

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

**INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS  
DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE ARROZ, MILHO E TRIGO**

**Franciane Lemes dos Santos  
(Tese de Doutorado)**

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

**INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS  
DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE ARROZ, MILHO E TRIGO**

FRANCIANE LEMES DOS SANTOS  
Engenheira Agrônoma (UEMS)  
Mestre em Produção Vegetal (UFG)

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

Porto Alegre (RS) Brasil  
Março de 2018

#### CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Franciane Lemes dos  
INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS  
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE ARROZ, MILHO  
E TRIGO / Franciane Lemes dos Santos. -- 2018.  
95 f.  
Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, BR-RS,  
2018.

1. Azospirillum sp. . 2. poáceas. 3. produção de  
grãos. 4. promoção de crescimento. 5. rizóbios. I. Sá,  
Enilson Luiz Saccol de, orient. II. Título.

*“Eu não poderia imaginar as coisas que me aconteceriam. O início foi incerto, confuso e incomum, onde todos os estranhos fariam parte da minha vida, onde todos os cantos teriam histórias escondidas. Fiz amigos, muitos dos quais, me acompanharão para sempre. Esse é um momento especial! É hora de olhar para trás e ver por tudo o que já passei. Sem dúvida, muitas tristezas e conflitos, mas felizmente, por inúmeros bons momentos, de alegria, de vitórias e de cumplicidade. Devo esquecer aqueles que me impuseram obstáculos infundados, e agradecer àqueles que me impulsionaram adiante. É hora, mais do que nunca, de valorizar as amizades e os conhecimentos adquiridos aqui. Pois, se nada tenho, por tudo lutei; e sem me arrepender de nada...No futuro poderei dizer: Tentei!...E, mesmo que a fortuna venha a mim; Por tudo que Deus me deu, direi a todos: **venci!**”*

(Autor desconhecido)

*Aos meus pais, Francisco e Fátima, que me ensinaram os verdadeiros valores da vida, e à minha irmã Ravena, pelo carinho e apoio, sendo essenciais no cumprimento desta jornada, dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao nosso Pai criador, que meu deu o dom da vida, por ter me iluminado e dado força para concluir esta etapa.

Ao Programa de Pós-Graduação (PPG) em Ciência do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela oportunidade de realização do curso de doutorado, infraestrutura oferecida e conhecimento transmitido.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento de bolsa de estudo durante o doutorado.

Ao meu orientador, professor Enilson Luiz Saccol de Sá, por ter me acolhido, e acreditando no meu trabalho, deu-me a liberdade necessária, me auxiliando com idéias enriquecedoras do início ao final desta etapa. Obrigada pela dedicação e paciência comigo durante este período em que convivemos. Meu respeito, admiração e carinho.

Aos professores do PPG Ciência do Solo e demais programas, onde cursei disciplinas, por terem transmitido os seus conhecimentos.

Aos funcionários do Departamento de Solos e Estação Agronômica da UFRGS, em especial, ao Jader Amaro e ao José Ferreira (Seu Zé), sempre muito prestativos.

Ao PPG em Fitotecnia, Departamento de Plantas de Lavoura e ao Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), por cederem as áreas para condução dos experimentos.

Ao professor Christian Bredemeier, pela parceria científica, pelos inúmeros ensinamentos durante a condução dos experimentos e pela amizade.

Aos meus pais Francisco e Fátima que no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de extenso amor e carinho, os conhecimentos de integridade, de perseverança e de procurar sempre em Deus à força maior para o desenvolvimento como ser humano. A vocês minha imensa gratidão e sempre amor.

A minha querida “maninha” Ravena que esteve sempre ao meu lado, sendo seu apoio irrestrito em todos os momentos, se privando de muitas coisas em sua vida para eu alcançar meu objetivo. Muito obrigada Rá.

Ao André, pela ajuda no campo, no laboratório e nos estudos, além do companheirismo nos momentos bons e principalmente nos ruins. Obrigada pelo amor, apoio, paciência e incentivo em todos os momentos.

A minha família, que nos momentos de minha ausência dedicados aos estudos, sempre fizeram entender que o futuro, é feito a partir da constante dedicação no presente. Meus agradecimentos com imenso carinho.

Aos colegas da UFRGS e do PPG Ciência do Solo, pela convivência, ajudas, amizades e confraternizações durante o doutorado.

Aos colegas de laboratório, pelo companheirismo, amizade, risadas, auxílios e paciência, em especial: Bruna Winck, Carolina Castilho, Clarissa Borges, Franquiéle Bonilha, Gleidson Rieff, Juan Cubillos, Marcia Orantas, Marcio Silveira, Priscila De Gregório, Renata Bataioli, Tais Backes e Victor Bassani. Obrigada por todos os momentos, as lembranças deste período levarei comigo por toda vida.

Aos membros da banca, pela participação e colaboração neste trabalho.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta etapa e para minha formação profissional. Obrigada!

# INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE ARROZ, MILHO E TRIGO<sup>1</sup>

Autor: Franciane Lemes dos Santos

Orientador: Prof. Enilson Luiz Saccol de Sá

## RESUMO

A utilização das técnicas de inoculação e coinoculação de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) pode ser uma alternativa com grande potencial para o mercado agrícola, visando uma maior eficiência no uso de fertilizantes e conseqüentemente redução do impacto ambiental. Os rizóbios também apresentam capacidade para a promoção do crescimento de poáceas, grupo de plantas no qual essas bactérias não realizam a fixação simbiótica de nitrogênio. Nesse contexto, a principal hipótese do trabalho é que o desenvolvimento de poáceas é beneficiado quando as plantas são inoculadas com RPCPs. O objetivo geral deste trabalho foi verificar a capacidade de rizóbios em promover o crescimento dos cereais: arroz, milho e trigo, inoculados isoladamente e coinoculados com *Azospirillum brasilense*. Os experimentos foram realizados a campo e em casa de vegetação, com plantas de arroz, milho e trigo, inoculadas e coinoculadas com os rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348, e *A. brasilense*, e sob níveis de doses de nitrogênio recomendadas para cada espécie vegetal. A inoculação de rizóbios, isoladamente ou em coinoculação com *A. brasilense* promove aumentos de produção de grãos de milho híbrido (Morgan 30A77PW) em manejo sequeiro e irrigado. Em áreas de pousio a coinoculação do rizóbio UFRGS Lc348+*A. brasilense* mantém o rendimento de grãos de arroz (cultivar IRGA 424), com 60% da dose nitrogênio recomendada. Já em safras com inoculações sucessivas na área de plantio, todos os tratamentos com RPCPs e 60% da dose de nitrogênio, mantém o rendimento de grãos. Em plantas de trigo (cultivares TBIO Sossego e BRS Parrudo), a inoculação e coinoculação aumentam o rendimento de grãos. A cinética de absorção de nitrogênio em plantas de milho híbrido (Morgan 30A77PW) é modificada pela inoculação com rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348 tanto de forma isolada, ou coinoculada com *A. brasilense*.

---

<sup>1</sup> Tese de doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (83 p.). Março, 2018. Trabalho realizado com apoio financeiro da Capes e do CNPq.

# INOCULATION AND COINOCULATION OF GROWTH PROMOTING RIZOBACTERIA IN RICE, MAIZE AND WHEAT PLANTS<sup>2</sup>

Author: Franciane Lemes dos Santos

Adviser: Enilson Luiz Saccol de Sá

## ABSTRACT

The use of inoculation and coinoculation techniques of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) can be an alternative with great potential for the agricultural market, aiming at a greater efficiency in the use of fertilizers and consequently reduction of environmental impact. Rhizobia also have the capacity to promote the growth of grasses, a group of plants in which these bacteria do not perform symbiotic nitrogen fixation. In this context, the main hypothesis of the work is that the development of grasses benefits when the plants are inoculated with PGPR. The general objective of this work was to verify the rhizobia of capacity to promote cereal growth: rice, maize and wheat, inoculated in isolation and coinoculated with *Azospirillum brasilense*. The experiments were carried out in the field and in a greenhouse with rice, maize and wheat plants, inoculated and coinoculated with the rhizobia UFRGS Vp16 and UFRGS Lc348, and *A. brasilense*, and under levels of nitrogen rates recommended for each plant species. The inoculation of rhizobia, alone or in combination with *A. brasilense*, promotes hybrid maize grain yield increases (Morgan 30A77PW) in dry and irrigated management. In fallow areas the coinoculation of the rhizobia UFRGS Lc348 + *A. brasilense* maintains the yield of rice grains (cultivar IRGA 424), with 60% of the recommended nitrogen dose. In crops with successive inoculations in the plantation area, all the treatments with PGPR and 60% of the nitrogen dose, maintain the yield of grains. In wheat plants (cultivars TBIO Sossego and BRS Parrudo), inoculation and coinoculation increase the yield of grains. Nitrogen uptake kinetics in hybrid maize plants (Morgan 30A77PW) is modified by inoculation with rhizobia UFRGS Vp16 and UFRGS Lc348 either in an isolated form, or coinoculated with *A. brasilense*.

---

<sup>2</sup> Doctoral thesis in Soil Science – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (83 p.). March, 2018. Research supported by CNPq and CAPES.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) .....	3
2.2. Rizóbios como organismos promotores de crescimento de plantas.....	6
2.3. Azospirillum como organismos promotores de crescimento de plantas ...	8
2.4. Inoculação em lavouras de arroz .....	9
2.5. Inoculação em lavouras de milho .....	11
2.6. Inoculação em lavouras de trigo.....	12
2.7. Inoculação e coinoculação de RPCPs.....	13
<b>3. CAPÍTULO II – Desempenho agrônômico de plantas de milho inoculadas e coinoculadas com rizobactérias promotoras de crescimento</b> .....	16
<b>4. CAPÍTULO III – Inoculação e coinoculação de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas de arroz irrigado</b> .....	26
<b>5. CAPÍTULO IV – Potencial de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas no cultivo de trigo</b> .....	35
<b>6. CAPÍTULO V – Cinética de absorção de nitrogênio em plantas de milho inoculadas e coinoculadas com rizobactérias promotoras de crescimento</b> .....	45
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	58
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	60
<b>9. APÊNDICES</b> .....	82
<b>10. RESUMO BIOGRÁFICO</b> .....	83

## RELAÇÃO DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Componentes de rendimento (número de espigas, produção de grãos por espiga e peso de 100 grãos) de plantas de milho inoculadas com rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348, e <i>A. brasilense</i> nas safras 2015/2016 sob manejo sequeiro e safra 2016/2017 sob manejo irrigado.....	21
<b>Tabela 2.</b> Rendimento de grãos de milho ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) em função de inoculação e coinoculação rizóbios e <i>Azospirillum</i> nas safras 2015/2016 sob manejo sequeiro e safra 2016/2017 sob manejo irrigado.....	22
<b>Tabela 3.</b> Identificação e descrição dos tratamentos.....	28
<b>Tabela 4.</b> Componentes de rendimento (número de panículas/ $\text{m}^2$ , número de grãos/panícula e peso de 1000 grãos) de plantas de arroz inoculadas e coinoculadas com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, safras 2014/15 e 2015/16.....	30
<b>Tabela 5.</b> Componentes de rendimento (matéria seca da parte aérea, número de espigas por metro quadrado, peso hectolítrico e peso de 1000 grãos) de plantas de trigo inoculadas e coinoculadas com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas.....	40
<b>Tabela 6.</b> Rendimento de grãos de trigo em função de inoculação e coinoculação com rizóbios e <i>Azospirillum brasilense</i> .....	42
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros cinéticos de absorção ( $K_m$ e $V_{max}$ ) de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) em plantas de milho submetidas à dose de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrogênio.....	49
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros cinéticos de absorção ( $K_m$ e $V_{max}$ ) de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) em plantas de milho submetidas à dose de $1 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrogênio.....	50

<b>Tabela 9.</b> Parâmetros cinéticos de absorção ( $K_m$ e $V_{max}$ ) de nitrato ( $NO_3^-$ ) em plantas de milho submetidas à dose de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrogênio.....	50
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros cinéticos de absorção ( $K_m$ e $V_{max}$ ) de nitrato ( $NO_3^-$ ) em plantas de milho submetidas à dose de $1 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrogênio.....	51
<b>Tabela 11.</b> Equações de regressão dos tratamentos inoculados e coinoculados com rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348, e Azospirillum brasilense para a concentração de $NH_4^+$ e $NO_3^-$ em solução nutritiva Sarruge.....	53

## RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1.** Eficiência relativa da inoculação e coinoculação dos rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348, e *A. brasilense* no rendimento de grãos de plantas de milho.....23
- Figura 2.** Rendimento de grãos de plantas de arroz inoculadas e coinoculadas com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, safras 2014/15 e 2015/16. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (p. 0,15, Scott-Knott). Letras maiúsculas safra 2014/15, letras minúsculas safra 2015/16.....32
- Figura 3.** Eficiência relativa da inoculação e coinoculação dos rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348, e *A. brasilense* no rendimento de grãos de plantas de arroz.....33
- Figura 4.** Eficiência relativa da inoculação e coinoculação dos rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348, e *A. brasilense* no rendimento de grãos de plantas de trigo.....43
- Figura 5.** Concentração de  $\text{NH}_4^+$  em solução nutritiva Sarruge com cultivo de plantas de milho inoculadas com rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348, e *Azospirillum brasilense*, em doses de 1mmol L<sup>-1</sup> (N) e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> (N/2) de nitrogênio.....54
- Figura 6.** Concentração de  $\text{NH}_4^+$  em solução nutritiva Sarruge com cultivo de plantas de milho coinoculadas com rizóbios UFRGS Vp16+*Azospirillum brasilense* e UFRGS Lc348+*Azospirillum brasilense*, em doses de 1mmol L<sup>-1</sup> (N) e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> (N/2) de nitrogênio.....55
- Figura 7.** Concentração de  $\text{NO}_3^-$  em solução nutritiva Sarruge com cultivo de plantas de milho inoculadas com rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348, e

Azospirillum brasilense, em doses de  $1\text{mmol L}^{-1}$  (N) e  $0,5\text{ mmol L}^{-1}$  (N/2) de nitrogênio.....55

**Figura 8.** Concentração de  $\text{NO}_3^-$  em solução nutritiva Sarruge com cultivo de plantas de milho coinoculadas com rizóbios UFRGS Vp16+Azospirillum brasilense e UFRGS Lc348+Azospirillum brasilense, em doses de  $1\text{mmol L}^{-1}$  (N) e  $0,5\text{ mmol L}^{-1}$  (N/2) de nitrogênio.....56

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O setor agrícola é uma das atividades socioeconômica mais importante do nosso país. Nos últimos anos, o Brasil se consolidou como um dos maiores produtores e exportadores mundiais de alimentos, com área plantada de 60 milhões de hectares, sendo que desses, 22 milhões estão na região sul (CONAB, 2017). O estado do Rio Grande do Sul se destaca nesta região, pois é o terceiro maior produtor nacional de grãos (15,3%). Este resultado se dá pela combinação de fatores como clima propício, investimento em tecnologia e extensão territorial cultivável.

Entretanto, a produtividade das lavouras do estado é comprometida pelas características nutricionais desfavoráveis do solo, especialmente as limitações nos teores de nitrogênio. A utilização em excesso de adubos nitrogenados para suprir esta carência nutricional é uma prática bastante disseminada em áreas agrícolas. Esta prática torna o adubo nitrogenado um dos mais consumidos no mundo e o que mais influencia no custo de produção de um cultivo.

Uma alternativa sustentável para o mercado agrícola, visando à redução do uso de fertilizantes e, conseqüentemente, o custo de produção, é a utilização de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs). Estas bactérias já são bastante estudadas no processo de fixação simbiótica de nitrogênio em leguminosas, que é uma das mais importantes formas de promoção de crescimento de plantas induzido por bactérias. No entanto, pouco se tem estudado sobre o potencial dos rizóbios para a promoção do crescimento de poáceas, grupo de plantas no qual essas bactérias não realizam a fixação biológica de nitrogênio, mas podem estimular o crescimento vegetal por diversos outros mecanismos, como produção de substâncias fitorreguladoras, aumento da disponibilidade de fósforo e biocontrole de fitopatógenos.

Neste sentido, se faz importante o estudo da utilização de rizóbios na forma de inoculantes biológicos para poáceas, pois pode ser uma das tecnologias mais eficientes em substituir métodos tradicionais de adubação nitrogenada no mercado agrícola, levando às hipóteses que: o desenvolvimento de plantas de arroz, milho e trigo é beneficiado quando as plantas são inoculadas com bactérias promotoras de crescimento, e a inoculação de plantas de arroz, milho e trigo com bactérias promotoras de crescimento possibilita a redução da dose de fertilizante nitrogenado, mantendo os níveis de produtividade.

Assim, o trabalho tem como objetivo geral avaliar a capacidade de rizóbios em promover o crescimento dos cereais arroz, milho e trigo. Como objetivos específicos: (a) avaliar a interação entre adubação nitrogenada e a promoção de crescimento por rizóbios em plantas de arroz, milho e trigo; (b) avaliar a eficiência da inoculação e coinoculação de rizóbios e bactérias diazotróficas endofíticas, na promoção de crescimento de plantas de arroz, milho e trigo; (c) avaliar a cinética de absorção de nitrogênio em plantas de milho inoculadas e coinoculadas com rizóbios e bactérias diazotróficas endofíticas.

## **2. CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs)**

A rizosfera é um ambiente edáfico conhecido por hospedar uma ampla variedade de bactérias. Várias destas bactérias não só colonizam a rizosfera e o rizoplane, mas também podem penetrar nas plantas, colonizando os tecidos internos do vegetal, estabelecendo assim, associações benéficas e desempenhando importante papel na manutenção e/ou incremento do crescimento vegetal, quer seja em ecossistemas naturais ou manejados (Compant et al., 2010), podendo ser utilizadas para a promoção de crescimento plantas (Hallmann, 2001; Compant et al., 2005; Sessitsch et al., 2004; Hallmann & Berg, 2006) para melhoria da produção agrícola.

O termo rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) foi proposto por Kloepper e Schroth (1978) e provém da expressão “plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)”, que é aceita pela comunidade científica internacional para expressão que designa esse grupo. As RPCPs foram submetidas a inúmeros estudos focados em aplicações biotecnológicas na agricultura, horticultura, silvicultura e proteção ambiental (Zahir et al., 2004). Estudos iniciais na década de 1950 começaram com foco em bactérias fixadoras de nitrogênio. Desde então, um grande número de RPCPs pertencentes a diferentes classes e gêneros foram descritos (Rodriguez-Diaz et al., 2008).

O modo de ação das RPCPs ainda não é plenamente conhecido, mas pode ser de forma direta: estimulando a fixação de nitrogênio, solubilizando nutrientes (principalmente ferro, enxofre e fosfatos inorgânicos e



insolúveis), produzindo fitohormônios (ácido indol acético (AIA), giberelinas e citocininas) e exopolissacarídeos (Cattelan, 1999; Dobbelaere et al., 2003; Hara & Oliveira, 2004; Han et al., 2005; Banerjee et al., 2006; Marra et al., 2011; Ahemad & Kibret, 2014); e também de forma indireta: reduzindo os danos causados por fitopatógenos por mecanismos tais como produção de sideróforos, quitinases, glucanases e antibióticos (Renwick et al., 1991). As RPCPs podem usar mais do que um destes mecanismos simultaneamente para aumentar o crescimento vegetal (Hahn, 2013).

Em geral, mecanismos diretos são aqueles que afetam o equilíbrio dos reguladores de crescimento da planta, aumentando o estado nutricional da planta e estimulando mecanismos de resistência sistêmica (Zahir et al, 2004; Glick et al., 2007). Estes mecanismos levaram à aplicação de termos genéricos para as RPCPs, incluindo: biofertilizante, fitoestimulador e biopesticida (Okon & Kapulnik, 1986; Spaepen et al., 2007; Martínez-Viveros et al, 2010). Os mecanismos indiretos estão relacionados ao controle biológico, incluindo a produção de antibióticos, a quelação do Fe disponível na rizosfera, a síntese de enzimas extracelulares que hidrolizam a parede celular fúngica e a competição por nichos dentro da rizosfera (Zahir et al, 2004; Glick et al, 2007).

Além de realizarem a fixação biológica de nitrogênio (FBN), algumas rizobactérias exercem papel importante na solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis. A utilização de RPCPs capazes de fixar nitrogênio e solubilizar fosfato inorgânico aumenta a disponibilidade desses nutrientes para o crescimento de plantas leguminosas e não leguminosas (Peix et al., 2001; Vessey et al., 2003), substituindo ou diminuindo a utilização de fertilizantes nitrogenados e fosfatados (Oliveira, 2011; Marra et al., 2012).

Depois da FBN, a produção de hormônios vegetais é considerada o mais importante modo de ação na promoção de crescimento de plantas por rizobactérias (Osório Filho, 2009). Estes fitohormônios exercem diversas funções no ciclo de vida dos vegetais, entre elas o desenvolvimento de meristemas apicais, estímulo da divisão e crescimento celular, crescimento de raízes, aumento do número de pelos radiculares, além de estimular a germinação (Tsavkelova et al., 2007; Quiala et al., 2012; Ruedell et al., 2013 ).

As substâncias fito estimuladoras produzidas por RPCPs mais estudadas são os hormônios pertencentes ao grupo das auxinas, particularmente o ácido indol-acético (AIA) (Hayat et al., 2010). As RPCPs sintetizam o AIA, promovendo, assim, o crescimento das raízes e a proliferação de pelos radiculares, melhorando a absorção de água e nutrientes do solo e, conseqüentemente, melhorando o desenvolvimento da planta (Caballero-Mellado et al., 2006; Taiz & Zeiger, 2013 ).

Existem outros grupos de hormônios de crescimento vegetal produzidos por rizobactérias, como as giberelinas e citocininas, que também podem influenciar o crescimento e o desenvolvimento das plantas. As giberelinas estão relacionadas ao alongamento do caule e folhas, germinação de sementes e retardamento do envelhecimento dos tecidos vegetais (Davies, 1995; Aoyama et al., 1996; Jaleel et al., 2007); já as citocininas são relatadas como indutoras da divisão celular, desenvolvimento parte aérea e radicular, e formação de pêlos radiculares (Frankenberger & Arshad, 1995; Moura et al., 2012).

Outra forma de promoção de crescimento vegetal que está diretamente ligada as RPCPs é a produção de exopolissacarídeos. Os rizóbios sintetizam polissacarídeos e excretam polímeros solúveis ou insolúveis, para fora das células (Seesuriyachan et al., 2012). Estes exopolissacarídeos produzidos pelas RPCPs interagem com as plantas, auxiliando na sobrevivência do vegetal, permitindo adaptação a várias situações de estresses ambientais como o salino, variações de temperatura e estresse hídrico (Silva, 2014). Os exopolissacarídeos possibilitam vida livre à bactéria, permitindo a aderência e colonização às superfícies sólidas onde os nutrientes se acumulam, além de que, estas substâncias envolvem as membranas das células protegendo-as do dessecamento e de outros estresses ambientais, além de ajudar na fixação de nutrientes próximos à bactéria (Flemming et al., 2010; Barreto et al., 2011; Liu et al., 2013).

Do ponto de vista biotecnológico, as rizobactérias que possuem mais de um dos mecanismos para a promoção de crescimento vegetal são almeçadas e rastreadas para uma possível aplicação no campo, objetivando o

aumento da produção agrícola (Verma et al., 2001), de forma mais econômica e sustentável.

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

Os rizóbios são considerados o principal grupo de diazotróficos simbióticos, por sua importância agrônômica na fixação de nitrogênio (Stroschein, 2007; Graças et al., 2015). Estes microrganismos são bactérias gram negativas, aeróbicas não esporulantes, pertencentes ao filo *Proteobacteria* (Zakhia & Laujudie, 2001). Quando não estão em associação com plantas, os rizóbios são bactérias de vida livre e hábito alimentar saprofítico.

A classificação dos rizóbios esteve em constante alteração nos últimos anos. Atualmente, são conhecidas mais de 100 espécies distribuídas em 16 gêneros, dentre eles: *Rhizobium*, *Mezorhizobium*, *Ensifer* (anteriormente *Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrhobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Shinella*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium* (Classe de  $\alpha$ -proteobactérias), *Burkholderia*, *Paraburkholderia* (anteriormente *Burkholderia*) *Cupriavidus* (anteriormente *Ralstonia*) (Classe de  $\beta$ -proteobactérias) (Velázquez et al., 2017).

Estas bactérias realizam simbiose com as plantas da família Leguminosae, que se caracteriza pela formação de estruturas hipertróficas nas raízes e, excepcionalmente, no caule, denominadas nódulos. Essa capacidade de fixar nitrogênio biologicamente ocorre devido ao complexo enzimático nitrogenase, que são capazes de romper a tripla ligação do  $N_2$  atmosférico reduzindo-o a amônia ( $NH_3^+$ ), uma forma prontamente assimilável pela planta (Cantarella, 2007; Berrada & Fikribenbrahim, 2014; Mus et al., 2016).

As vantagens da simbiose entre os rizóbios e as leguminosas são várias, incluindo maior produtividade agrícola, manutenção e restauração da fertilidade do solo, economia de fertilizantes com preços altos e diminuição da

poluição de águas subterrâneas por nitratos, sendo, portanto, uma significativa função ecológica e econômica (Lyra et al., 2013; Cavalcante et al., 2016).

Em virtude da rápida colonização dessas bactérias na rizosfera e estimulação no crescimento da planta, existe considerável interesse em pesquisar o potencial biotecnológico dos rizóbios, visando otimizar a produção da cultura de interesse, seja ela leguminosa ou poácea.

A colonização de rizóbios em poáceas ocorre diferentemente do que em leguminosas (Reddy et al, 1997; Webster et al., 1997; Yanni et al., 1997; Chi et al., 2005). As bactérias colonizam as raízes, caules e folhas da poácea, penetrando no interior do tecido vegetal através de fissuras radiculares ou nas inserções das raízes secundárias (Reddy et al., 1997; Dobbelaere et al., 2003), sem causar sintomas de doenças e estimulando o crescimento destes vegetais através de mecanismos diretos e indiretos já citados.

Na interação rizóbio e poáceas não há formação de nódulos, não ocorrendo, assim, a FBN. No entanto, a inoculação com rizóbios estimula a germinação de sementes, o crescimento e o desenvolvimento de plantas não leguminosas (Chi et al., 2005, Singh et al., 2006; Yanni et al., 2001). Em estudos a campo, Panwar & Singh (2000) observaram que as RPCPs podem aumentar o teor de N e P nos tecidos das plantas, e atribuíram o fato a um maior crescimento das raízes, estimulado provavelmente pelos microrganismos.

Vários trabalhos demonstram a eficiência da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento de poáceas, como em arroz (Yanni et al., 1997; Biswas et al., 2000; Osório Filho et al., 2014), cevada (Miransari & Smith, 2009), milho (Hahn et al., 2014), capim Tanzânia e pensacola (Machado et al., 2011), milho e sorgo (Machado, 2015). No entanto, a tecnologia de inoculação de rizóbios em poáceas ainda é subaproveitada no Brasil, e está longe de ter todo o seu potencial utilizado pelo setor agropecuário nacional.

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

O gênero *Azospirillum* contempla rizobactérias associativas e que se encaixam no grupo dos diazotróficos endofíticos facultativos (Döbereiner & Baldani, 1982), uma vez que tem a capacidade de colonizar tanto o interior das plantas quanto a rizosfera. Estes micro-organismos são bactérias gram negativas, aeróbicas, não fermentativas, vibróides, pertencentes ao filo Proteobactéria (Reis et al., 2007), com capacidade de interagir com uma ampla variedade de plantas, principalmente as da família *Poaceae* (poáceas) de importância agrícola e econômica (Povineli, 2012).

Atualmente, o gênero *Azospirillum* possui quinze espécies identificadas: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (Tarrand et al., 1978); *A. amazonense* (Magalhães et al., 1983); *A. halopraeferens* (Reinhold et al., 1987); *A. irakense* (Khammas et al., 1989); *A. largomobile* (Dekhil et al., 1997); *A. doebereineriae* (Eckert et al., 2001); *A. oryzae* (Xie & Yokota, 2005); *A. melinis* (Peng et al., 2006); *A. canadense* (Mehnaz et al., 2007a); *A. zae* (Mehnaz et al., 2007b); *A. rugosum* (Young et al., 2008); *A. palatum* (Zhou et al., 2009); *A. picis* (Lin et al., 2009) e *A. thiophilum* (Lavrinenko et al., 2010), mas em termos de fisiologia e genética, a mais estudada é a *A. brasilense* (Reis et al., 2007).

Estas bactérias tem capacidade de promover o crescimento vegetal através da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) e, principalmente, pela produção de fitohormônios (Baldani & Baldani, 2005; Perrig et al., 2007). Nas associações de poáceas com RPCPs, não há formação de nódulos como acontece nas leguminosas. O que ocorre é a colonização da superfície e/ou do interior das raízes e parte aérea das plantas. Assim, a contribuição da FBN por espécies associativas, como o *Azospirillum*, na nutrição vegetal não é tão significativa como ocorre na simbiose entre rizóbios e leguminosas, ou seja, bactérias associativas excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada, suprindo apenas parcialmente as necessidades das plantas (Hungria et al., 2010). Entretanto, se for considerada

a grande extensão de áreas agrícolas utilizadas por poáceas, esta FBN parcial se torna importante.

A interação *Azospirillum*-planta proporciona benefício para o desenvolvimento vegetal, que é atribuído à produção de fitohormônios (auxinas, giberelinas e citocininas) as quais proporcionam maior crescimento radicular (Okon & Vanderleyden, 1997), ou seja, ocorre aumento da superfície de absorção das raízes da planta e aumento do volume de substrato do solo explorado, e por consequência maior absorção de água e nutrientes (Correa et al., 2008) resultando em plantas mais vigorosas e produtivas (Bashan et al., 2004; Hungria, 2011).

Os estudos envolvendo a inoculação de *Azospirillum* têm relatado efeitos de melhoria do crescimento, desenvolvimento e produtividade de importantes culturas agrícolas (Dartora, 2016). Dentro desse gênero, a espécie *A. brasilense* tem sido usada como inoculante em diversas culturas, com respostas benéficas demonstradas em milho (Quadros, 2009; Hungria et al., 2010; Marini et al., 2015; Muller et al., 2016), trigo (Hungria, 2011), milho (Machado, 2015) e arroz (Pedraza et al., 2009; Reichembach et al., 2011, Hahn, 2013).

A resposta da inoculação com *Azospirillum* pode variar de acordo com o genótipo da planta, condições ambientais, práticas agrícolas, bem como com a quantidade e qualidade das células bacterianas utilizadas como inoculante (Matsumura et al., 2015). Entretanto, os resultados relatados na comunidade científica mostram que esta técnica é promissora, e vai de encontro aos novos conceitos de agricultura sustentável, podendo proporcionar a redução na utilização do fertilizante nitrogenado aplicado nas lavouras.

#### **2.4. Inoculação em lavouras de arroz**

A planta de arroz (*Oryza sativa*) é uma poácea originária da Ásia, pertencente à família Poaceae. Este cereal é cultivado e consumido em todos os continentes (Fageria et al., 2004), pois se adapta às diferentes condições de

solo e clima, sendo a espécie de maior potencial para o controle da fome no mundo (Azambuja et al., 2004).

A produção mundial de arroz beneficiado estimado para safra 2017/18 é de 483,66 milhões de toneladas (USDA, 2017). O Brasil destaca-se como um dos países mais importantes quanto à produção e consumo de arroz do mundo, produzindo mais de 12 milhões de toneladas na safra 2016/17, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor nacional, com 69% da produção (CONAB, 2017).

Para suprir a demanda da alta produção de arroz, grande quantidade de minerais é aplicada ao solo para se melhorar o crescimento e captação de nutrientes pelo vegetal (Silveira, 2008). Dentre esses suplementos, o nitrogênio é o mais importante, sendo necessária a aplicação de grandes doses deste nutriente (Fornasieri Filho & Fornasieri, 2006; Andreucci, 2007).

As aplicações em excesso de nitrogênio podem resultar em poluição ambiental, como a contaminação do lençol freático por nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), acidificação do solo e aumento da taxa de desnitrificação, resultando no aumento da emissão de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) para a atmosfera (Biswas et al., 2000; Kennedy et al., 2004). Para reverter este quadro de impacto ambiental provocado pela adubação em excesso em cultivos de arroz e pelas dificuldades de equilíbrio na adubação de poáceas, existem diversos estudos com relação à aplicação e à utilização de adubos biológicos no cultivo do arroz e de outros cereais de importância econômica mundial (Silveira, 2008). Desta forma, tais adubos poderão ser substituídos por formulações constituídas, principalmente, por bactérias diazotróficas (Ferreira et al., 2003; Xie et al., 2003; Guimarães et al., 2003).

Vários estudos vêm sendo realizados, demonstrando a colonização de RPCPs em raízes de plantas de arroz e seu efeito na promoção de crescimento desta poácea (Kuss, 2007; Osorio Filho, 2009; Guimarães et al., 2010; Meireles, et al., 2015; Garcia, 2016; Gerlach, 2017). Os benefícios da inoculação de RPCPs em plantas de arroz podem ser através de: estímulo do comprimento da radícula e do prófalo, incremento da área foliar e da matéria

seca da parte área, absorção de nitrogênio, eficiência no uso da água absorvida pela planta, taxas de fotossíntese, número de panículas e o rendimento de grãos (Biswas et al., 2000; Chi et al., 2005).

A utilização de RPCPs para o aumento da produtividade em lavouras de arroz será, provavelmente, uma das práticas mais importantes para a agricultura atual (Figueiredo et al., 2010), pois a busca para a diminuição e dependência de fertilizantes químicos e a necessidade de desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável é pretendida pela sociedade (Moreira & Siqueira, 2006).

## **2.5. Inoculação em lavouras de milho**

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal de maior volume de produção mundial, tendo sido produzidos na safra 2016/17 mais de 1 bilhão de toneladas (USDA, 2017). O Brasil tem uma área cultivada com milho de 17,39 milhões de hectares e produção de 96,02 milhões de toneladas (CONAB, 2017) e é considerado um país estratégico, pois é o terceiro maior produtor e o segundo maior exportador mundial de milho.

Para alcançar altos rendimentos de grãos, o cultivo do milho, assim como os demais, é dependente de diversos fatores. Além das características intrínsecas à planta e das condições climáticas da região de cultivo, o manejo também interfere na produção da lavoura (Argenta et al., 2001).

Em relação à fertilidade do solo, o nitrogênio é o nutriente requerido em maior quantidade pelas poáceas e, por isso, é um fator limitante não só no rendimento de grãos, mas também na qualidade do produto em consequência do teor de proteína nos grãos (Amaral Filho et al., 2005). O milho expressa dependência nutricional de nitrogênio (Cancellier 2011), e para se obter altos rendimentos é necessária a suplementação mineral com fontes de adubação nitrogenada (Amado 2002; Scalco et al., 2002).

A utilização em excesso de adubos nitrogenados para suprir a necessidade nutricional dos cultivos é uma prática bastante disseminada em áreas agrícolas. Esta prática torna o adubo nitrogenado um dos mais



consumidos no mundo e o que mais influencia no custo de produção de um cultivo. Tendo em vista os custos ambientais e econômicos, se faz necessário encontrar alternativas sustentáveis para o mercado agrícola, que visem à redução do uso de fertilizantes e, portanto, do custo de produção, como também dos impactos ambientais.

Estudos tem demonstrado o grande potencial da interação RPCPs com plantas de milho (Gomes et al., 2007; Pavinato & Rosolem, 2008; Lana et al., 2009; Hungria, 2011; Kappes et al., 2014; Galindo 2016). O interesse na utilização de RPCPs nas lavouras de milho, que sejam capazes de contribuir para a nutrição das plantas, tem aumentado nos últimos anos, devido ao alto custo financeiro investido com fertilizantes e em relação ao que se busca no atual setor agrícola, uma agricultura sustentável (Hungria et al., 2010).

## **2.6. Inoculação em lavouras de trigo**

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma poácea pertencente à família Poaceae. Esta planta é cultivada mundialmente por ser considerada alimento básico devido a produção diversificada de derivados dos seus grãos (Scheuer et al., 2011). É uma espécie de estação fria, com produção mundial de 738 milhões de toneladas na safra 2016/17. No Brasil, o trigo é o cereal de inverno de maior importância na região Sul, que é a responsável por 89% da produção nacional (CONAB, 2017).

Dentre os principais fatores determinantes para uma boa produção de trigo está o fornecimento de uma adequada adubação nitrogenada (Zagonel et al., 2002). O nitrogênio é o macro nutriente mais limitante de sua produção (Rodrigues et al., 2014), pois é um elemento que participa da composição de compostos orgânicos, atuando no perfilhamento, produção de biomassa, formação de espiguetas e grãos por espiga (Bredemeier & Mundstock, 2001; Taiz & Zeiger, 2013; Vogel & Fey, 2016) . A correta aplicação do nitrogênio no trigo é fundamental, pois evita perdas e melhora a eficiência da adubação (Sala et al., 2005).

Dentro deste contexto, os fertilizantes industrializados são a principal fonte de nitrogênio disponível para o cultivo do trigo, e no intuito de se obter altas produtividades, são aplicadas doses elevadas desse nutriente (Alves et al., 2017). Este uso em excesso de nitrogênio pode resultar em danos ao meio ambiente, como acidificação do solo e eutrofização das águas, elevando os custos da produção (Binoto, 2013).

Uma alternativa do ponto de vista econômico e ambiental, para reduzir os gastos de produção e minimizar o uso de fertilizantes nitrogenados industrializados nas lavouras de trigo, seria a utilização de RPCPs (Luidwig, 2015). Considerando os benefícios da inoculação em plantas de trigo, pesquisadores já observaram uma manutenção dos perfilhos férteis, maior realocação de nitrogênio presente na biomassa nos grãos, maior desenvolvimento radicular e aumento na produtividade, com grãos mais pesados e cheios (Sala et al., 2007; Jezewski et al. 2010; Silva et al. 2005; Didonet et al. 2000).

Apesar dos resultados positivos na promoção de crescimento de plantas de trigo com a inoculação de RPCPs, estudos sobre a interação de cultivares de trigo e rizóbios ainda são escassos. Diversos autores evidenciam que existe uma relação bastante específica entre a estirpe da bactéria utilizada com a cultivar do vegetal que se deseja produzir, sendo este evento denominado de especificidade planta-bactéria (Arsac et al., 1990; Garcia de Salamone et al., 1996), e para Cantarella (2007) essa observação é uma das principais causas de inconsistência de ganhos produtivos com a utilização de RPCPs.

## **2.7. Inoculação e coinoculação de RPCPs**

A dependência de fertilizantes químicos pela agricultura atual é uma grande preocupação devido aos danos ambientais causados pelo uso em excesso desses insumos. Entre eles, destacam-se a acidificação do solo, eutrofização das águas (Binoto, 2013) e a emissão de gases de efeito estufa (Marks et al., 2013). Além de danos ambientais, outro fato que se torna

bastante relevante é a participação dos fertilizantes nos custos operacionais das lavouras, sendo em média de 27,82% (CONAB, 2016).

Esse cenário do setor agrícola demanda maiores investimentos em tecnologias que foquem na tendência da sustentabilidade, suprindo as necessidades da geração presente, sem comprometer as necessidades das gerações futuras (Nassar & Ortiz, 2010). Neste contexto, a utilização de RPCPs é uma alternativa economicamente viável e ecologicamente sustentável para a agricultura.

A técnica agrícola de manipulação de RPCPs é chamada de inoculação, e o produto contendo as estirpes bacterianas é denominado inoculante. A inoculação pode ser realizada via semente, no sulco de semeadura ou pós-emergência (Ronsani et al., 2013).

Uma alternativa promissora e recentemente explorada no Brasil é a mistura de inoculantes contendo RPCPs, uma técnica definida como coinoculação (Hungria et al., 2013). Esta nova metodologia já é uma recomendação oficial proposta pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) desde o ano 2016, para espécies leguminosas.

Essa técnica consiste na utilização de combinações de diferentes RPCPs, os quais produzem efeito sinérgico, ou seja, os resultados produtivos quando juntos superam os obtidos quando utilizados na forma isolada (Ferlini, 2006; Bárbaro et al., 2008). Diferentemente do que ocorre em leguminosas, quando se faz a coinoculação de rizóbios em conjunto com *A. brasilense*, o efeito benéfico do rizóbio na associação se deve, na maior parte, a capacidade que a bactéria tem de produzir fitormônios, que resulta em maior desenvolvimento do sistema radicular, e, portanto, a possibilidade de explorar um volume mais amplo de solo (Bárbaro et al., 2008), enquanto que *A. brasilense* supre parcialmente o nitrogênio que a poácea necessita para seu desenvolvimento (Hungria et al., 2007).

A coinoculação é muito utilizada e estudada em outros países por apresentar uma maior produtividade comparada à técnica de inoculação

isolada (padrão) (Atieno et al., 2012). Entretanto no Brasil ela ainda não é muito explorada. Apesar de muitos anos de pesquisa, ainda se observam respostas muito variáveis com a utilização de RPCPs, o que mostra a importância e justifica a realização de novos experimentos de campo (Kappes et al., 2014).

Pesquisas com as técnicas de inoculação isolada e coinoculação devem ser aperfeiçoadas e comprovadas em várias espécies vegetais, manejos e condições edafoclimáticas, para que o produtor sinta-se seguro ao utilizar as novas tecnologias e manejos em sua lavoura, garantindo qualidade, produtividade e retorno econômico (Oliveira et al., 2014; Gerlach, 2017).

Considerando as principais limitações e desafios atuais da agricultura brasileira, e o potencial benéfico das técnicas de inoculação e coinoculação, especialmente o maior desenvolvimento do sistema radicular, com uma maior absorção de água e nutrientes, e o aumento no rendimento de grãos (Galindo et al., 2016), é necessário estudos para verificar a viabilidade de aplicação dessas tecnologias em poáceas de grande importância econômica, como o arroz, milho e trigo.