-111, 1992.

ASSMANN, T. S. **Rendimento de milho em área de integração lavoura-pecuária sob o sistema de plantio direto, em presença e ausência de trevo branco, pastejo e nitrogênio**. 2011. 78p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

ASSMANN, T. S. et al. Rendimento de milho em área de integração lavoura-pecuária sob o sistema plantio direto, em presença e ausência de trevo branco, pastejo e nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 675-683, 2003.

BALANDREAU, J. et al. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 982-985, 2001.

BÉCQUER, C. J. et al. Selection of rhizobium strains, inoculated in corn (*Zea mays*, L.), in field conditions in cattle ecosystems of Sancti Spiritus, Cuba. **Cuban Journal of Agricultural Science**, La Habana, v. 45, n. 4, 2011.

BHATTACHARJEE, R. B. et al. Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 48, n. 173-182, 2012.

CABALLERO-MELLADO, J. et al. *Burkholderia unamae* sp. nov. and N₂ fixing rizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CARVALHO, M. A. C. et al. Produtividade do milho em sucessão a adubos verdes no sistema de plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 47-53, 2004.

CERETTA, C. A. et al. Fornecimento de nitrogênio por leguminosas para o milho em sucessão nos sistema de cultivo mínimo e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 18, p. 215-220, 1994.

CHABOT, R. et al. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2767-2772 1996.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumonia* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 66, p. 783-787, 2000.

CHRITANSEN-WENIGER, C.; VANDERLEYDEN, J. Ammonium-excreting *Azospirillum* sp become intracellular established in maize (*Zea mays*) para-nodules. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 17, p. 1-8, 1994.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400 p.

CREUS, C. M. et al. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta**, Berlin, v. 221, p. 297-303, 2005.

DAHLIN, A.S.; STENBERG, M. Transfer of N from red clover to perennial ryegrass in mixed stands under different cutting strategies. **European Journal of Agronomy**, Montpellier, v. 33, p. 149-156, 2010.

DIEKOW, J. et al. Soil C and N stocks as affected by cropping systems and nitrogen fertilization in a southern Brazil Acrisol managed under no-tillage for 17 years. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 81, p. 87-95, 2005.

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

DONG, Y. M. et al. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1783-1790, 2003.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro, 2006. 306 p.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA Ltda. **Manual do medidor eletrônico de teor clorofila: ClorofiLOG/CFL 1030**. Porto Alegre: Falker Automação Agrícola, 2008. 33 p.

FALLIK, E.; OKON, Y.; FISHER, M. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 20, p. 45-49, 1988.

FALLIK, E.; OKON. Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 12, p. 511-515, 1996.

FUSTEC, J. et al. Nitrogen rhizodeposition of legumes: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 30, p. 57-66, 2010.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, n. 193-196, 1996.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E. et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 23, p. 249-256, 1996.

GIACOMINI, S. J.; AITA, C.; VENDRUSCOLO, E. R. O. Matéria seca, relação C/N e acúmulo de nitrogênio, fósforo e potássio em misturas de plantas de cobertura de solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 325-334, 2003.

GUTIERREZ-ZAMORA, M. L.; ROMERO, E. M. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 117-126, 2001.

HALVORSON, A. D.; PETERSON, G. A.; REULE, C. A. Tillage system and crop rotation effects on dry land crop yields and soil carbon in the Central Great Plains. **Agronomy Journal**, Madison, v. 94, p. 1429-1436. 2002.

HERTENBERGER, G.; WANEK, W. Evaluation of methods to measure differential N-15 labeling of soil and root N pools for studies of root exudation. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, New York, v. 18, p. 2415-2425, 2004.

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

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 10, p. 1078-1085, 2004.

JACOUD, C. et al. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 339-342, 1999.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, North Carolina, v. 65, p. 197-209, 2000.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. B. Inoculation and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, p. 77-119, 1997.

JOE, M. M. et al. Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 50, p. 198-206, 2012.

KENNEDY, I. R. et al. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems; can their potential for plant growth promotion be latter exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KOZLOWSKI, L. A. Período crítico de interferência das plantas daninhas na cultura do milho baseado na fenologia da cultura. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 3, p. 365-372, 2002.

LAL, R. Soil surface management in the tropics for intensive land use and high and sustained production. **Advances in Soil Sciences**, New York, v. 5, p. 1-109, 1986.

MIYAUCHI, M. Y. H. et al. Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 5, p. 525-531, 2008.

MONTAÑEZ, A. et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ^{15}N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 45, p. 253-263, 2009.

OHLAND, R. A. A. et al. Culturas de cobertura do solo e adubação nitrogenada no milho em plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 538-544, 2005.

OSÓRIO FILHO, B. D. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. 2009. 113 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PALUS, J. A. et al. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea mays* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 186, p. 135-142, 1996.

PAYNEL, F. et al. A study of N^{15} transfer between legumes and grasses. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 28, p. 281-290, 2008.

PERIN, I. et al. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field grown maize and sugarcane. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3103-3110, 2006.

PIETERSE, C. M. J. et al. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 51-61, 2001.

PRIGENT-COMBARET, C. et al. Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 65, p. 202-219, 2008.

RIGGS, P. J. et al. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 829-836, 2001.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **How a corn plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology - Cooperative Extension Service, 1993. 21 p. (Special Report).

RÖESCH, L. F. W. et al. Screening of diazotrophic bacteria *Azopirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 23, p. 1377-1383, 2007.

SCHER, F.M.; BAKER, R. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt Pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 1567-1573, 1982.

SESSITSCH, A. et al. Advances in *Rhizobium* research. **Critical Reviews in Plant Science**, Abingdom, v. 21, p. 323-378, 2002.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7., 2009, Reno. [**Proceedings...**] Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SINGH, R.K. et al. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from rice (*Oryza sativa* L.) through rRNA gene PCR-RFLP and sequence analysis. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 345–349, 2006.

SOUZA, V. et al. Ethnomicrobiology: do agricultural practices modify the population structure of the nitrogen fixing bacteria *Rhizobium etli* biovar *phaseoli*. **Journal of Ethnobiology**, Flagstaff, v. 17, p. 249-266, 1997.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews of Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 1-30, 2000.

TILMAN D. The greening of the green revolution. **Nature**, London, v. 396, p. 211-221, 1998.

VIALLARD, V. et al. *Burkholderia graminis* sp. a now rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of (*Pseudomonas*) *phenazinium*, (*Pseudomonas*) *pyrocinia* and (*Pseudomonas*) *glathei* as *Burkholderia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 48, p. 549-563, 1998.

WICHERN, F. et al. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: methods, estimates and future prospects. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 30-48, 2008.

YANNI, Y. G. et al. 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. et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 845-870, 2001.

6 CAPÍTULO V - PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE ARROZ IRRIGADO PELA INOCULAÇÃO ISOLADA E COMBINADA DE RIZÓBIOS E *Azospirillum brasilense*

6.1 Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais consumidos, sendo um dos principais componentes da dieta da população mundial. No Brasil, o cultivo de arroz irrigado é responsável por cerca de 70% da produção deste cereal. O Rio Grande do Sul é responsável por mais de 50% da produção nacional (CONAB, 2012) sendo cultivados cerca de um milhão de hectares com arroz irrigado, de um total de 5,4 milhões de hectares de várzeas (Marchezan et al., 2002), caracterizadas pelo relevo plano e pela presença de solos hidromórficos com drenagem natural deficiente. Essas áreas apresentam limitações ao uso agrícola, sendo utilizadas principalmente para o cultivo do arroz irrigado e pecuária.

A utilização de leguminosas forrageiras de inverno que possuam capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em simbiose com rizóbios é uma alternativa para o aumento dos índices de produtividade dessas áreas, principalmente considerando-se que o nitrogênio (N) é o fator mais limitante da produção de arroz (Ladha & Reddy, 2003). Leguminosas forrageiras dos gêneros *Lotus* e *Trifolium* surgem como alternativas por apresentarem resistência às condições de alagamento. A inoculação destas leguminosas com estirpes eficientes na FBN poderá também beneficiar a cultura de arroz em sucessão, seja pela decomposição de resíduos vegetais ou pelo aumento do teor de N do solo. Além disso, diversos trabalhos têm comprovado que rizóbios e outros gêneros de bactérias simbiotes podem estabelecer associações

endofíticas e promover o crescimento de plantas de arroz (Yanni et al., 2001; Singh et al., 2006; Yanni & Dazzo, 2010).

Estas bactérias podem viver no interior de raízes, caules e estimular o crescimento de plantas de arroz, por um ou mais mecanismos, seja pela produção de reguladores do crescimento vegetal, como o ácido indol acético (AIA) (Biswas et al., 2000; Chen et al., 2005; Bhattacharjee et al., 2012), pela solubilização de fosfatos (Rodriguez e Fraga, 1999), pela produção da enzima ACC-desaminase que reduz os níveis de etileno nas raízes (Bhattacharjee et al., 2012) e, de uma forma indireta, protegendo as plantas contra patógenos pela liberação de substâncias tais como antibióticos, enzimas líticas de parede celular ou induzindo respostas de defesa sistêmica (Dutta et al., 2007).

Algumas estirpes de *Rhizobium* foram capazes de aumentar o comprimento da radícula e do coleótilo de plantas de arroz, além de incrementar a área foliar, a massa seca da parte aérea, a absorção de N, o número de panículas, e o rendimento de grãos (Biswas et al., 2000). Nas Filipinas, observou-se que o aumento na biomassa das plantas de arroz, inoculadas com rizóbios, levou a um aumento de 16% na produção de grãos (Peng et al., 2002). Em outros trabalhos, foram observados incrementos de 19% (Biswas et al., 2000) e de 32% (Chi et al., 2005) na produção de massa seca da parte aérea de plantas de arroz inoculadas com diferentes rizóbios.

Os estudos com o uso de bactérias simbiotes de leguminosas na promoção de crescimento de plantas não-leguminosas são relativamente recentes e em menor número quando comparados com os trabalhos sobre ecologia, fisiologia e genética de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* associadas com arroz (Ladha et al., 1987; Pereira et al., 1988; James et al., 2000, Khorshidi et al., 2011). Tem sido observado que a inoculação com estirpes de *Azospirillum* causa alteração morfológica da raiz, com o aumento das raízes laterais e de pêlos radiculares. Entre os mecanismos que explicam a promoção de crescimento pela inoculação com *Azospirillum* já foram citadas a produção de auxinas por estas bactérias (Steenhoudt e Vandereyden, 2000) e a contribuição da FBN, que pode variar de 9,2 a 27,7% e produzir aumentos de até 11,6% na produção de grãos, 18,6% no número de panículas e 18,5% no N-total de grãos de arroz em experimento em casa de vegetação (Rodrigues et

al., 2008). Resultados semelhantes foram obtidos por Baldani & Baldani (2005) e Guimarães et al., (2007).

No entanto, também tem sido relatados resultados frustrantes com a inoculação de estirpes de *Azospirillum*, isoladamente, em cultivos de arroz em experimentos a campo (Boddey et al., 1995; Sasaki et al., 2010; Souza et al., 2012). Uma alternativa para aumentar o crescimento de plantas de arroz é a inoculação combinada de bactérias associativas do gênero *Azospirillum* com rizóbios simbiotes de leguminosas. No Brasil, a inoculação combinada de mais de uma estirpe de *Azospirillum* já é utilizada comercialmente para arroz, milho e trigo (Hungria et al., 2010; MAPA, 2011), assim como a inoculação de cinco bactérias associativas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) aumenta a produtividade de cana-de-açúcar (Oliveira et al., 2002; Oliveira et al., 2006). Porém, a combinação de rizóbios simbiotes em leguminosas com bactérias associativas em arroz irrigado é um aspecto inovador deste trabalho.

Diante disso, a inoculação combinada em plantas de arroz irrigado de bactérias simbiotes em leguminosas e diazotróficos endofíticos, pode ser uma estratégia promissora e alternativa visando-se o aumento de produção e a redução do uso de fertilizantes químicos neste cereal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da inoculação isolada e combinada de rizóbios isolados de leguminosas com bactérias diazotróficas endofíticas na promoção de crescimento de arroz irrigado.

6.2 Material e métodos

Os rizóbios utilizados nos experimentos descritos neste estudo foram UFRGS Vp16 (*Burkholderia* sp.), isolado de nódulo de plantas de trevo branco (*Trifolium repens*) por Alves (2005), e UFRGS Lc348 (*Mesorhizobium* sp.), isolado de nódulos de plantas de cornichão (*Lotus corniculatus*) por Frizzo (2007) mantidos na Coleção de Cultura de Rizóbios da UFRGS. Os rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348 foram selecionados a partir de plantas coletadas em solos do Rio Grande do Sul e mostraram-se eficientes na FBN em plantas de trevo branco (Alves, 2005; Alves, 2012) e cornichão (Frizzo,

2007) respectivamente, em experimentos em casa de vegetação. Estes rizóbios também mostraram-se eficientes na promoção de crescimento de arroz em experimentos anteriores em laboratório e casa de vegetação (Osório Filho, 2009). Além dos rizóbios, utilizou-se um produto inoculante comercial recomendado para arroz da empresa Total Biotecnologia Indústria e Comércio Ltda denominado Azototal[®] contendo as estirpes de *Azopirillum brasilense* AbV5 e AbV6. O produto utilizado é uma formulação líquida com recomendação de uso de 100 mL do produto comercial por hectare. O número de células declarada pelo fabricante é de $2,0 \times 10^8$ células mL⁻¹.

Foram realizados dois experimentos a campo, sendo um deles conduzido no município de Cachoeirinha-RS na safra 2010/2011 e o outro em Cachoeira do Sul-RS na safra 2011/2012. Ambas as áreas experimentais estão localizadas em municípios tradicionais na produção de arroz do Rio Grande do Sul, e pertencem à Estação Experimental do Arroz (EEA) do Instituto Riograndense do Arroz (IRGA). No primeiro cultivo (2010/2011) o experimento foi conduzido no Município de Cachoeirinha, região fisiográfica da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, situado a 29°55'30" de latitude Sul e a 50°58'21" de longitude Oeste e altitude média de 7 m. O solo da área experimental é classificado como Gleissolo Háplico Ta distrófico típico (Embrapa, 2006) e apresentou as seguintes características em amostras coletadas de zero a 20 cm de profundidade: 340 g kg⁻¹ de argila, 12 g kg⁻¹ de matéria orgânica, 16,3 mg dm⁻³ de fósforo, 42 mg dm⁻³ de potássio, 2,1 cmol_c dm⁻³ de cálcio, 0,9 cmol_c dm⁻³ de magnésio e 0,4 cmol_c dm⁻³ de alumínio. No segundo cultivo (2011/2012), o experimento foi conduzido no Município de Cachoeira do Sul-RS, região fisiográfica da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, situado a 29°55'30" de latitude Sul e a 50°58'21" de longitude Oeste e altitude média de 7 m. O solo da área experimental é classificado como Gleissolo Háplico Ta distrófico típico (Embrapa, 2006) e apresentou as seguintes características em amostras coletadas de zero a 20 cm de profundidade: 140 g kg⁻¹ de argila, 16 g kg⁻¹ de matéria orgânica, 9,8 mg dm⁻³ de fósforo, 101 mg dm⁻³ de potássio, 3,0 cmol_c dm⁻³ de cálcio, 1,1 cmol_c dm⁻³ de magnésio e 0,6 cmol_c dm⁻³ de alumínio.

No experimento realizado em Cachoeirinha-RS na safra 2010/2011, foi utilizada a cultivar de arroz Puitá INTA, duas doses de N (60 e 120 kg.ha⁻¹

de N) e a inoculação isolada ou combinada dos rizóbios UFRGS Lc348 e UFRGS Vp16 e do produto inoculante comercial à base de *Azospirillum brasilense* (estirpes Ab-V5 e Ab-V6).

No segundo experimento, em Cachoeira do Sul na safra 2011/2012, foi utilizada a cultivar de arroz IRGA 422CL, que apresenta um maior potencial de rendimento de grãos, três doses de N : 0, 70 e 140 kg.ha⁻¹, assim como os tratamentos com os inoculantes anteriormente descritos.

O N foi aplicado na forma de ureia, parceladamente, sendo 2/3 nos estádios V3 e V4, antes do alagamento (10 dias após emergência), e 1/3 em cobertura no perfilhamento. Na semeadura foram aplicados 90 kg.ha⁻¹ de K₂O na forma de cloreto de potássio e 60 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato triplo.

Em ambos os experimentos, a área foi previamente dessecada com glifosato e o solo preparado convencionalmente com grade de discos. O controle de plantas daninhas, pragas e doenças e as demais práticas de manejo fitossanitárias e manejo da água foram realizadas conforme as recomendações técnicas da pesquisa do arroz irrigado para o Sul do Brasil (SOSBAI, 2007).

Para a produção do inóculo bacteriano, os isolados UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348 foram inoculados em erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio de cultura meio levedura manitol líquido (LM) (Vincent 1970), e incubados a 28 °C em incubador orbital com agitação de 120 rpm por seis dias. Após, foram misturados 3,5 mL de caldo com riqueza de $7,5 \times 10^8$ células mL⁻¹ em 8 L de água destilada esterilizada em autoclave (120°C por 1 hora), obtendo-se uma suspensão com riqueza de $3,3 \times 10^5$ células mL⁻¹. O volume total da suspensão (8 L) foi aplicado manualmente com regador na linha de cultivo logo após a semeadura na parcela, estimando-se que $1,7 \times 10^8$ células de rizóbios tenham sido aplicadas por m⁻² na parcela.

A contagem das células bacterianas do caldo foi realizada em câmara de Neubauer. Para o produto inoculante comercial à base de *A. brasilense* foram misturados 3,5 mL de produto comercial com riqueza declarada pelo fabricante de $2,0 \times 10^8$ células mL⁻¹ em 8 L de água destilada esterilizada, obtendo uma suspensão de $8,8 \times 10^4$ células mL⁻¹ de água que foi aplicada conforme descrito acima, estimando-se que $5,3 \times 10^7$ células foram

aplicadas por m^{-2} por parcela. Nas parcelas que receberam a mistura de rizóbios e o produto comercial à base de *A. brasilense*, foram misturados 3,5 mL de caldo dos rizóbios com riqueza de $7,5 \times 10^8$ células mL^{-1} e 3,5 mL de produto comercial com riqueza declarada pelo fabricante de $2,0 \times 10^8$ células mL^{-1} em 8 L de água destilada esterilizada, obtendo-se uma suspensão de células bacterianas de $3,3 \times 10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$, a qual foi aplicada conforme descrito acima, estimando-se que $2,5 \times 10^8$ células foram aplicadas por m^{-2} por parcela. A mistura dos caldos foi realizada antes da inoculação nas parcelas.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com quatro repetições, dispostos em parcelas subdivididas, sendo a parcela principal o inoculante e as subparcelas as doses de N. Cada parcela foi composta por 13 linhas, espaçadas de 0,17 m, com seis m de comprimento, totalizando uma área de $13,26 \text{ m}^2$. Foram construídas taipas entre as parcelas com os tratamentos inoculados para não haver contaminação entre as mesmas.

A densidade inicial de plantas, número de perfilhos por planta, os componentes do rendimento (grãos por panícula e número de panículas por m^2) e a matéria seca da parte aérea das plantas foram avaliadas em um metro linear em duas linhas de cada subparcela, perfazendo uma área de $0,34 \text{ m}^2$. Após secagem em estufa, à temperatura de $65 \text{ }^\circ\text{C}$, as amostras foram pesadas e trituradas para determinação do teor de N na massa seca da parte aérea de acordo com Tedesco et al. (1995) e do N total na massa seca da parte aérea. Para determinação da altura de plantas mediu-se o comprimento da base da planta ao ápice da panícula em 10 plantas por unidade experimental, escolhidas aleatoriamente. O rendimento de grãos foi obtido com a colheita manual das nove linhas centrais de cada subparcela, sendo corrigido considerando-se $130 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de umidade.

Foi determinado também o Índice de Eficiência Relativa (IER) da produção de massa seca da parte aérea, do rendimento de grãos e do nitrogênio total na massa seca da parte aérea. Para tal utilizou-se a equação abaixo, onde $TRAT_i$ corresponde ao valor da variável dos tratamentos inoculados com adição de N equivalente a 100% da dose completa de N, $CONT_{N/2}$ corresponde ao valor da variável dos tratamentos controle com adição de N equivalente a 50% da dose completa de N e $CONT_N$ corresponde ao valor

da variável dos tratamentos controle com adição de N equivalente a 100% da dose completa de N.

$$IER (\%) = \left(\frac{(TRAT_I - CONT_{N/2}) - (CONT_N - CONT_{N/2})}{CONT_N - CONT_{N/2}} \right) X 100$$

Os resultados foram submetidos à análise da variância pelo programa estatístico ASSYSTAT (Silva et al., 2009), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

6.3 Resultados e discussão

Os resultados da análise de variância mostraram que a inoculação dos isolados bacterianos aumentou significativamente ($P \leq 0,05$) a maioria das variáveis analisadas. Para a cultivar de arroz Puitá INTA (Tabela 6.1), observou-se que a inoculação aumentou a produção de massa seca da parte aérea, o N total na massa seca da parte aérea, a altura de plantas, o número de panículas m^{-2} e o número de perfilhos/planta. Já na cultivar IRGA 422CL (Tabela 6.2), os efeitos da inoculação com bactérias diazotróficas proporcionaram aumentos para massa seca da parte aérea, N total na massa seca da parte aérea, rendimento de grãos, grãos por panícula e número de panículas m^{-2} .

Para a cultivar Puitá INTA (Tabela 6.1), entre os tratamentos com bactérias inoculadas isoladamente, apenas a inoculação do produto comercial contendo *A. brasilense*, capaz de fixar nitrogênio em gramíneas, proporcionou aumento de 4,0% na altura das plantas e aumento de 15,7% no número de panículas m^{-2} em relação ao tratamento controle com o uso de $60 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de N, porém, os valores foram equivalentes aos obtidos nas plantas dos tratamentos inoculados com o rizóbio UFRGS Vp16 que não é capaz de fixar nitrogênio em gramíneas. Estes resultados mostram que, possivelmente, o estímulo ao crescimento das plantas de arroz não se deveu à FBN, mas sim a outros mecanismos, como produção de óxido nítrico (Creus et al., 2005), e atividade de 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACC desaminase) (Prigent-Combaret et al., 2008), mas a produção de fitohormônios tais como auxinas

tem sido comumente proposta como mecanismo principal (Dobbelaere et al., 2003).

A inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 nas plantas da cultivar IRGA 422CL aumentou a massa seca da parte aérea das plantas que receberam zero e 70 kg.ha⁻¹ de N em 29,4 e 19,5%, respectivamente (Tabela 6.2) e aumentou em 17,1% o número de grãos por panícula das plantas que receberam 140 kg.ha⁻¹ de N em relação ao tratamento controle. Bactérias do gênero *Burkholderia*, ao qual pertence o rizóbio UFRGS Vp16, possuem grande capacidade de promoção de crescimento de plantas de arroz, como demonstrado por Tran Van et al., (2000), Chen et al., (2005) e Govindarajan et al., (2008). Baldani et al., (2000), usando a técnica de ¹⁵N, estabeleceram que *B. vietnamiensis* em condições axênicas pode fixar da atmosfera 19% do N requerido por plantas de arroz (152 µg planta⁻¹ de N). Já Govindarajan et al. (2008), obtiveram valores mais altos, com cerca de 42% do N de plantas de arroz no campo e 40% do N de plantas de arroz em vasos foi derivado da atmosfera via FBN por *B. vietnamiensis*, onde os isolados estudados, obtidos de raízes de arroz, também produziram ácido indol acético (AIA). Nos estudos anteriores realizados com o isolado UFRGS Vp16, detectou-se a capacidade para solubilização de fosfato tricálcico (Alves, 2005), além da produção de AIA (Machado, 2012, dados não publicados) que são listados como prováveis mecanismos de promoção de crescimento (Rodriguez & Fraga, 1999; Biswas et al., 2000; Chen et al., 2005; Bhattacharjee et al., 2012).

Para a cultivar de arroz Puitá INTA, observou-se que o aumento da dose de nitrogênio aplicada somente influenciou a quantidade de N total na massa seca da parte aérea e o número médio de perfilhos/planta. Já para a cultivar IRGA 422CL, com a utilização de doses maiores de N, somente o perfilho/planta não apresentou diferenças para o fator N.

Tabela 6.1 Produção de Massa seca da parte aérea, nitrogênio total na massa seca da parte aérea, rendimento de grãos, altura de plantas, grãos por panícula, panículas m⁻² e perfilhos/planta de arroz irrigado cultivar Puitá INTA inoculado com bactérias diazotróficas em 60 e 120 kg.ha⁻¹ de nitrogênio.

Nitrogênio (kg.ha ⁻¹)	Controle	UFRGS Vp16	UFRGS Lc348	<i>A. brasilense</i>	UFRGS Vp16 + <i>A. brasilense</i>	UFRGS Lc348 + <i>A. brasilense</i>	CV (%)
	--- Massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹) ---						
60	6.191,2 Ab	6.852,9 Ab	6.761,0 Ab	7.367,6 Aab	8.548,5 Aa	7.588,2 Aab	16,7
120	7.110,3 Aa	7.310,3 Aa	7.551,5 Aa	7.113,0 Aa	8.489,0 Aa	8.047,8 Aa	
	--- Nitrogênio total na massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹) ---						
60	182,0 Bc	197,4 Bbc	206,9 Abc	212,2 Abc	273,6 Aa	245,9 Aab	17,7
120	212,6 Aa	214,0 Aa	212,2 Aa	197,0 Aa	252,1 Aa	250,3 Aa	
	--- Rendimento de grãos (kg.ha ⁻¹) ---						
60	5.822,2 ns	5.800,7 ns	6.117,8 ns	6.512,3 ns	6.293,7 ns	6.428,1 ns	8,1
120	6.122,0 ns	6.163,5	6.345,2	6.484,7	6.215,5	6.620,2	
	--- Altura de plantas (cm) ---						
60	85,5 Ab	87,7 Aab	87,0 Aab	88,9 Aa	89,3 Aa	88,5 Aa	8,4
120	86,8 Aa	88,1 Aa	88,0 Aa	88,1 Aa	88,9 Aa	89,2 Aa	
	--- Grãos/panícula ---						
60	51,5 ns	56,9 ns	54,8 ns	50,8 ns	60,4 ns	54,3 ns	11,7
120	52,2 ns	49,6	50,8	51,9	51,7	48,1	
	--- Panículas m ⁻² ---						
60	427,9 Ab	441,2 Aab	415,4 Ab	494,9 Aa	480,9 Aa	461,0 Aab	15,0
120	448,5 Aa	448,5 Aa	426,5 Aa	463,5 Aa	497,8 Aa	530,1 Aa	
	--- Perfilhos/planta ---						
60	1,6 Ab	1,5 Ab	1,5 Ab	1,6 Ab	1,9 Aa	2,0 Aa	32,1
120	1,3 Aa	1,4 Aa	1,4 Aa	1,5 Aa	1,3 Ba	1,4 Ba	

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem entre si (Tukey, P<0,05). ns = não significativo e CV = coeficiente de variação.

Tabela 6.2 Produção de Massa seca da parte aérea (MSPA), nitrogênio total na MSPA, rendimento de grãos, altura de plantas, grãos/panícula, panículas m⁻² e perfilhos/planta de arroz irrigado cultivar IRGA 422CL inoculado com bactérias diazotróficas em 0,70 e 140 kg.ha⁻¹ de nitrogênio.

Nitrogênio (kg.ha ⁻¹)	Controle	UFRGS Vp16	UFRGS Lc348	<i>A. brasilense</i>	UFRGS Vp16+A. <i>brasilense</i>	UFRGS Lc348+A. <i>brasilense</i>	CV (%)
--- Massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹) ---							
0	5.210,7 Bb	6.745,2 Ba	5.477,6 Bab	6.359,3 Bab	5.439,3 Bab	6.200,4 Bab	
70	8.954,2 Ab	10.696,7 Aa	9.810,7 Aab	10.246,0 Aab	10.895,2 Aa	9.941,2 Aab	10,9
140	10.081,1 Ab	11.420,5 Aab	11.162,5 Aab	11.141,2 Aab	11.902,9 Aa	11.179,9 Aab	
--- Nitrogênio total na massa seca da parte aérea (kg.ha ⁻¹) ---							
0	68,2 Bns	89,7 B	65,4 B	76,3 C	59,3 C	80,0 C	
70	211,3 Ans	267,4 A	222,7 A	248,0 B	264,8 B	266,4 B	18,3
140	270,2 Ac	314,1 Aabc	310,3 Abc	348,7 Aab	436,8 Aa	364,1 Aab	
--- Rendimento de grãos (kg.ha ⁻¹) ---							
0	5.427,6 Bns	5.485,6 B	5.280,3 B	6.112,0 B	5.524,0 C	5.340,0 B	
70	7.738,7 Ab	8.439,3 Aab	7.767,2 Ab	8.789,3 Aab	9.163,1 Aa	8.301,6 Aab	9,3
140	8.157,8 Ans	8.902,4 A	8.048,4 A	8.278,4 A	8.139,8 B	9.055,1 A	
--- Altura de plantas (cm) ---							
0	76,2 Cns	77,0 B	75,4 C	76,1 B	76,3 C	76,5 B	
70	89,0 Bns	91,0 A	89,9 B	90,5 A	90,3 B	91,8 A	3,7
140	94,8 Ans	94,6 A	97,8 A	94,9 A	96,4 A	95,2 A	
--- Grãos/Panícula---							
0	51,2 Bns	53,7 B	49,9 C	58,2 B	53,4 B	59,0 B	
70	57,8 ABns	61,7 B	60,3 B	64,4 B	60,3 B	59,7 B	10,8
140	67,4 Ac	79,3 Aab	72,1 Abc	75,3 Abc	86,9 Aa	73,3 Abc	

Tabela 6.2. Continuação...

Nitrogênio (kg.ha ⁻¹)	Controle	UFRGS Vp16	UFRGS Lc348	<i>A. brasilense</i>	UFRGS Vp16+A. <i>brasilense</i>	UFRGS Lc348+A. <i>brasilense</i>	CV (%)
				--- Panículas m ⁻² ---			
0	610,4 Ans	620,3 B	533,0 B	550,0 B	553,7 C	581,6 B	
70	789,0 Ab	817,6 Ab	723,5 Ab	807,3 Ab	939,7 Aa	776,5 Ab	15,4
140	752,9 Ans	861,0 A	814,0 A	844,9 A	763,2 B	820,6 A	
				--- Perfilhos/planta ---			
0	2,5 ns	2,3 ns	2,2 ns	2,2 ns	2,5 ns	2,3 ns	
70	2,7 ns	3,0	2,5	2,7	2,6	2,9	19,7
140	2,4 ns	2,8	2,8	3,0	3,0	2,7	

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem entre si (Tukey, P<0,05). ns = não significativo e CV = coeficiente de variação.

Observou-se que as inoculações isoladas do produto inoculante comercial contendo *A. brasilense* e do rizóbio UFRGS Vp 16 apresentaram efeito de promoção de crescimento de acordo com a cultivar de arroz utilizada nos experimentos a campo. A inoculação das mesmas bactérias nas duas cultivares distintas de arroz produziram resultados diferentes. Isso poderia ser resultante de diferenças na interação planta/micro-organismo promotor de crescimento, podendo existir alguma especificidade nesta interação. Uma causa provável para a grande variação nos resultados observados com a inoculação isolada de bactérias em plantas seria a colonização radicular variável devido à problemas na sobrevivência do inóculo ou condições desfavoráveis para a bactéria (Weller & Zablotowicz, 1987), se a bactéria não puder colonizar a rizosfera não terá como interagir com a planta. Resultados semelhantes foram observados por Yanni et al., (2001), Osório Filho (2009) e Sasaki et al., (2010). Estas causas mostram a complexidade de interações envolvidas na rizosfera entre a planta, a bactéria introduzida e o resto da microbiota rizosférica, neutra ou deletéria, o que interfere significativamente na capacidade do isolado em promover o crescimento da planta (Antoun et al., 1998). A produção de compostos do metabolismo secundário em cultivares de arroz, que atuam como sinalizadores para uma efetiva interação bactéria/planta, pode ser diferentemente influenciada por bactérias no ambiente da rizosfera e determinar diferenças no efeito de promoção de crescimento das cultivares, o que já foi comprovado para variedades de milho e interação com bactérias do gênero *Azospirillum* (Walker et al., 2011).

Os rizóbios UFRGS Lc348 e UFRGS Vp16 promoveram o crescimento de plantas de arroz quando foram inoculados juntamente com o produto inoculante contendo *A. brasilense*, principalmente o rizóbio UFRGS Vp16. Em ambos os experimentos a campo, a inoculação combinada do rizóbio UFRGS Vp16 com o produto inoculante com *A. brasilense* induziu aumento em um maior número de componentes de produção estudadas em relação aos demais tratamentos. Para a cultivar Puitá INTA (Tabela 6.1), cultivada em Cachoeirinha com 60 e 120 kg.ha⁻¹ de N, a inoculação da mistura do rizóbio UFRGS Vp16 com o produto inoculante com *A. brasilense*, associada com a utilização de 60 kg.ha⁻¹ de N, proporcionou aumentos de 36,5% na massa seca da parte aérea, em relação ao controle sem inoculação, aumentos de 50,3%

no N total na massa seca da parte aérea, de 4,7% na altura de plantas, e 18,9% no número de perfilhos/planta (Tabela 6.1). O incremento na produção de matéria seca da parte aérea, em comparação ao obtido no tratamento controle sem inoculação e com adição de 60 kg de N ha⁻¹, correspondeu a 1,9 Mg ha⁻¹ e em comparação com o obtido no controle com 120 kg de N ha⁻¹ foi de 1,5 Mg ha⁻¹ de matéria seca da parte aérea. Tais resultados se refletiram no elevado índice de eficiência relativa (IER) para produção de MSPA e N na MSPA (Tabela 6.3) obtido neste tratamento. Ainda nesta cultivar, as plantas dos tratamentos que receberam 60 kg.ha⁻¹ de N, a inoculação combinada do rizóbio UFRGS Lc348 com o produto inoculante comercial contendo *A. brasilense* produziu aumento na altura das plantas (3,5%) em relação ao tratamento controle sem inoculação (Tabela 6.1).

Tabela 6.3 Índice de eficiência relativa (IER)^{*} (%) dos tratamentos com bactérias diazotróficas no crescimento da massa seca da parte aérea de duas cultivares de arroz na produção de massa seca da parte aérea (MSPA), no rendimento de grãos e nitrogênio na massa seca da parte aérea (N na MSPA).

Tratamentos	--- Puitá INTA ---			--- IRGA 422CL ---		
	MSPA	Rendimento de grãos	N na MSPA	MSPA	Rendimento de grãos	N na MSPA
UFRGS VP 16	118,9	177,7	81,7	21,7	13,9	4,6
UFRGS Lc 348	96,0	-26,1	72,6	47,9	74,6	-1,3
<i>Azospirillum</i>	94,1	28,8	127,1	0,2	121,2	-51,0
UFRGS VP 16 + <i>Azospirillum</i>	161,7	-6,7	263,8	149,9	31,3	129,1
UFRGS Lc 348 + <i>Azospirillum</i>	96,6	214,1	149,5	101,9	166,5	123,2

(*) Valores positivos de IER do tratamento inoculado referem-se ao aumento do valor da variável em relação aos tratamentos controle com metade da dose de N e a dose completa de N. Valores negativos referem-se a menores valores da variável em relação aos tratamentos controle.

Assim como ocorreu no caso da cultivar Puitá INTA, a inoculação combinada do rizóbio UFRGS Vp16 e do produto inoculante contendo *A. brasilense* também se destacou na cultivar IRGA 422CL para inúmeras variáveis (massa seca da parte aérea, N total na massa seca da parte aérea, rendimento de grãos, grãos por panícula e panículas m⁻²). Com a aplicação de

70 kg.ha⁻¹ de N, este tratamento aumentou o número de panículas m⁻² (aumento de 19,1%) e a massa seca da parte aérea (aumento de 21,7%). Quando fertilizadas com 140 kg.ha⁻¹ de N, observou-se que nas plantas inoculadas com estas bactérias aumentou a massa seca da parte aérea (aumento de 18,1%) o número de grãos por panícula (aumento de 28,9%) e o N total na matéria seca da parte aérea das plantas (aumento de 61,7%). Inclusive para a cultivar IRGA 422CL, houve um aumento no rendimento de grãos com a utilização de 70 kg.ha⁻¹ de N, com um incremento de 1.424 kg.ha⁻¹, o que corresponde a um aumento de 21,7% em relação ao tratamento não inoculado. Em comparação com o tratamento controle, na avaliação do IER para a cultivar IRGA 422CL (Tabela 6.3), observou-se que a inoculação com a mistura do rizóbio UFRGS Vp16 com o produto comercial com *A. brasilense* produziu IER de 149,9% para MSPA, 31,3% para rendimento de grãos e 129,1% para N. Além disso, com a inoculação das bactérias deste tratamento, 166,6 kg.ha⁻¹ de N a mais foram acumulados na massa seca da parte aérea com a dose de 140 kg.ha⁻¹ N (Tabela 6.2).

A produção de hormônios vegetais (Chen et al., 2005, Bhattacharjee et al., 2012) solubilização de fosfatos (Rodriguez & Fraga, 1999; Alikhani et al., 2006), FBN (Rodrigues et al., 2008) ou mecanismos indiretos como a proteção das plantas de patógenos (Dutta et al., 2007) são apontados como importantes mecanismos de promoção de crescimento de bactérias quando inoculadas em plantas. Ueda et al. (1995) argumentam que em uma inoculação combinada de bactérias promotoras de crescimento em plantas, cada isolado pode ocupar um nicho diferente na planta, substituindo uma esperada competição por um efeito cooperativo. Neste trabalho, a inoculação combinada das bactérias mostrou melhores resultados do que quando inoculadas isoladamente nas plantas, o que também é comprovado em outros trabalhos. Em experimento a campo por Govindarajan et al., (2008) os autores obtiveram aumentos de 9,5 a 23,6% no crescimento de arroz com a inoculação combinada de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum lipoferum* e dois isolados de *Burkholderia vietnamiensis*, ao passo que a inoculação isolada de cada uma das bactérias promoveu o crescimento das plantas de arroz somente de 3,1 a 12,8%. No Brasil, foram obtidos aumentos na produtividade de cana-de-açúcar com inoculação combinada de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

LMG7603, *Herbaspirillum seropedicae* LMG6513, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *Burkholderia* sp. (Oliveira et al., 2002). Nota-se que nos trabalhos acima citados, foi estudada a inoculação combinada de bactérias diazotróficas associativas. Diferentemente, em nosso trabalho, estudou-se a inoculação combinada de bactérias associativas do gênero *Azospirillum*, na forma de um produto comercial, com rizóbios isolados de leguminosas (trevo branco e cornichão), os quais já haviam se mostrado eficientes na FBN em simbiose com seus hospedeiros em trabalhos anteriormente realizados (Alves, 2005; Frizzo, 2007). Uma das razões para a utilização da inoculação combinada com rizóbios seria o estabelecimento de maior população destes rizóbios no solo visando-se aumentar a infecção nas leguminosas hospedeiras cultivadas em sucessão ao arroz e aumentar a produção e o teor de proteína das pastagens e posteriormente do próprio arroz em cultivo em sucessão. Em experimentos a campo no Egito já foi observado que o cultivo do arroz em sucessão ao *Trifolium alexandrinum* substitui 25 a 33% da dose recomendada de N para o arroz em sucessão e a inoculação de bactérias isoladas desta leguminosa aumentou o rendimento de arroz em média 3,8 t ha⁻¹ (Yanni et al., 1997).

Para a obtenção de altos rendimentos de grãos de arroz, com maior eficiência na utilização do N aplicado, o uso combinado de bactérias simbiotes de leguminosas com outras bactérias promotoras de crescimento vegetal, como *Azospirillum*, pode ser uma alternativa eficaz. Como foi observado nos resultados dos experimentos a campo, o tratamento que combinou rizóbios com um produto comercial contendo duas estirpes de *A. brasilense* (UFRGS Vp16 + produto inoculante), mostrou que é possível obter-se o mesmo rendimento de grãos obtido com a dose completa de N sem inoculação. Os resultados deste trabalho indicam que existe um grande potencial no aumento na produção de arroz irrigado com a utilização da inoculação conjunta de micro-organismos promotores de crescimento de plantas como rizóbios e *Azospirillum*, o que poderá resultar em menor custo de produção e menor potencial de impacto ambiental dos fertilizantes nitrogenados.

6.4 Conclusões

A inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 e do produto comercial contendo *Azospirillum brasilense* apresenta respostas diferenciadas de promoção de crescimento das cultivares de arroz Puitá INTA e IRGA 422CL.

A inoculação combinada dos rizóbios UFRGS Vp16 e Lc348 com um produto comercial contendo *A. brasilense* promove o crescimento das plantas de arroz das cultivares Puitá INTA e IRGA 422CL mais do que as inoculações isoladas destas bactérias.

A inoculação combinada do rizóbio UFRGS Vp16 e do produto comercial contendo *A. brasilense* aumenta o rendimento de grãos da cultivar IRGA 422CL com metade da dose de nitrogênio.

6.5 Referências Bibliográficas

ALIKHANI, H. A.; SALEH-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 287, p. 35-41, 2006.

ALVES, J. B. **Seleção de rizóbios para trevo branco**. 2005. 68 f. (Dissertação) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ALVES, J. B.; SÁ, E. L. S.; MUNIZ, A. L. Seleção de rizóbios para o *Trifolium repens* em condições de solo alagado. **Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n. 1, 39-45, 2012.

ANTOUN, H. A. et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 204, p. 57-67, 1998.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 549-579, 2005.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 485-491, 2000.

BATES, S.T. et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME Journal**, Wageningen, v. 5, p. 908-917, 2011.

BHATTACHARJEE, R. B. et al. Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 48, n. 173-182, 2012.

BISWAS, J. C. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, p. 880-886, 2000.

BODDEY, R. M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 195-209, 1995.

CHEN, X. et al. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 2540-2548, 2005.

CHI, F. et al. 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, p. 7271-7278, 2005.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira, 9º levantamento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_06_05_09_50_17_boletim_safra_-_junho-2012.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2012.

CREUS, C. M. et al. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta**, Berlin, v. 221, p. 297-303, 2005.

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

DUTTA, S.; MISHRA, A. K.; DILEEP KUMAR, B. S. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 452-461, 2008.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro, 2006. 306 p.

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, 2007.

GOVINDARAJAN, M. et al. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 21-37, 2008.

GUIMARÃES, S. L. et al. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 393-398, 2007.

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

JAMES, E.K. et al. Endophytic diazotrophs associated with rice. In: LADHA, J. K.; REDDY, P. M. (Ed.). **The quest for nitrogen fixation in rice**. Los Baños: International Rice Research Institute, 2000. p. 119–140.

JHA, B. et al. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 45, p. 62-72, 2009.

KHORSHIDI, Y. R. Response of yield and yield components of rice (*Oryza sativa* L.) to *Pseudomonas fluorescense* and *Azospirillum lipoferum* under different nitrogen levels. **American-Eurasian Journal of Agricultural Environment Science**, Dubai, v. 10, p. 387–395. 2011.

LADHA, J. K.; REDDY, P. M. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 151-167, 2003.

LADHA, J. K.; SO, R. B.; WATANABE, I. Composition of *Azospirillum* species associated with wetland rice plant grown in different soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 102, p. 127-129, 1987.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABSTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 13, de 24 de março de 2011. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 mar. 2011. Seção 1.

MARCHEZAN, E. et al. Produção animal em várzea sistematizada cultivada com forrageiras de estação fria submetidas a diferentes níveis de adubação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 303-308, 2002.

OLIVEIRA, A. L. M. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 284, n. 1-2, p. 23-32, 2006.

OLIVEIRA, A. L. M. et al. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 242, p. 205-215, 2002.

OSÓRIO FILHO, B. D. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. 2009. 113 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PENG, S. et al. Influence of Rhizobial inoculation on rice photosynthesis. **Agronomy Journal**, Madison, v. 94, p. 925-929, 2002.

PEREIRA, J. A. R. et al. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 110, p. 269-274, 1988.

PRIGENT-COMBARET, C. et al. Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 65, p. 202-219, 2008.

RODRIGUES, E. P. et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 302, p. 249-261, 2008.

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

SASAKI, K. et al. Impact of plant genotype and nitrogen level on rice growth response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510 under paddy field conditions. **Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 56, p. 636-644, 2010.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7., 2009, Reno. [**Proceedings...**] Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SINGH, R.K. et al. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from rice (*Oryza sativa* L.) through rRNA gene PCR-RFLP and sequence analysis. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 345-349, 2006.

SOSBAI - Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Pelotas: SOSBAI, 2007. 154 p.

SOUZA, R. et al. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 360, p. 1-19, 2012.

STEENHOUDT, O.; VANDEREYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 487-506, 2000.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174 p.

TRAN VAN, V. et al. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 218, p. 273-284, 2000.

UEDA, T. et al. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of nif-H gene sequence. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, p. 1414-1417, 1995.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific; 1970. 164 p.

WALKER, V. et al. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 189, p. 494-506, 2011.

WELLER, D. M.; ZABLOTOWICZ, R. Recent results from field and greenhouse trials on biological control of diseases with obvious, visual and typical symptoms. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, 5., 1987, Orillia. **Proceedings...** Orillia, 1987. p.10-16.

YANNI, Y. G.; DAZZO, F. B. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 336, p. 129-142, 2010.

YANNI, Y. G. et al. 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. et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 845-870, 2001.

7 CAPÍTULO VI - COLONIZAÇÃO EM PLANTAS DE TREVO BRANCO (*Trifolium repens*) E DE ARROZ (*Oryza sativa*) E EM GRÃOS DE ARROZ por *Azospirillum brasilense* e *Burkholderia* sp. E *Mesorhizobium* sp.

7.1 Introdução

Com o aumento da população mundial há a necessidade do aumento da produção de alimentos, especialmente de arroz (*Oryza sativa*) por ser o grão de maior importância econômica e social. O Brasil está entre os dez principais países produtores de arroz e, a região Sul, onde se concentra o cultivo de arroz irrigado, participa com 70% da produção brasileira (CONAB, 2012).

O aumento da produtividade tem levado ao aumento da aplicação de fertilizantes químicos e minerais. Esta situação tem aumentado a preocupação ambiental relacionada com o uso crescente de fertilizantes minerais e, dentro deste contexto, a associação de micro-organismos promotores de crescimento com plantas de arroz está ganhando importância e poderá ser uma forma limpa, barata e ecologicamente sustentável para se alcançar aumentos da produção deste cereal.

Tem sido observada a efetividade da promoção de crescimento de plantas de arroz pela inoculação de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* (Steenhoudt & Vandereyden, 2000; Baldani & Baldani., 2005; Rodrigues et al., 2008). Também tem sido relatada a promoção de crescimento de plantas de arroz com a inoculação de rizóbios, eficientes na FBN em simbiose com leguminosas (Biswas et al., 2000; Yanni et al., 2001; Singh et al., 2006; Dutta et al., 2007; Yanni & Dazo, 2010; Chen et al., 2005; Bhattacharjee et al., 2012). No entanto, dúvidas ainda persistem sobre o uso eficiente destas

bactérias, pois também têm sido observados resultados frustrantes da inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* (Boddey et al., 1995; Sasaki et al., 2010; Souza et al., 2012). Uma das razões que tem sido apontada para tais insucessos é a incapacidade da interação bactéria/planta em estabelecer populações bacterianas significativas na superfície radicular ou em colonizar o interior das plantas inoculadas (Rothballer, et al., 2003). Além disso, os processos de infecção e colonização de gramíneas por micro-organismos promotores de crescimento vegetal ainda não foram totalmente esclarecidos (Prayitno et al., 1999; Yanni et al., 1997; Yanni et al., 2001).

A colonização de raízes e disseminação para a parte aérea das plantas por bactérias promotoras de crescimento é um sistema complexo que envolve uma série de etapas. O processo de colonização da planta inicia com uma fase de reconhecimento, onde as bactérias reconhecem e regulam as respostas ao seu ambiente circunvizinho via sistema sensorial, sendo vários destes sistemas identificados e envolvidos no reconhecimento de compostos rizodepositados pelas raízes (Heeb & Haas, 2001; Brencic & Winans, 2005; Faure et al., 2009). Além da capacidade de reconhecimento de substâncias radiculares, tem sido relatado que as bactérias promotoras de crescimento vegetal também possuem a capacidade de alterar a abundância e composição dos rizodepósitos radiculares (Raja et al., 2006; Walker et al., 2011).

A partir da colonização da superfície radicular, as bactérias podem entrar nos tecidos da epiderme radicular tanto passivamente como ativamente. A colonização de maneira passiva pode se dar, por exemplo, pela penetração em locais com junção de células epidérmicas adjacentes (Benhamou et al., 2000), pontos de emergência de raízes laterais (Govindarajan et al., 2008) ou ferimentos causados por fitopatógenos ou herbívoros do solo (Hallmann et al., 1997). Já a colonização de forma ativa pode ocorrer com a produção de enzimas hidrolíticas (por exemplo: exoglucanases, endoglucanase e endopoligalacturonase) envolvidas na degradação da parede celular da planta (Reinhold-Hurek et al., 1993; Compant et al., 2005).

Uma vez dentro das raízes, as bactérias endofíticas precisam passar a rede de Caspary na endoderme e sistemicamente se disseminar para a parte aérea da planta (McCully, 2001; Dong et al., 2003; Zakria et al., 2007). Dentro da planta, as bactérias podem se multiplicar rapidamente podendo atingir 10^8

células g⁻¹ de massa seca de tecido (Barraquio et al., 1997). Em plantas de arroz inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* marcado com o gene da proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* - GFP) e crescendo sob condições gnotobióticas, a população endofítica foi alta, atingindo 9 x 10¹⁰ células cm⁻³ de raiz e tecido foliar (Chi et al., 2005).

A migração vertical de bactérias endofíticas em plantas de arroz, cultivadas assepticamente, foi observada usando-se técnicas de isolamento de bactérias em meio agarizado (Adams e Kloepper, 2002; Kaga et al., 2009). Tem sido reportado que micro-organismos endofíticos ocorrem em virtualmente todos os tecidos das plantas hospedeiras, incluindo tecidos meristemáticos de plantas micropropagadas regenerados assepticamente (Dias et al., 2009; Lucero et al., 2008).

Embora as bactérias possam estar ausentes ou presentes em baixas densidades (10¹-10³ UFC/g de tecido) em órgãos reprodutivos das plantas (Compant et al., 2010), grãos de muitas plantas hospedeiras podem ser importantes vetores de disseminação endofítica (Okunishi et al., 2005; Mano et al., 2006; Mano et al., 2007). A disseminação de bactérias endofíticas via sementes pode ser mais comum do que se considerava previamente, e pode mesmo determinar vantagens ecológicas para a planta hospedeira carreadora de bactérias benéficas para superar condições ambientais adversas (Lopez-Lopez et al., 2010). Por meio da técnica de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (PCR-DGGE) para caracterização de produtos da amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do DNA extraído de sementes de arroz observou-se que cerca de 45% da comunidade bacteriana das sementes da primeira geração de plantas foram localizadas na segunda geração (Hardoim et al., 2012). Apesar desta importância, poucos trabalhos na literatura buscaram determinar as populações de bactérias diazotróficas que colonizam as sementes do arroz (Elbeltagy et al., 2001; Verma et al., 2001; Rodrigues et al., 2008).

Para o estudo dos diferentes tipos de interação planta-microrganismo vários métodos podem ser utilizados para facilitar a visualização e a localização de micro-organismos nas plantas. Tem sido usado uma variedade de marcadores como cromogênios (genes *gusA* e *lacZ*), compostos luminescentes (genes *luxAB*) e fluorescente como a proteína verde-

fluorescente (gene *gfp*). A proteína verde fluorescente (GFP), uma pequena proteína identificada originalmente na água-viva *Aequorea victoria*, é um excelente marcador para estudo de interações planta-bactérias (Chalfie et al., 1994; Gage et al., 1996; Errampalli et al., 1999). Como vantagens, aponta-se a fácil preparação as amostras para microscopia de fluorescência e a preservação da integridade dos tecidos e das estruturas das plantas e das bactérias colonizando estas plantas.

Os objetivos deste trabalho foram estudar a colonização radicular e dos tecidos da parte aérea de plantas de arroz inoculadas com *Azospirillum* e rizóbios marcados com gene *gfp* e quantificar a população destas bactérias diazotróficas em grãos de arroz oriundos de plantas inoculadas.

7.2 Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Solo e na casa de vegetação do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa do trabalho avaliou-se a colonização em grãos, oriundos de plantas de arroz inoculadas em experimento conduzido a campo pelas bactérias diazotróficas associativas das espécies *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* e pelos rizóbios *Burkholderia* sp. (UFRGS Vp16) simbiote em trevo branco (*Trifolium repens*) e *Mesorhizobium* sp. (UFRGS Lc348) simbiote em cornichão (*Lotus corniculatus*) utilizando-se a quantificação do número de bactérias. Na segunda etapa, duas estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) e os rizóbios UFRGS Vp16 (*Burkholderia* sp.) e UFRGS Lc348 (*Mesorhizobium* sp.) foram marcados com o gene *gfp* para visualização da colonização radicular e tecidos da parte aérea de plantas de arroz.

7.2.1 Quantificação da população de bactérias endofíticas presentes em grãos de plantas de arroz cultivadas a campo

Os grãos de arroz utilizados neste trabalho eram oriundos de plantas inoculadas em experimento conduzido a campo em Cachoeirinha-RS na safra 2010/2011, conforme descrito no Capítulo V. Foi utilizada a cultivar de arroz

Puitá INTA e duas doses de N (60 e 120 kg.ha⁻¹ de N) e a inoculação isolada ou combinada dos rizóbios UFRGS Lc348 e UFRGS Vp16, mantidos na Coleção de Cultura de Rizóbios da UFRGS, e do produto inoculante comercial Azototal[®], da empresa Total Biotecnologia Indústria e Comércio Ltda, contendo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*. Além dos tratamentos com inoculação, foi conduzido um tratamento controle sem inoculação e com N, nas duas doses de N acima citadas, totalizando 12 tratamentos. O experimento foi conduzido em blocos completos casualizados com quatro repetições.

Os grãos de arroz colhidos deste experimento foram secos em temperatura ambiente e armazenados no escuro e em temperatura ambiente por dois meses até o início do trabalho. Amostras de 10 gr. de grãos de arroz com casca foram desinfestadas por imersões sucessivas em álcool (70%) por 2 min., seguido de imersão em hipoclorito de sódio (2,5%) por 2 min. e, após, sete lavagens consecutivas com água destilada esterilizada em autoclave a 120°C por 15 min. Após, os grãos foram macerados em almofariz de porcelana esterilizado utilizando-se um pistilo e em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada. A suspensão obtida foi passada em coador estéril com malha de 1 mm. Após coletou-se alíquota de 1,0 ml e realizaram-se diluições decimais sucessivas, até a diluição 10⁻⁷, em tubos de ensaio com capacidade de 15 mL contendo 9 mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril. Todas as operações foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

Para a estimativa do número de bactérias diazotróficas das espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum* nos grãos de arroz colhidos das plantas dos tratamentos que receberam a inoculação com o produto comercial à base de *Azospirillum* e dos tratamentos controles, as alíquotas de 100 µL da suspensão de grãos macerados e de cada uma das diluições decimais foram inoculadas em frascos de vidro âmbar de 15 mL contendo 5 mL do meio semi-sólido NFb livre de N (Döbereiner et al., 1995a) (Apêndice IV). A inoculação das alíquotas de cada diluição foi realizada em triplicata, com os seguintes tratamentos: inoculação com grãos de arroz do tratamento controle com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N; inoculação com grãos de arroz do tratamento inoculado com produto comercial contendo *Azospirillum* com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N; inoculação com grãos de arroz do tratamento inoculado com produto comercial contendo *Azospirillum* e UFRGS Vp16 com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N; inoculação com grãos

de arroz do tratamento inoculado com produto comercial contendo *Azospirillum* e UFRGS Lc348 com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N. Além destes seis tratamentos, foram conduzidos um tratamento controle, sem inoculação.

Os frascos foram incubados a 28 °C por sete dias, sendo considerados positivos para contagem aqueles que apresentaram uma película aerotóxica típica próxima da superfície do meio. A estimativa do número de células da população de bactérias diazotróficas foi realizada utilizando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP), sendo empregada a tabela de McCrady para três repetições por diluição (Döbereiner et al., 1995a).

Para a quantificação do número de bactérias nodulantes de plantas de cornichão e trevo branco presentes nos grãos de arroz pelo método NMP, foram crescidas plântulas leguminosas que serviram como plantas armadilhas destas bactérias. Estas plantas foram das mesmas espécies das quais foram isoladas os rizóbios UFRGS Lc 348 e UFRGS Vp16, respectivamente, cornichão (*Lotus corniculatus*) cultivar São Gabriel e trevo branco (*Trifolium repens*) cultivar Estanzuela Zapicán, sendo observada a formação de nódulos radiculares nestas plantas. Para a obtenção das plântulas, as sementes das espécies estudadas foram desinfestadas por imersão em álcool (70%) por 30 s. e, após, imersas em hipoclorito (2,5%) por 1 min. Em seguida, as sementes foram lavadas sete vezes com água destilada estéril. Estas sementes foram acondicionadas em papel toalha e colocadas em estufa a 28°C por dois dias para germinação. Após esse período, seis plântulas de cada espécie foram colocadas em copos plásticos de 500 mL contendo mistura de vermiculita e areia (2:1), esterilizada em autoclave e receberam solução nutritiva estéril (Sarruge,1975) isenta de nitrogênio e diluída a 50%. Após sete dias, foi realizado o desbaste sendo mantidas três plantas por copo plástico e realizada a inoculação. Os tratamentos, realizados em quadruplicata, foram os seguintes nas plantas de trevo branco: plântulas inoculadas com grãos de arroz do tratamento controle com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N; plântulas inoculadas com grãos de arroz do tratamento inoculado com UFRGS Vp16 com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N; e plântulas com grãos de arroz do tratamento inoculado com UFRGS Vp16 mais produto comercial a base de *Azospirillum* com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N. Além destes quatro tratamentos, foram conduzidos um tratamento controle, sem inoculação e sem N. Nas plântulas de cornichão os tratamentos foram os

seguintes: plântulas inoculadas com grãos de arroz do tratamento controle com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N; plântulas inoculadas com grãos de arroz do tratamento UFRGS Lc348 com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N; e plântulas com grãos de arroz do tratamento UFRGS Lc348 mais produto comercial a base de *Azospirillum* com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N. Além destes quatro tratamentos foi conduzido um tratamento controle, sem inoculação e sem N.

Em cada copo foram inoculadas alíquotas de 1 mL da suspensão dos grãos macerados e das diluições 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação nos meses de julho a setembro.

Após 45 dias da semeadura, as plantas foram cuidadosamente retiradas do substrato e levadas para o laboratório onde foi registrado o número de plantas contendo nódulos radiculares. Para a estimativa do número de células de rizóbios das diluições utilizou-se a tabela de número mais provável (Somasegaran & Hoben, 1985) para a obtenção do fator NMP. O número final de células bacterianas nodulantes foi obtido pela média das quatro repetições para cada amostra de grãos de arroz avaliada.

7.2.2 Colonização de plantas de arroz inoculadas com *Azospirillum* e rizóbios marcados com gene *gfp*

7.2.2.1 Marcação das culturas de *Azospirillum* e rizóbios com gene *gfp*

O plasmídeo contendo o gene *gfp* que expressa a proteína verde fluorescente (GFP) foi obtido da estirpe da bactéria *Escherichia coli* MT102, portadora do plasmídeo pBAH7, que foi construído a partir de um vetor pBBR1MCS-2 contendo genes de resistência ao antibiótico canamicina (Kovach et al., 1995) e que expressa constitutivamente o gene *gfp* (forma modificada de *mut3*) (Cormack et al., 1996). Esta estirpe de *E. coli* foi gentilmente cedida pelo Dr. Anton Hartmann, da unidade de pesquisa Microbe-Plant Interactions, do Helmholtz München Zentrum (Munique-Alemanha). Para a obtenção das células de *E. coli*, inoculou-se a cultura bacteriana com alça de platina em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB), conforme descrito por Sambrook e Russel (2001) (Apêndice V),

esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min. e que receberam 50 µg/mL de kanamicina filtrado em membrana estéril com 0,22 µm de malha. Após, os frascos foram incubados por 12 horas a 37 °C sob agitação de 120 rpm. A extração do plasmídeo foi realizada usando-se a técnica de lise alcalina descrita em Birnboim e Doly (1979). A quantificação da concentração de DNA plasmidial foi realizada por meio do protocolo Qubit *Quantitation Platform*, formado pelo aparelho Qubit fluorômetro (Invitrogen) e reagentes do kit Quantir (Invitrogen). Amostras de trabalho foram preparadas com concentração de 100 ng de DNA plasmidial.

7.2.2.2 Preparação das bactérias diazotróficas eletrocompetentes

As células das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* foram tornadas eletrocompetentes utilizando-se o método de Rouws et al. (2006). Neste método, alíquotas de 1 mL das bactérias pré-crescidas em meio C2 (15 g.L⁻¹ de glicose, 10 g.L⁻¹ de peptona bacteriológica, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g.L⁻¹ de NaCl, pH 6,0) foram inoculadas em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio C2 e incubadas por 24 horas até atingir uma densidade ótica de 0,6 a 0,7 medida em fotocolorímetro em comprimento de onda de 600 nm. Após, os frascos foram resfriados em banho de gelo durante 30 min. Em seguida, o caldo das culturas bacterianas foi transferido para tubos do tipo Falcon de 50 mL e centrifugado durante 10 min. a 4.000 rpm e a 4 °C para precipitação das células. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados invertidos sobre papel absorvente por 5 s para drenagem completa do sobrenadante. Em seguida realizou-se a lavagem da massa de células precipitadas adicionando-se 50 mL de glicerol 10% e os sedimentos bacterianos foram ressuspensos, evitando-se movimentos bruscos nos tubos. Após completa ressuspensão, as células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foram realizadas mais duas lavagens conforme descrito acima. Após a última centrifugação, os sedimentos foram ressuspensos em 4 mL de glicerol 10% e as células eletrocompetentes foram distribuídas em alíquotas de 100 µL em tubos de microcentrífuga, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C até serem utilizadas. Todas as etapas foram realizadas sobre gelo, inclusive as soluções, as quais foram autoclavadas e resfriadas antes do uso.

Para as culturas bacterianas dos rizóbios UFRGS Vp16 (*Burkholderia* sp.) e UFRGS Lc348 (*Mesorhizobium* sp.), as células foram tornadas eletrocompetentes empregando-se a metodologia de Garg et al., (1999), com modificações. Inoculou-se uma alçada da cultura bacteriana em frascos contendo 20 mL de meio de cultura líquido triptona levedura (TY - apêndice VI (Somasegaram e Hoben, 1994), incubou-se a 28 °C com agitação de 120 rpm por 24 h. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio TY, os quais foram incubados a 28 °C e sob agitação de 120 rpm até atingir uma densidade ótica de 0,6 a 0,7 no comprimento de onda 600 nm. Após resfriar os frascos em banho de gelo durante 30 min., o caldo da cultura foi transferido para tubos do tipo Falcon de 50 mL e centrifugado durante 30 minutos a 10.621 x g e à 4°C para precipitação da massa de células. Após, a massa de células precipitada foi lavada duas vezes com 50 mL de água ultra-pura estéril e depois foram adicionados 50 mL de glicerol 10% estéril ao tubo. Todo esse processo foi feito em banho de gelo. A massa bacteriana foi ressuspendida, evitando-se movimentos bruscos dos tubos. Após a completa ressuspensão, as células foram novamente centrifugadas (à 4.000 rpm e 4 °C por 10 min) e o sobrenadante foi descartado. A lavagem com glicerol 10% foi repetida sob as mesmas condições descritas acima.

As células foram coletadas por centrifugação (4.000 rpm, 4 °C, 10 minutos) e os sedimentos foram ressuspensos em 5 mL de glicerol 10%. Após a completa ressuspensão, as células eletrocompetentes foram distribuídas em alíquotas de 100 µL em tubos de microcentrífuga e preservadas em nitrogênio líquido a 80 °C até serem utilizadas.

7.2.2.3 Eletroporação das culturas bacterianas

A eletroporação das bactérias foi realizada no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

Alíquotas de 100 µL das bactérias eletrocompetentes foram descongeladas em banho de gelo. Em eletrocubetas com espaço de 1 mm (Bio-Rad) previamente geladas (à 4 °C durante 4 min.) foram adicionados cerca

de 100 ng de DNA plasmidial (2 μ L da solução estoque) e 100 μ L das bactérias eletrocompetentes. A eletrocubeta foi colocada entre os eletrodos do eletroporador (Micro PulserTM Bio-Rad) e, para as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum* foi aplicado um pulso elétrico de 1,8 kilovolts constante por cerca de 0,8 milissegundos, 200 V de resistência e 25 FD de capacitância. Imediatamente após o pulso, foram adicionados 2 mL de meio C2 a 28 °C. A suspensão de células em meio C2 foi homogeneizada e transferida para um tubo de 20 mL e incubada a 28 °C em incubador orbital com agitação de 120 rpm por 2 horas para possibilitar a recuperação das células e a expressão dos genes introduzidos durante a transformação. Posteriormente, 1 mL da suspensão foram inoculados em placas com meio Dygs (Rodrigues Neto et al., 1986) contendo 50 μ g.mL⁻¹ de kanamicina. Estas placas foram incubadas a 28 °C durante 3 dias, até que as colônias transformadas pudessem ser visualizadas.

Já para a transformação das células dos rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348, foi aplicado um pulso elétrico de 2,2 kilovolts constante, por cerca de 0,8 milissegundos, 200 V de resistência e 25 FD de capacitância. Imediatamente após o pulso, foram adicionados 2 mL de meio TY sem antibiótico a 28 °C. A suspensão de células em meio Levedura Manitol (LM) foi homogeneizada e transferida para um tubo de 20 mL e incubada em incubador orbital com agitação de 120 rpm durante 2 horas a 28 °C para possibilitar a recuperação das células e a expressão dos genes introduzidos durante a transformação. Posteriormente, inoculou-se 1 mL da suspensão em placas com meio LM contendo 50 μ g.mL⁻¹ de kanamicina. Estas placas foram incubadas a 28 °C durante 5 dias, até que as colônias transformadas pudessem ser visualizadas.

As colônias transformadas presentes nas placas foram visualizadas em transiluminador com filtro de luz no comprimento de onda 490 nm, selecionadas e cultivadas em meio LM com antibiótico para posterior utilização.

7.2.2.3 Cultivo das plantas de arroz e inoculação com bactérias marcadas com gene *gfp*

Sementes de arroz da cultivar Puitá INTA foram descascadas e desinfestadas por imersões sucessivas em álcool (70%) por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) por um minuto e sete lavagens consecutivas com água destilada esterilizada em autoclave a 120°C por 15 minutos. Estas sementes foram acondicionadas em papel toalha e pré-germinadas por dois dias a 28°C. Após esse período, cada plântula foi transplantada para tubos de ensaio de 250 mm de comprimento e 24 mm de diâmetro, contendo 20 mL de solução nutritiva (Sarruge, 1975) agarizada (6%) previamente esterilizados em autoclave por 20 min a 121°C.

As culturas de *Azospirillum* transformadas (Ab-V5gfp e Ab-V6gfp) foram inoculadas com alça de platina em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio Dygs e 50 µg.mL⁻¹ de canamicina e incubadas por 4 dias a 28°C, sob agitação constante de 120 rpm. Ao final deste período, inoculou-se uma alíquota de 1 mL da cultura bacteriana contendo 1,5 x 10⁹ células mL⁻¹ por tubo de ensaio. As culturas dos rizóbios transformados (Vp16gfp e Lc348gfp) foram inoculadas com alça de platina em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio LM e 50 µg.mL⁻¹ de canamicina e incubadas a 28°C durante 7 dias. Após, inoculou-se 1 mL da cultura bacteriana contendo 8,5 x 10⁸ células mL⁻¹ por tubo de ensaio. A contagem da riqueza de células bacterianas do caldo foi realizada com microscopia ótica utilizando-se câmara de Neubauer. Os tubos contendo as plântulas inoculadas foram mantidos em lampadário com fotoperíodo de 12 horas de luz diária.

Além dos tratamentos com plantas inoculadas, foram cultivadas plantas em tubos sem inoculação que receberam 1 mL de meio Dygs, como controle para os tubos inoculados com as estirpes de *Azospirillum* marcadas e aquelas que receberam 1 mL de meio LM como controle para os tubos inoculados com culturas de rizóbios marcados. Para cada tratamento, foram realizadas três repetições.

Aos 10 e 20 dias após a inoculação, as plantas foram retiradas dos tubos e lavadas cuidadosamente com água estéril para remoção de sujidades superficiais. Cortes transversais e longitudinais foram realizados manualmente na zona pilífera, na zona de emergência de raízes laterais e na zona de divisão e alongação das raízes, bem como no colmo e nas folhas das plantas. Os

fragmentos obtidos foram montados em lâminas de vidro e embebidos com glicerol 10% esterilizado em autoclave. Para visualização, utilizou-se um microscópio confocal de varredura a laser (Olympus FV1000) do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, equipado com filtro de 488 nm para capturar a fluorescência verde das bactérias marcadas com a proteína GFP. As imagens foram adquiridas em séries confocais e analisadas com uso do programa Olympus Fluoview 3.1. Para cada dia de avaliação, utilizou-se cortes de três plantas por tratamento.

7.3 Resultados e discussão

7.3.1 Quantificação da população de *Azospirillum* e rizóbios presentes em grãos de plantas de arroz cultivadas a campo

Em grãos de plantas de arroz colhidos em experimento com inoculação das estirpes de *A. brasilense* conduzido a campo, observou-se que o logaritmo do número de bactérias *A. brasilense* e *A. lipoferum*, determinado com o uso da técnica do Número Mais Provável (NMP) variou de 2,3 por grama de massa seca de grãos produzidos por plantas do tratamento controle sem inoculação e com adição de 60 kg.ha⁻¹ de N, a 2,9 por grama de massa seca de grãos do tratamento com inoculação conjunta do rizóbio UFRGS Vp16 com o produto comercial a base de *Azospirillum* e com adição de 120 kg.ha⁻¹ de N e do tratamento com inoculação conjunta do rizóbio UFRGS Lc348 com o produto comercial a base de *Azospirillum* e com adição de 60 kg.ha⁻¹ de N (Figura 7.1).

Os resultados mostram que mesmo nas plantas do tratamento controle sem inoculação observou-se a presença de *Azospirillum* nos grãos de arroz, o que demonstra que já havia uma população deste micro-organismo estabelecida no solo, embora não se possa afirmar que esta população seja formada pelas estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) que foram inoculadas nas plantas cultivadas no experimento a campo.

Os resultados deste trabalho mostram a presença de uma população expressiva de bactérias endofíticas diazotróficas colonizando grãos de arroz. No entanto, o isolamento em meio de cultura NFb permite apenas observar a

presença de células de bactérias diazotróficas endofíticas, mas não a identificação das espécies e/ou estirpes presentes, uma vez que além das espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum*, para as quais o meio NFB semi-sólido é semi-seletivo, também ocorre o crescimento de outros gêneros de bactérias diazotróficas neste meio de cultura (Döbereiner et al., 1995a; Jha et al., 2009). A presença de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* também foi verificada em outros trabalhos com grãos de arroz (Sundaram & Klucas, 1998; Mano & Morisaki, 2008). Usando o meio NFB semi-sólido e grãos de arroz com casca, Verma et al. (2001) obtiveram populações que variaram de 10^5 a 10^6 bactérias diazotróficas por grama de grão de arroz. Já a quantificação de bactérias endofíticas diazotróficas em grãos de arroz sem casca de duas cultivares variou de $6,76 \times 10^2$ a $4,9 \times 10^3$ bactérias por grama de grãos de arroz (Silva et al., 2011).

Tabela 7.1 Log do número mais provável (média \pm desvio padrão) de bactérias diazotróficas, nodulantes de trevo branco e de cornichão por grama de massa seca de grãos de arroz colhidos de plantas inoculadas com bactérias diazotróficas e com aplicação de duas doses de nitrogênio (N).

Bactérias	N (kg.ha ⁻¹)	Controle	UFRGS Vp16	UFRGS Lc348	<i>Azospirillum</i>	<i>Azospirillum</i> + UFRGS Lc348	<i>Azospirillum</i> + UFRGS Vp16
Diazotróficas	60	2,3 \pm 2,1	-	-	2,4 \pm 2,2	2,9 \pm 2,7	2,4 \pm 2,6
	120	2,6 \pm 2,3	-	-	2,9 \pm 2,7	2,5 \pm 2,0	2,7 \pm 2,7
Nodulantes de trevo branco	60	0,7 \pm 0,9	1,3 \pm 1,5	-	-	-	0,8 \pm 1,0
	120	1,0 \pm 1,0	1,1 \pm 1,0	-	-	-	1,2 \pm 0,3
Nodulantes de cornichão	60	0,8 \pm 0,9	-	1,1 \pm 1,3	-	0,3 \pm 0,4	-
	120	1,1 \pm 1,3	-	1,0 \pm 1,2	-	0,3 \pm 0,3	-

Em relação à presença de rizóbios endofíticos em grãos de arroz, observou-se que ocorreu a indução da formação de nódulos nas raízes das plantas de cornichão e trevo branco que receberam a inoculação de alíquotas da suspensão e diluição dos grãos de arroz macerados. Os valores do logaritmo do número mais provável por grama de massa seca de grãos de arroz variaram de 0,8 rizóbios simbiotes de cornichão, nos tratamentos com inoculação combinada do rizóbio UFRGS Lc348 e produto comercial a base de

Azospirillum em plantas que receberam 60 e 120 kg.ha⁻¹ de N, até 1,1 rizóbios simbiotes de cornichão no tratamento controle sem inoculação, também em plantas que receberam 120 kg.ha⁻¹ de N, e no tratamento com inoculação do rizóbio UFRGS Lc348 com 60 kg.ha⁻¹ de N.

O logaritmo do número mais provável de rizóbios simbiotes de trevo branco por grama de massa seca de grãos de arroz variou de 0,7 no tratamento controle sem inoculação e com adição de 60 kg.ha⁻¹ de N até 1,3 no tratamento com inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 com adição de 60 kg.ha⁻¹ de N. De maneira semelhante aos resultados observados na quantificação de bactérias endofíticas diazotróficas, o número de células de rizóbios simbiotes de cornichão e trevo branco presentes nos grãos de arroz também não mostrou alterações devido ao uso de 60 ou 120 kg.ha⁻¹ de N, assim como nos tratamentos com inoculação dos rizóbios isoladamente ou em conjunto com o produto comercial contendo *Azospirillum*.

A quantificação da população de rizóbios presente em grãos de arroz capaz de formar nódulos em plantas de trevo branco e cornichão é um aspecto novo deste trabalho. Do ponto de vista da aplicação biotecnológica, a colonização endofítica e a disseminação de rizóbios via sementes, bem como de bactérias endofíticas diazotróficas, é um aspecto desejável, pois resulta em uma forma simples e econômica de inoculação de plantas em sua segunda geração. A colonização endofítica de grãos de arroz por bactérias e a disseminação em gerações subsequentes destas bactérias foi comprovada em trabalhos realizados no Japão por Okunishi et al. (2005) e Kaga et al. (2009). Mais recentemente, a partir do DNA extraído de sementes de arroz e da análise pela técnica de PCR-DGGE, observou-se que cerca de 45% da comunidade bacteriana das sementes da primeira geração foram encontradas colonizando tecidos internos das plantas da segunda geração (Hardoim et al., 2012), demonstrando que este grupo de bactérias usa estratégias de colonização e disseminação para aproveitar oportunidades ecológicas.

Para a população bacteriana presente em grãos de arroz obtida neste trabalho, tanto de diazotróficos como *Azospirillum* quanto de rizóbios simbiotes de cornichão e trevo branco, a função ou ecologia dentro das plantas de arroz é ainda desconhecida. No entanto, a disseminação destas bactérias em grãos de arroz também pode trazer benefícios às plantas, pois

muitas destas bactérias são promotoras do crescimento vegetal (Klironomos, 2002; Hardoim, 2012), conferindo às plantas de arroz hospedeiras uma vantagem competitiva sobre outras plantas presentes na comunidade (Himler et al, 2011) e inclusive aumentando a produtividade desta cultura (Anandham et al., 2008).

Embora a presença de *Azospirillum* e de rizóbios em grãos de arroz possa ser verificada pela utilização da técnica de NMP, esta técnica não permite a certificação de que tal população de bactérias endofíticas seja formada pelas mesmas estirpes que foram inoculadas nas plantas, ou seja, formada por bactérias autóctones. A presença de bactérias diazotróficas e de rizóbios nos macerados de grãos de arroz de plantas dos tratamentos controle sem inoculação de bactérias nos experimentos a campo, demonstra que tais bactérias estavam presentes no solo das parcelas onde as plantas de arroz foram cultivadas, provavelmente sendo o resultado da colonização endofítica destas bactérias desde o solo, migrando ascendentemente na planta e atingindo os tecidos aéreos. Em função disso, o emprego de técnicas que permitam a individualização ou o reconhecimento das estirpes inoculadas a campo seria de grande utilidade.

A pequena variação nos valores da população bacteriana endofítica em grãos de arroz entre os tratamentos utilizados no experimento a campo demonstra não haver um efeito claro da inoculação das bactérias e das doses de N utilizadas (60 e 120 kg.ha⁻¹ de N) sobre as populações de bactérias diazotróficas. O uso de uma dose maior de N aplicado no solo ou em vasos de cultivo, é geralmente relacionado com uma menor população endofítica diazotrófica localizada em raízes (Röesch et al., 2006; Muthukumarasamy et al., 2007; Mattos et al., 2008; Prakamhang et al., 2009), porém, acredita-se que as populações bacterianas presentes na parte aérea sofram menos os efeitos do N aplicado no solo.

7.3.2 Colonização de plantas de arroz inoculadas com *Azospirillum* e rizóbios contendo o gene *gfp*

A seleção das estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 e dos rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348 transformadas pela inserção do gene *gfp* foi conseguida pela inoculação em meio de cultura Dygs e LM com canamicina e visualização de colônias que apresentavam coloração verde fluorescente em trans-iluminador com filtro de luz no comprimento de onda 490 nm (Figura 7.1). As culturas bacterianas transformadas passaram a ser denominadas de *Azospirillum* Ab-V5gfp e Ab-V6gfp e os rizóbios de VP 16gfp e Lc348gfp.

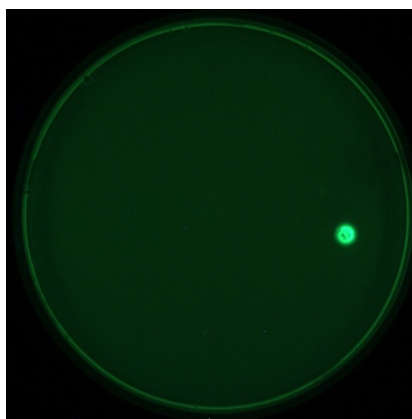


Figura 7.1 Placa de Petry em trans-iluminador com filtro de luz no comprimento de onda 490 nm luz com colônia de *Burkholderia* sp. UFRGS Vp16 transformada expressando a proteína GFP (*green fluorescent protein*).

A coloração verde fluorescente das células de *A. brasilense* Ab-V5gfp e Ab-V6gfp e dos rizóbios Vp16gfp e Lc348gfp, marcados com o gene *gfp*, foi facilmente distinguida da autofluorescência verde emitida pelas células dos fragmentos das plantas de arroz visualizadas na microscopia confocal a laser (Figuras 7.2, 7.3 e 7.4). Estas diferenças facilitaram as observações das interações entre as bactérias e a planta hospedeira.

Na Figura 7.2 B, é mostrada a autofluorescência de fragmento de colmo de plantas de arroz após 10 dias de crescimento no tratamento sem inoculação. Não se verificou a presença de *A. brasilense* Ab-V5gfp e Ab-V6gfp, nem dos rizóbios Vp16gfp e Lc348gfp nos fragmentos do colmo e das folhas das plantas de arroz inoculadas, tanto aos 10 quanto aos 20 dias após a

inoculação (Figura 7.2 B, 7.2 C e 7.2 D). No entanto, estas bactérias foram localizadas colonizando densamente a superfície da zona pilífera da raiz (Figuras 7.3 e 7.4) também foi possível identificar estas bactérias colonizando espaços intercelulares do tecido epidérmico de raízes (Figura 7.4A e 7.4B). As células bacterianas das quatro bactérias marcadas foram localizadas isoladamente ou formando densos agregados de células sobre a zona pilífera das plantas de arroz.

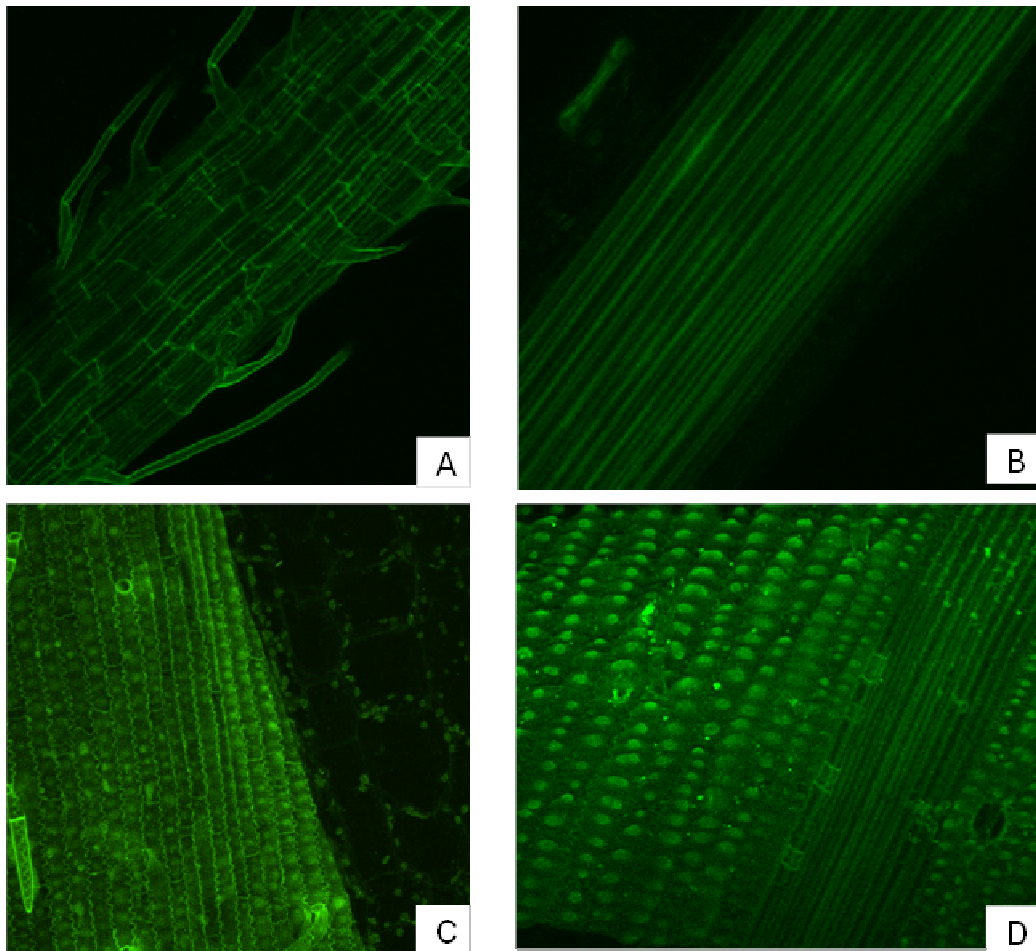


Figura 7.2 Micrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de cortes longitudinais de fragmentos de plantas de arroz. (A) Raiz de planta de arroz do tratamento controle sem inoculação após 10 dias de crescimento. (B) Colmo de planta de arroz, após 10 dias de crescimento, inoculada com *A. brasilense* Ab-V5gfp. (C) Folha de planta de arroz, após 20 dias de crescimento, inoculada com o rizóbio *Burkholderia* sp. Vp16gfp. (D) Colmo de planta de arroz, após 20 dias de crescimento, inoculada com o rizóbio *Mesorhizobium* sp. Lc348gfp.

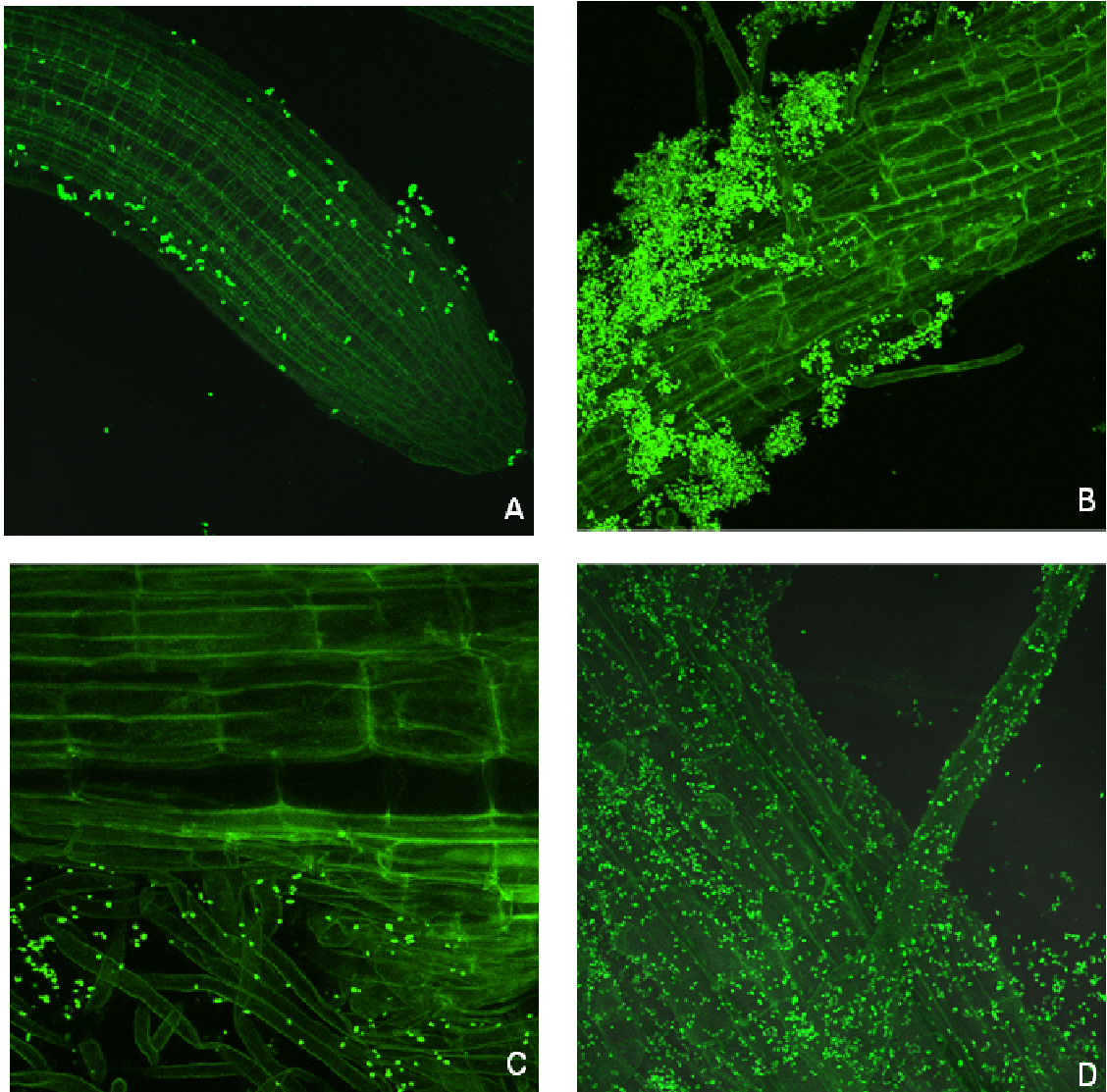


Figura 7.3 Micrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de cortes longitudinais de raízes de plantas de arroz inoculadas. (A) *A. brasilense* Ab-V5gfp colonizando o rizoplano na zona de alongação da raiz de planta de arroz com 10 dias de crescimento. (B) Rizóbio *Burkholderia* sp. Vp16gfp colonizando o rizoplano na zona pilífera de raiz de planta de arroz após 10 dias de crescimento (C) Rizóbio *Mesorhizobium* sp. Lc348gfp e (D) *A. brasilense* Ab-V5gfp colonizando o rizoplano na zona pilífera de raiz de planta de arroz após 20 dias de crescimento.

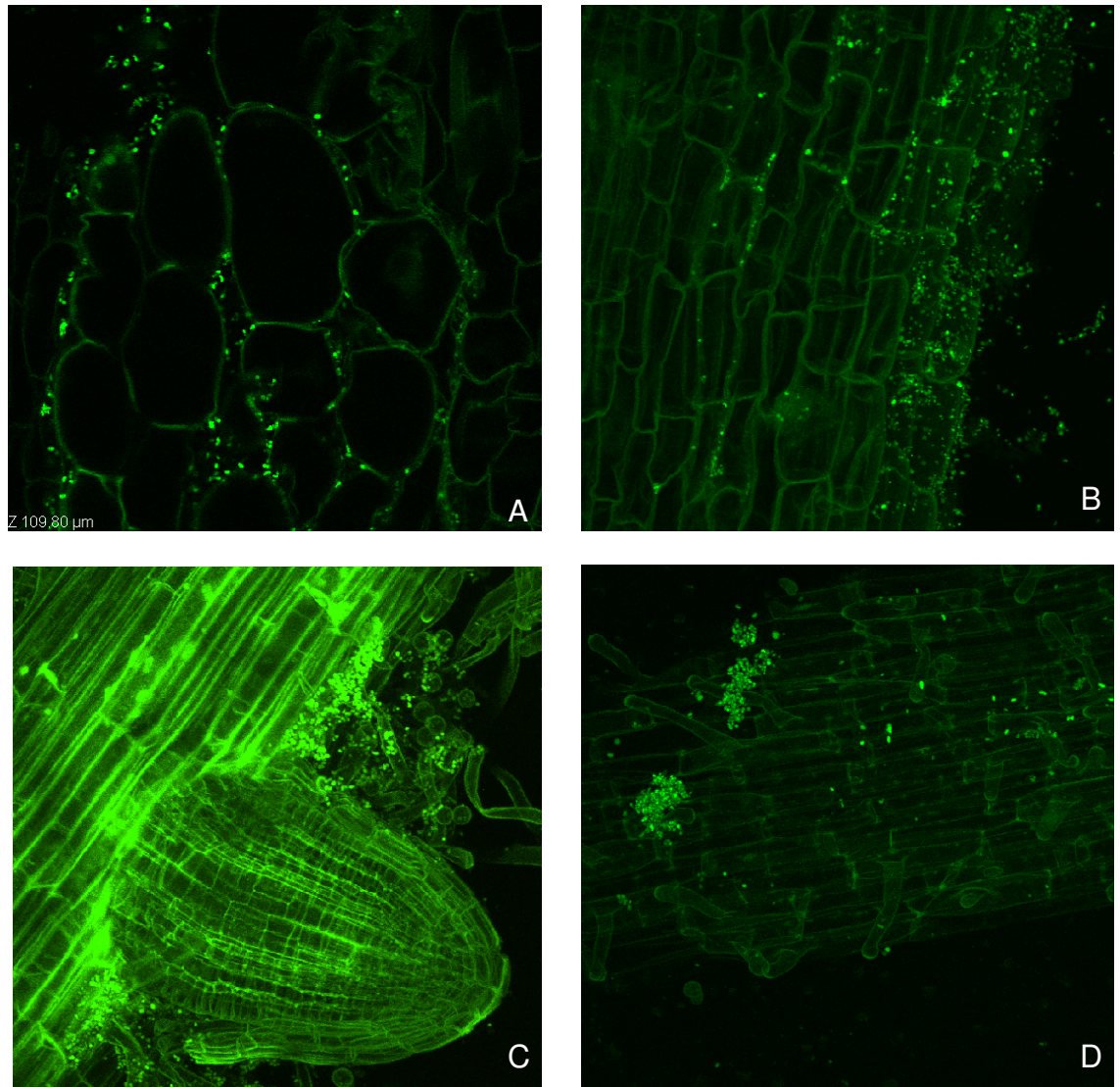


Figura 7.4 Micrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de cortes longitudinais de raízes de plantas de arroz inoculadas. (A) *A. brasilense* Ab-V5gfp e (B) Ab-V6gfp em colonização intercelular da epiderme na zona de ramificação da raiz de planta de arroz após 20 dias de crescimento. (C) colonização pelo rizóbio *Burkholderia* sp. Vp16gfp na zona de emissão de raiz lateral de planta após 20 dias de crescimento. (D) *A. brasilense* Ab-V6gfp colonizando zona pilífera de raiz de planta após 10 dias de crescimento.

Neste estudo, não se detectou a presença das células das estirpes de *A. brasilense* Ab-V5gfp e Ab-V6gfp colonizando tecidos do córtex, xilema e da parte aérea das plantas (colmo e folhas). No entanto, não se pode descartar que a fluorescência emitida pela baixa concentração de células bacterianas nestes tecidos não tenha sido detectada devido à auto-fluorescência dos tecidos das plantas (Figura 7.2A). As bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* têm sido definidas como bactérias endofíticas facultativas

(Döbereiner et al., 1995b), sendo detectada colonizando tanto a superfície radicular como os espaços intercelulares das células epidérmicas de raízes, sem infectar células do córtex, e os tecidos do xilema (Ramos, et al., 2002; Rothballer et al., 2003). No entanto, Chi et al. (2004) detectaram a presença de *A. brasilense* Yu62 inoculado em sementes de arroz e fumo e colonizando densamente colmo e folhas destas plantas.

Além de gênero *Azospirillum*, outros gêneros de bactérias diazotróficas também têm apresentado resultados controversos quanto à capacidade de colonização de tecidos da parte aérea após serem inoculados em sementes. Elbeltagy et al. (2001) mostraram que bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum* marcadas com *gfp* colonizam brotos e sementes de plântulas de arroz selvagem (*Oriza officinalis*) assepticamente cultivado após inoculação das sementes, porém, Zakria et al. (2007) não detectaram a presença de bactérias deste gênero marcadas com *gfp* em tecidos da parte aérea.

A análise de fragmentos de plantas inoculadas com os rizóbios Vp16gfp e Lc348gfp no microscópio confocal não detectou a presença de células destes colonizando os tecidos radiculares mais internos e a parte aérea das plantas de arroz. No entanto, os rizóbios colonizaram densamente o rizoplane das raízes das plantas inoculadas, principalmente na zona pilífera da raiz. Sabe-se que os rizóbios podem ascender sistemicamente à parte aérea de plantas de arroz. Os resultados deste trabalho de avaliação da população de rizóbios em grãos de arroz por NMP confirmaram a presença de rizóbios nos grãos. Em outro trabalho, Chi et al. (2005) identificaram populações que atingiram mais de 9×10^{10} rizóbios inoculados em sementes por cm^3 de tecido da parte aérea e sugeriram que as células bacterianas que disseminam-se 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.

Em estudo com rizóbios marcados, através da inserção do gene *Gus* por conjugação de plasmídeo, Osório Filho (2009) estudou a infecção de rizóbios em plântulas de cornichão (*Lotus corniculatus*), trevo vesiculoso (*Trifolium vesiculosum*) e arroz (*Oryza sativa*) e observou que os rizóbios penetraram nas raízes das leguminosas, concentrando-se apenas nos nódulos

e primórdios nodulares. Nas plantas de arroz, as bactérias colonizaram o tecido radicular e parte aérea, principalmente nas raízes secundárias, no córtex radicular e no tecido vascular das folhas. Também já foi observada a penetração de rizóbios em raízes de arroz com formação de grandes agregados de bactérias entre as células da região de emergência das raízes laterais e no córtex radicular (Webster et al., 1997).

Os resultados deste trabalho indicam que as bactérias estudadas apresentam diferentes padrões de colonização de plantas de arroz, mas também mostram que estas bactérias podem colonizar a raiz das plantas onde podem expressar o potencial para estimular o crescimento dos vegetais.

Os resultados também demonstram que a capacidade para crescer endofiticamente em grãos de arroz poderia ser uma boa forma de aumento da população de rizóbios eficientes na FBN para leguminosas cultivadas em sucessão ao arroz em áreas de cultivo inoculadas com estas bactérias com fins de promoção de crescimento vegetal. Desta forma, aumentos de produção tanto para gramíneas como para leguminosas poderiam ser obtidos com a inoculação, em ambos os cultivos, de rizóbios de dupla função: tanto selecionados para FBN em leguminosas como para promoção de crescimento em gramíneas.

7.4 Conclusões

Os grãos de arroz produzidos por plantas inoculadas em cultivos a campo contem populações bacterianas de rizóbios e diazotróficos do gênero *Azospirillum*.

As estirpes de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 e os rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348 marcados com gene *gfp* colonizam a superfície radicular de plantas de arroz inoculadas, principalmente na zona de emissão de pelos radiculares.

Nas condições do presente estudo, os rizóbios UFRGS Vp16, pertencente ao gênero *Burkholderia* e UFRGS Lc348, pertencente ao gênero *Mesorhizobium*, e as bactérias *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 não colonizaram colmos e folhas de plantas de arroz inoculadas.

7.5 Referências Bibliográficas

ADAMS, P.; KLOEPPER, J. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 240, p. 181-189, 2002.

ANANDHAM, R. et al. Potential plant growth promoting traits and bioacidulation of rock phosphate by thiosulfate oxidizing bacteria isolated from crop plants. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 48, p. 439-447, 2008.

BADRI, D. V.; VIVANCO, J. M. Regulation and function of root exudates. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 32, p. 666–681, 2009.

BAIS, H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 549-579, 2005.

BALDANI, V. L. D. et al. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 65-73, 1992.

BARRAQUIO, W. L.; REVILLA, L.; LADHA, J. K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 15-24, 1997.

BENHAMOU, N. et al. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: Beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 45-56, 2000.

BERINGER, J.E. R factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 84, p. 188-198, 1974.

BHATTACHARJEE, R. B. et al. Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 48, n. 173-182, 2012.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid ADN. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BISWAS, J. C. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, p. 880-886, 2000.

BODDEY, R. M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 195-209, 1995.

BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 69, p. 155-194, 2005.

BROECKLING, C. D. et al. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 74, p. 738-744, 2008.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, Washington, v. 263, p. 802-805, 1994.

CHEN, X. et al. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 2540-2548, 2005.

CHI, F. et al. 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, p. 7271-7278, 2005.

COMPANT, S.; CLEMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 669-678, 2010.

COMPANT, S. et al. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth promoting bacterium *Burkholderia* sp strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1685-1693, 2005.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira, 9º levantamento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_06_05_09_50_17_boletim_safra_-_junho-2012.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2012.

CORMACK, B. P.; VALDIVIA, R. H.; FALKOW. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene**, Amsterdam, v. 173, n. 1, p. 33-38, 1996.

DIAS, A. C. F. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 25, p. 189-195, 2009.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.; REIS, V. M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FRENDRICK, I. et al. (Ed.). **Azospirillum VI and related microorganisms**. Berlin: Springer, 1995. p. 3-14.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60 p.

DONG, Y. M. et al. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1783-1790, 2003.

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 32, p. 227-243, 2011.

DUTTA, S.; MISHRA, A. K.; DILEEP KUMAR, B. S. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 452-461, 2008.

ELBELTAGY, A. et al. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 5285-5293, 2001.

ERRAMPALLI, D. et al. Applications of green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 35, p. 187-199, 1999.

FAURE, D.; VEREECKE, D.; LEVEAU, J. H. J. Molecular communication in the rhizosphere. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 321, p. 279-303, 2009.

GAGE, D. J.; BOBO, T.; LONG, S. R. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfafa (*Medicago sativa*). **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 7159-7166, 1996.

GARG, B.; DOGRA, R.C. SHARMA, P.K. High-efficiency transportation of *Rhizobium leguminosarum* by electroporation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 65, n. 6, p. 2802-2804, 1999.

GOVINDARAJAN, M. et al. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 21-37, 2008.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 895-914, 1997.

HARDOIM, P. R. et al. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 2, e30438, 2012.

HEEB, S.; HAAS, D. Regulatory roles of the GacS/GacA two-compound system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, p. 1351-1363, 2001.

HIMLER, A. G. et al. Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias. **Science**, Washington, v. 332, p. 254-256, 2011.

HOULDEN, A. et al. Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 65, p. 193-201, 2008.

JHA, B. et al. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 45, p. 62-72, 2009.

KAGA, H. et al. Rice seeds as sources of endophytic bacteria. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 24, n. 2, p. 154-162, 2009.

KLIRONOMOS, J. N. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. **Nature**, London, v. 417, p. 67-70, 2002.

KOVACH, M. E. et al. Four new derivatives of the broad-host-range vector PBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, Amsterdam, v. 166, p. 175-176, 1995.

LARCHER, M. et al. Early modifications of *Brassica napus* root system architecture induced by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* strain. **New Phytologist**, Cambridge, v. 160, p. 119-125, 2003.

LOPEZ-LOPEZ, A. et al. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 33, p. 322-327, 2010.

LUCERO, M. et al. A cryptic microbial community persists within micropropagated *Bouteloua eriopoda* (Torr.) Torr. cultures. **Plant Science**, Oxford, v. 174, p. 570-575, 2008.

MANO, H.; MORISAKI, H. Endophytic bacteria in the rice plant. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 23, p. 109-117, 2008.

MANO, H. et al. endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 22, p. 175-185, 2007.

MANO, H. et al. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 21, n. 2, p. 86-100, 2006.

MATTOS, K. A. et al. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant

growth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p. 477-493, 2008.

McCULLY, M. E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 983-990, 2001.

MICALLEF, S. A. et al. Plant age and genotype impact the progression of bacterial community succession in the *Arabidopsis* rhizosphere. **Plant Signaling and Behavior**, Vancouver, v. 4, p. 777-780, 2009.

MOUGEL, C. et al. Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. **New Phytologist**, Cambridge, v. 170, p. 165-175, 2006.

MUTHUKUMARASAMY, R. et al. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, p. 981-991, 2007.

OKUNISHI, S. et al. Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 20, p. 168-177, 2005.

OSÓRIO FILHO, B. D. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. 2009. 113 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PEDRAZA, R. O. et al. Growth promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 26, p. 265-272, 2010.

PRAKAMHANG, J. et al. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 42, p. 141-149, 2009.

PRAYITNO, J. et al. Interactions of rice seedlings with nitrogen-fixing bacteria isolated from rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 26, p. 521-535, 1999.

RAJA, P. et al. Impact of bio inoculants consortium on rice root exudates, biological nitrogen fixation and plant growth. **Journal of Biological Sciences**, Adelaide, v. 6, p. 815-823, 2006.

REINHOLD-HUREK, B. et al. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp, a root-invading diazotroph. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, p. 7056-7065, 1993.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 12, p. 16, 1986.

RODRIGUES, E. P. et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 302, p. 249-261, 2008.

RÖESCH, L. F. W. et al. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 22, p. 967-974, 2006.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. *In situ* localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. **Symbiosis**, Rehovot, v. 34, p. 261-279, 2003.

ROUWS, L. F. M.; HEMERLY, A. S.; BALDANI, J. I. **Transformação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL 5 pela técnica de eletroporação**. Seropédica-RJ: Embrapa Agrobiologia, 2006. 4 p. (Comunicado técnico, 84).

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2222 p. v. 3.

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

SASAKI, K. et al. Impact of plant genotype and nitrogen level on rice growth response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510 under paddy field conditions. **Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 56, p. 636-644, 2010.

SILVA, D. M.; ANTONIOLLI, Z. I; JACQUES, R. J. S. Ocorrência de bactérias diazotróficas em sementes de duas cultivares de arroz irrigado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 17, n. 1-4, p. 158-161, 2011.

SINGH, R.K. et al. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from rice (*Oryza sativa* L.) through rRNA gene PCR-RFLP and sequence analysis. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 345–349, 2006.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J . **Methods in legume - Rhizobium technology**. Hawai: NifTAL, 1985. 367 p.

SOUZA, R. et al. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 360, p. 1-19, 2012.

STEENHOUDT, O.; VANDEREYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and

ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 487-506, 2000.

SUNDARAM, S.; KLUCAS, R. V. Characterization of *Azospirilla* isolated from seeds and roots of turf grass. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 34, p. 1238-1241, 1998.

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**, Amsterdam, v. 91, n. 2-3, p. 127-141, 2001.

WALKER, V. et al. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 189, p. 494-506, 2011.

WEBSTER, G. et al. Interactions of rhizobia with rice and wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 115-122, 1997.

YANNI, Y. G.; DAZZO, F. B. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 336, p. 129-142, 2010.

YANNI, Y. G. et al. 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. et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 845-870, 2001.

ZAKRIA, M. et al. Colonization and nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp strain B501 gfp1 and assessment of its growth-promoting ability in cultivated rice. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 22, p. 197-206, 2007.

8 CONCLUSÕES GERAIS

Nesse trabalho foi avaliada a capacidade de promoção de crescimento vegetal pela inoculação de bactérias diazotróficas e rizóbios simbiotes em leguminosas.

Os rizóbios simbiotes em leguminosas utilizados neste estudo e bactérias diazotróficas associativas apresentaram efeito de promoção de crescimento variável em plantas de híbridos de milho. O conhecimento da interação diferenciada entre plantas e micro-organismos promotores de crescimento torna-se de fundamental importância para que se possa recomendar as melhores combinações entre estirpes de bactérias selecionadas e híbridos de milho para cultivo comercial deste cereal

A inoculação combinada de três isolados de *Azospirillum* aumenta o nitrogênio total na massa seca da parte aérea de híbridos de milho, com equivalência à inoculação dos rizóbios UFRGS Vp16 e da estirpe SEMIA 222. A inoculação da estirpe SEMIA 222 e do rizóbio UFRGS Vp16 eficientes na FBN em trevo branco aumenta a produção de massa seca da parte aérea e de nitrogênio total da massa seca da parte aérea por área em cultivo consorciado com azevém em comparação ao cultivo de azevém exclusivo.

A inoculação combinada dos rizóbios UFRGS Vp16 e Lc348 com um produto comercial contendo *A. brasilense* promove o crescimento das plantas de arroz das cultivares Puitá INTA e IRGA 422CL. Além disso, há aumento da nodulação e a produção de matéria seca da parte aérea de plantas de trevo branco, tanto em cultivo isolado quanto consorciado com azevém com a inoculação da estirpe SEMIA 222 e do rizóbio UFRGS Vp16.

A presença de bactérias diazotróficas endofíticas e bactérias capazes de nodular plantas de cornichão e trevo branco demonstra a transmissão vertical destas bactérias em grãos de arroz. A marcação de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 e os rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS

Lc348 com *gfp* mostrou a colonização da superfície radicular de plantas de arroz inoculadas, principalmente na zona do rizoplane de emissão de pêlos radiculares.

APÊNDICES

APÊNDICE I. Solução Nutritiva (Sarruge, 1975).

Macronutrientes	Estoque (g.L⁻¹)	Solução dos vasos (mL)
KH ₂ PO ₄	136,1	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,4	2
CaCl ₂	111,1	5
KCl	74,6	5
NH ₄ NO ₃	80	1
Fe EDTA	1M	10
Micronutrientes		
H ₃ BO ₃	2,86	1
ZnCl ₂	0,10	1
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,04	1
Na ₂ Mo ₄ · 4H ₂ O	0,02	1

Obs.: O nitrogênio é adicionado usando-se uma solução de 20 g de NH₄NO₃ por litro. O componente CuCl₂ foi substituído por CuSO₄ · 5H₂O, preservando-se a proporção do elemento Cobre. Componentes com Potássio devem ser adicionados por último, para evitar precipitação. O pH da solução foi ajustado em torno de 6,0. Para elaboração de meio semissólido, acrescentar 7 g de ágar por litro de meio.

APÊNDICE II. Meio extrato de levedura-manitol LM (Vincent, 1970).

Manitol.....	10,0 g
K ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2 g
NaCl.....	0,1 g
Extrato de levedura.....	0,5 g
Água destilada.....	1000 mL

Obs.: Para elaboração de meio sólido, acrescentar 15 g de ágar por litro de meio. Ajustar pH para 6,8.

* Para formular o meio extrato de levedura-manitol-vermelho congo (LMV), adicionar 10 mL de vermelho congo (solução de 250 mg de vermelho congo em 100 mL de água destilada) em 1 L de meio LM.

APÊNDICE III. Meio Dygs (Rodrigues Neto et al., 1986).

Glicose	2,0 g
Ácido málico.....	2,0 g
Peptona bacteriológica.....	1,5 g
Extrato de levedura.....	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5 g
Ácido glutâmico	1,5 g
Água destilada.....	1000 mL

Obs.: Ajustar pH para 6,5.

APÊNDICE IV. Meio Nfb (Döbereiner et al., 1995).

Ácido málico.....	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2 g
NaCl.....	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,02 g
Solução de micronutrientes.....	2 mL
Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH.....	2 mL
Solução de EDTA de Ferro (solução 1,64%)	4 mL
Solução de Vitamina para Meio de Cultura.....	1 mL
Hidróxido de Potássio.....	4,5 g
Água destilada.....	1000 mL

Obs.: Ajustar pH para 6,8.

Solução de Micronutrientes

CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,04 g L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	1,2 g L ⁻¹
H ₃ BO ₃	1,4 g L ⁻¹
NaCl.....	1,2 g L ⁻¹
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O.....	1,0 g L ⁻¹
MnSO ₄ .2H ₂ O	1,175 g L ⁻¹

Solução de Vitaminas

Biotina	10 mg 100 mL ⁻¹
Pirridoxol – HCl.....	20 mg

APÊNDICE V. Meio LB (Luria-Bertani) Sambrook e Russel (2001)

Triptona.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
CaCl ₂ · H ₂ O.....	0,87g
Água destilada.....	1000 mL

Obs.: Ajustar pH para 6,8.

APÊNDICE VI. Meio extrato de levedura-triptona (TY) – (Somasegaram e Hoben, 1994).

Triptona.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
CaCl ₂ · H ₂ O.....	0,87g
Água destilada.....	1000 mL

Obs.: Ajustar pH para 6,8.

RESUMO BIOGRÁFICO

Leandro Hahn, filho de Roque e Lúcia Hahn, nasceu em 21 de agosto de 1979, na cidade de Itapiranga, no Estado de Santa Catarina. Completou o Ensino Fundamental e Médio na Escola de Educação Básica São José. Em 1997 ingressou na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina, onde se graduou como Engenheiro Agrônomo em 2002 e Mestre em Agroecossistemas em 2004. Entre 2004 e 2010 exerceu a Coordenação do Curso e atuou como Professor no Curso de Agronomia da FAI Faculdade de Itapiranga. Em março de 2009 iniciou seus estudos de Doutorado no Programa em Ciência do Solo no Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Casou-se com Ivanete Schneider Hahn em abril de 2006. Atualmente é Professor do Curso de Agronomia e Tecnologia em Alimentos da FAI Faculdade de Itapiranga.