

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Lucero Huasasquiche Sarmiento

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS EFICIENTES NA  
FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO EM TREVO VERMELHO (*Trifolium  
pratense* L.) E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE GRAMÍNEAS  
FORRAGEIRAS**

Porto Alegre

2022



Lucero Huasasquiche Sarmiento

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS EFICIENTES NA  
FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO EM TREVO VERMELHO (*Trifolium  
pratense* L.) E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE GRAMÍNEAS  
FORRAGEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Enilson L. Saccol de Sá  
Coorientadora: Dra. Anelise Beneduzi da Silveira

Porto Alegre

2022

### CIP - Catalogação na Publicação

Huwasquiche Sarmiento, Lucero  
Seleção e caracterização de rizóbios nativos  
eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio em  
trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) e na promoção  
de crescimento de gramíneas forrageiras / Lucero  
Huwasquiche Sarmiento. -- 2022.  
101 f.  
Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá.

Coorientadora: Anelise Beneduzi da Silveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. rizóbios. 2. fixação biológica de nitrogênio. 3.  
promoção de crescimento. 4. leguminosas forrageiras.  
I. Saccol de Sá, Enilson Luiz, orient. II. da  
Silveira, Anelise Beneduzi, coorient. III. Título.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão  
uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor  
se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, assim como ao Programa de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, professores e funcionários pelo apoio brindado na realização desta meta.

Ao meu orientador, Enilson L. Saccol de Sá, por me aceitar como sua orientada mesmo sem conhecer previamente o meu potencial, por acreditar em mim e pela ajuda em geral desde o primeiro dia que cheguei ao Brasil.

À minha coorientadora, Anelise Beneduzi da Silveira, pela disposição nas correções do projeto e na resolução das dúvidas.

Aos colegas do laboratório, e em especial à Kelly, por guiar meus passos em cada experimento, pelas dicas, pela paciência nas inumeráveis perguntas que eu fiz e pela amizade brindada.

Ao senhor José (vulgo tio 'Zé'), quem sempre estava disposto em me ajudar na casa de vegetação.

Às minhas amigas, Ângela, Bianca e Tania, por fazer da minha estadia no Brasil a melhor possível e pelas incríveis lembranças que eu levei.

À minha família, pelo apoio emocional em cada etapa da minha vida e ao Ricardo pela força e o amor que me dá desde o dia que o conheci.

Deixo aqui os meus sinceros agradecimentos a todos aqui citados.

# **SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS EFICIENTES NA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO EM TREVO VERMELHO (*Trifolium pratense* L.) E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS<sup>1</sup>**

Autor: Lucero Huasasquiche Sarmiento

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

Co-orientadora: Dra. Anelise Beneduzi da Silveira

## **RESUMO**

O trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) é uma leguminosa forrageira importante no setor pecuário do sul de Brasil, mas as condições climáticas regionais comprometem a sua persistência. A UFRGS e a EMBRAPA desenvolveram uma cultivar mais adaptada, a URS BRS Mesclador, para a qual ainda não foram selecionados rizóbios simbiotes eficientes na Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) e promoção de crescimento em gramíneas, os quais são de grande importância para o desenvolvimento de tecnologias agrícolas sustentáveis. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi selecionar rizóbios nativos para a nova cultivar. Para isso, se utilizaram sete isolados de rizóbios obtidos dos nódulos de trevo vermelho da nova cultivar e nove estirpes SEMIA simbiotes do trevo vermelho. Foi realizada uma caracterização funcional quanto a produção de AIA, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos e germinação em sementes de centeio. Por último se avaliou a eficiência dos rizóbios na FBN e sua capacidade de promoção de crescimento em centeio. Dos rizóbios estudados, Tp46 se destacou na produção de AIA e na germinação de sementes de centeio, a SEMIA 2076 na solubilização de fosfatos, e Tp57, Tp34, SEMIA 2038 e SEMIA 276 na produção de sideróforos. Além disso os resultados demonstraram que os isolados Tp34 e Tp46 tem potencial duplo propósito e mostraram valores similares ou melhores do que as estirpes já recomendadas pelo MAPA para o trevo vermelho, podendo ser considerados para estudos em campo com a perspectiva futura de produção de inoculantes no Brasil.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (99 p.) Abril, 2022.

SELECTION AND CHARACTERIZATION OF NATIVE RHIZOBIA EFFICIENT IN  
SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN RED CLOVER (*Trifolium pratense* L.) AND IN  
GROWTH PROMOTING OF RYE (*Secale cereale*)<sup>1</sup>

Author: Lucero Huasasquiche Sarmiento

Advisor: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

Co-Advisor: Dra. Anelise Beneduzi da Silveira

**ABSTRACT**

Red clover (*Trifolium pratense* L.) has an important role in the livestock sector in southern Brazil, but regional climatic conditions affect its persistence. UFRGS and EMBRAPA developed a more adapted cultivar, URS BRS Mesclador, but symbiotic rhizobia efficient in Biological Nitrogen Fixation (BNF) and growth promotion in grasses have not yet been selected for it, which are relevant for the development of sustainable agricultural technologies. In this context, this work aimed at the selection of native rhizobia for the new cultivar. Rhizobia were isolated from red clover nodules of the new cultivar, which were later authenticated and morphologically characterized. A functional characterization was also carried out through the evaluation of IAA production, phosphate solubilization, siderophore production and germination in rye seeds. Finally, efficient of the isolates in the BNF and their ability to promote growth in rye were evaluated. Among the studied rhizobia in this work, Tp46 had the highest IAA production and the highest germination percentage of rye seeds, SEMIA 2076 had the highest index of solubilization of phosphates and Tp57, Tp34, SEMIA 2038 and SEMIA 276 had the highest siderophores production. In addition, results showed that the Tp34 and Tp46 isolates have similar or better values (both in BNF efficiency and growth promotion in rye) than the strains already recommended by MAPA for red clover inoculants, and can be considered for field studies with the future perspective of inoculant production in Brazil.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (99 p.) April, 2022.

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos.....	3
3.	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
3.1	Plantas forrageiras na pecuária brasileira.....	4
3.1.1	Consociação entre leguminosas e gramíneas .....	4
3.2	Trevo vermelho ( <i>Trifolium pratense</i> L.) .....	6
3.2.1	Origem e distribuição geográfica .....	6
3.2.2	Descrição morfológica .....	7
3.2.3	Características e importância agrônômica do Trevo vermelho .....	8
3.2.4	URS BRS Mesclador: nova cultivar desenvolvida .....	9
3.3	A Simbiose entre rizóbios e plantas leguminosas.....	10
3.4	Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas .....	13
3.5	Rizóbios na agricultura sustentável .....	17
4.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
4.1	Isolamento de rizóbios .....	19
4.2	Autenticação dos isolados de rizóbios obtidos de amostras de solo .....	20
4.3	Caracterização morfológica dos isolados de rizóbios .....	20
4.4	Produção de ácido indol -acético (AIA).....	21
4.5	Solubilização de fosfatos .....	21
4.6	Produção de sideróforos.....	22
4.7	Efeito da inoculação dos isolados e estirpes SEMIA na germinação de sementes de centeio ( <i>Secale cereale</i> ).....	22
4.8	Eficiência dos isolados e estirpes SEMIA na FBN em trevo vermelho ( <i>Trifolium pratense</i> L.).....	23
4.9	Avaliação dos isolados e estirpes SEMIA na promoção de crescimento em centeio ( <i>Secale cereale</i> L.) .....	25
4.10	Análise integral da promoção de crescimento em centeio dos isolados de rizóbios .....	28
4.11	Análise estatística dos resultados.....	28
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	29

5.1	Isolamento e autenticação de rizóbios .....	29
5.2	Rizóbios estudados .....	31
5.3	Caracterização morfológica dos isolados de rizóbios.....	32
5.4	Produção de ácido indol-acético (AIA) .....	33
5.5	Solubilização de fosfato tricálcico.....	34
5.6	Produção de sideróforos .....	35
5.7	Efeito da inoculação dos isolados de rizóbios na germinação de sementes de centeio ( <i>Secale cereale</i> ) .....	37
5.8	Eficiência dos isolados de rizóbios na FBN em trevo vermelho ( <i>Trifolium pratense</i> L.) .....	40
5.9	Avaliação dos isolados de rizóbios na promoção de crescimento em centeio ( <i>Secale cereale</i> L.).....	44
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	49
7.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	55
8.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56
9.	<b>APÊNDICES</b> .....	68

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características das amostras de solo coletadas e códigos dos isolados obtidos delas.....	29
<b>Tabela 2.</b> Autenticação dos isolados obtidos das amostras do solo. ....	30
<b>Tabela 3.</b> Características dos rizóbios estudados neste trabalho .....	32
<b>Tabela 4.</b> Morfologia colonial dos isolados de rizóbios selecionados e das estirpes SEMIA. ....	32
<b>Tabela 5.</b> Concentrações de AIA produzidas pelos isolados de rizóbios em caldo LM sem e com adição de triptofano. ....	33
<b>Tabela 6.</b> Diâmetros de colônia e halos formados pelos isolados autóctones e estirpes SEMIA produtores de sideróforos. ....	37
<b>Tabela 7.</b> Percentuais de germinação e índice de velocidade de germinação dos isolados autóctones e estirpes SEMIA inoculados em sementes de centeio. 39	
<b>Tabela 8.</b> Altura de planta, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e índice de eficiência relativa (IER) em plantas de trevo vermelho cultivar URS BRS Mesclador inoculadas com os isolados autóctones e estirpes SEMIA.....	41
<b>Tabela 9.</b> Nodulação em plantas de trevo vermelho cultivar URS BRS Mesclador inoculadas com isolados autóctones e estirpes SEMIA.....	43
<b>Tabela 10.</b> Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e nitrogênio total em plantas de trevo vermelho cultivar URS BRS Mesclador inoculadas com os isolados Tp34, Tp46, SEMIA 2081 e SEMIA 2076.....	44
<b>Tabela 11.</b> Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), altura de planta, comprimento de raiz e índice de eficiência relativa em plantas de centeio inoculadas com os isolados autóctones e estirpes SEMIA .....	45
<b>Tabela 12.</b> Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), altura de planta e índice de eficiência relativa em plantas de centeio inoculadas com os rizóbios Tp34, Tp46, SEMIA 2076 e SEMIA 2081.....	47

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfologia do trevo vermelho: (1) flor; (2) estame; (3) pistilo; (4) cálice; (5) vagem; (6) semente. Fonte: WILHELM, 1985.....	8
<b>Figura 2.</b> Controle positivo para solubilização de fosfatos (estirpe UFRGS-VP16) .....	34
<b>Figura 3.</b> Índice de Solubilização de Fosfato da SEMIA 2076 e do controle positivo, estirpe UFRGS-VP16.....	35
<b>Figura 4.</b> Produção de sideróforos indicada pela formação de um halo amarelo em volta da colônia. a) positivo e b) Isolado de rizóbio negativo.....	36
<b>Figura 5.</b> Índice de produção de sideróforos obtido pelos isolados autóctones e estirpes SEMIA.....	36
<b>Figura 6.</b> Efeito dos isolados de rizóbios e estirpes SEMIA nos percentuais de germinação de sementes de centeio ao a) início e b) final do experimento em placas.....	38
<b>Figura 7.</b> Percentual acumulado de germinação de sementes de centeio inoculadas com os rizóbios SEMIA 276 e Tp46, em comparação com os controles água e LM.....	40
<b>Figura 8.</b> Índice de eficiência relativa dos isolados autóctones e as estirpes SEMIA na avaliação <i>in vitro</i> da fixação de nitrogênio em trevo vermelho cultivar URS BRS Mesclador.....	42
<b>Figura 9.</b> Índice de eficiência relativa dos isolados autóctones e as estirpes SEMIA na avaliação <i>in vitro</i> da promoção de crescimento em centeio. ....	46
<b>Figura 10.</b> Índice de eficiência relativa de promoção de crescimento em plantas de centeio inoculadas com os isolados autóctones Tp34 e Tp46 e as estirpes SEMIA 2076 e 2081.....	47
<b>Figura 11.</b> Análise de componentes principais dos parâmetros relacionados à promoção de crescimento de centeio quando inoculados com os isolados de rizóbios Tp34 (vermelho) e Tp46 (roxo), e as estirpes SEMIA 2076 (verde) e 2081 (preto) e comparados com os controles N 100% (celeste) e N 50% (azul).....	48

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AIA	cido indol acético
DDPA/SEAPDR	Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Estado do Rio Grande do Sul (ex-FEPAGRO)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FBN	Fixao Biológica de nitrogênio
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USDA	United States Department of Agriculture Maryland



## 1. INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas no setor agrícola incrementou-se o uso de sementes melhoradas, pesticidas e fertilizantes químicos que geram uma maior produtividade em diversas culturas destinadas para alimentação animal e humana. Os fertilizantes químicos nitrogenados passam por um processo industrial muito caro energeticamente e geram a contaminação do ambiente causando danos à saúde dos seres vivos (HERNÁNDEZ et al., 2012).

Características nutricionais desfavoráveis do solo, especialmente as limitações nos teores de nutriente podem levar ao uso excessivo de adubos nitrogenados 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 de crescimento de plantas (RPCPs).

O uso da inoculação de plantas com rizóbios destaca-se por serem microrganismos que, em associação simbiótica com leguminosas, são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico em quantidades suficientes para reduzir a dependência das plantas leguminosas aos adubos nitrogenados (MAREK-KOZACZUK et al., 2017). Esta simbiose é altamente específica, por isso é importante realizar a seleção de estirpes mais eficientes destes microrganismos visando a produção de inoculantes (HERNÁNDEZ et al., 2012). Além da sua capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), os rizóbios também estão sendo estudados como promotores de crescimento em plantas não leguminosas, onde podem entrar nos espaços intercelulares ou ficar na rizosfera e estimular o crescimento vegetal através de mecanismos como: produção de fito hormônios, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, entre outros (BORGES et al., 2019).

As leguminosas forrageiras são de grande importância para os sistemas agropastoris no sul do Brasil, porque suprem alimento para os rebanhos durante os meses de outono-inverno, época na qual ocorre uma deficiência na produção de forragem devido à forte sazonalidade de produção nesta região (SCHEFFER-BASSO et al., 2001). Além de proporcionar uma melhor distribuição da produção ao longo do ano, as leguminosas forrageiras têm vantagens nutricionais como a

melhoria nos níveis de proteína na dieta animal (JINGURA et al., 2001) e principalmente uma vantagem agronômica que é o produto da sua interrelação com os rizóbios: o fornecimento de nitrogênio aos solos por meio da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), contribuindo para uma melhoria na fertilidade destes (STIVARI et al., 2011).

No Estado do Rio Grande do Sul (RS), uma forrageira de estação fria que merece destaque é o trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) que apresenta uma boa produção de matéria seca (MONTARDO et al., 2003) e quando consorciada com espécies gramíneas, incrementa a produtividade e a qualidade dessas pastagens (STIVARI et al., 2011) devido ao seu alto valor nutritivo, semelhante ao da alfafa (FONTANELI et al., 2012).

O trevo vermelho é uma espécie introduzida no país e, apesar de suas cultivares apresentarem alguma adaptação, a persistência destas pastagens frequentemente se vê comprometida pelas condições climáticas regionais (MONTARDO et al., 2003). Na busca de populações mais bem adaptadas, a UFRGS junto com a EMBRAPA desenvolveu uma nova cultivar chamada URS BRS Mesclador, com melhor adaptação ao clima do sul de Brasil. A cultivar URS BRS Mesclador foi selecionada por meio de trabalhos de polinização aberta cruzada em campos (DALL'AGNOL et al., 2021), mas não foram realizados estudos de seleção de rizóbios eficientes na simbiose e fixação de nitrogênio com essa variedade e nem como promotores de crescimento em gramíneas com potencial para cultivo em sucessão ou em consórcio.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi selecionar estirpes de rizóbios eficientes na FBN, isolados a partir de nódulos da cultivar URS BRS Mesclador, avaliá-las quanto a sua capacidade na promoção de crescimento em plantas de centeio, uma gramínea recomendada para consorciação com o trevo (FONTANELI et al., 2012) e compará-las com as estirpes de rizóbios da Coleção SEMIA recomendadas para trevo vermelho.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Selecionar isolados de rizóbios eficientes na Fixação Biológica de Nitrogênio em plantas da cultivar URS BRS Mesclador de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.), e que sejam promotores de crescimento vegetal em centeio (*Secale cereale*).

### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Isolar rizóbios autóctones a partir de nódulos em plantas de trevo vermelho da cultivar URS BRS Mesclador inoculadas com amostras de solo de diversas localidades do estado.
- 2.2.2 Caracterizar as capacidades dos rizóbios na promoção de crescimento *in vitro*.
- 2.2.3 Avaliar a eficiência dos isolados na FBN dos isolados em plantas de trevo vermelho.
- 2.2.4 Avaliar a capacidade dos isolados na promoção de crescimento vegetal em centeio.
- 2.2.5 Avaliar estirpes de rizóbios simbiotes de trevo vermelho (Coleção SEMIA) paralelamente ao estudo dos isolados autóctones.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Plantas forrageiras na pecuária brasileira

As plantas forrageiras são os alimentos herbáceos que podem ser usados no pastoreio ou colhidos e armazenados para a alimentação animal (FERRI et al., 2015). Elas têm potenciais distintos de adaptação nos diferentes ecossistemas, principalmente em função do clima e das condições edáficas, que influenciam no crescimento e teor de nutrientes das forrageiras. Portanto, além dos aspectos produtivos desejados pelo pecuarista, é necessário que a escolha da forrageira considere a adaptabilidade das espécies às condições edafoclimáticas da região onde serão implantadas (LINO et al., 2018).

O Brasil é um país com vasta extensão territorial e com ótimo clima para o crescimento das plantas herbáceas, o que é muito favorável para o desenvolvimento de atividades rurais (ALMEIDA et al., 2004). No estado do Rio Grande do Sul, a pecuária depende das pastagens naturais, tipicamente subtropicais, com bom valor forrageiro na estação quente. Porém, durante o inverno, as forrageiras de ciclo estival não crescem devido às geadas e em consequência não suprem as necessidades para manter o peso dos animais (FONTANELI et al., 2012). Este período no qual as espécies de verão já completaram seu ciclo e as de inverno ainda não estão disponíveis para o seu uso, é conhecido como “vazio forrageiro” e ocorre na região sul do Brasil (ZENI, 2020).

##### 3.1.1 Consorciação entre leguminosas e gramíneas

A introdução de leguminosas forrageiras nos campos e a sua consorciação com gramíneas se tornou uma alternativa para minimizar o problema dos vazios forrageiros (SCHEFFER-BASSO et al., 2001). A consorciação é um tipo de agricultura sustentável definida como uma prática agrônômica que envolve o crescimento de duas ou mais culturas no mesmo campo ao mesmo tempo, ou com estações de crescimento sobrepostas (FUNG et al., 2019). As culturas selecionadas normalmente possuem diferentes

habilidades para usar os recursos disponíveis, o que leva a uma vantagem de rendimento e maior estabilidade em relação a uma única cultura em um sistema de baixo aporte (ASSENG et al., 2014).

Entre as forrageiras mais usadas no Brasil estão as gramíneas forrageiras, e existem dois tipos: as perenes estivais e as anuais hibernais. O primeiro grupo são plantas forrageiras tropicais capazes de rebrotar após cortes ou pastejos sucessivos (COSTA et al., 2004), o que assegura a sua perenidade. As condições ambientais no período de verão favorecem o crescimento destas gramíneas (LINO et al., 2018) Enquanto que no período de inverno, pode ocorrer uma paralisação temporária do desenvolvimento radicular, reduzindo o crescimento da planta após a desfolha e afetando a produção de forragem (COSTA et al., 2004). O grupo das gramíneas anuais de inverno completam o seu ciclo nesta época do ano e morrem sem haver rebrotação das mesmas (LINO et al., 2018). Com isto, sabemos que a produção estacional das forrageiras compromete a produtividade das pastagens formadas unicamente por gramíneas sem a correção da fertilidade do solo (PAULINO et al., 2006).

Por outro lado, as leguminosas são um grupo de plantas capazes de melhorar a fertilidade do solo, via fixação biológica de nitrogênio e em consequência reduzir a utilização de adubos nitrogenados, o que é uma vantagem tanto econômica quanto ambiental (SIMIONI et al., 2014). A fixação de nitrogênio que elas realizam devido à simbiose com rizóbios é um benefício para o seu próprio crescimento, assim como para o das gramíneas, pois o nitrogênio liberado pela decomposição da folhagem das leguminosas rapidamente se torna disponível para as gramíneas (BURGER & ZIPPERS, 2018). Outras vantagens seriam o aumento na qualidade da dieta animal devido ao alto valor proteico que tem, a melhoria na digestibilidade e palatabilidade do alimento, e a contribuição na recuperação de pastagens com algum grau de degradação (SIMIONI et al., 2014). Assim, a consorciação entre gramíneas e leguminosas tem vários benefícios, para os animais, plantas e o solo. A diversificação de plantas nas pastagens dificulta o desenvolvimento de pragas e, em geral, melhora a qualidade na cadeia produtiva (LINO et al., 2018).

### 3.2 Trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.)

O gênero *Trifolium* (Família Fabaceae) é composto por quase 250 espécies de plantas, cada uma reconhecida por seus efeitos agrícolas e terapêuticos, que fizeram delas plantas forrageiras muito valorizadas no passado (REHMAN, 2019). Uma das espécies deste gênero que merece destaque é o *Trifolium pratense* ou trevo vermelho, reconhecida pelo seu grande valor nutritivo, sua capacidade na FBN que melhora a qualidade da pastagem, sua alta produtividade e boa produção de matéria seca (BARRETO, 2007), sendo por essas razões uma das forrageiras temperadas mais utilizadas no mundo.

#### 3.2.1 Origem e distribuição geográfica

Acredita-se que o trevo vermelho tem a sua origem na Europa, Ásia ocidental e noroeste da África, onde foi encontrado de forma nativa (EGAN et al., 2021). Após muito tempo sendo uma planta selvagem, foi domesticado pela primeira vez, provavelmente no início do segundo milênio na Andaluzia Moura (Espanha), que foi em muitos sentidos o centro mais importante de inovação agrícola na idade média (KJÆRGAARD, 2003).

Segundo TAYLOR & QUESENBERRY (1996), os eventos principais na história da domesticação do trevo vermelho começaram com o cultivo da planta na Europa nos séculos III e IV, mas a primeira menção do seu cultivo foi apenas no século XIII por Albertus Magnus no seu livro 'De vegetabilibus'. Depois expandiu-se na Europa sendo registrado na Itália no ano de 1550, na Bélgica em 1566, na França em 1585 e na Inglaterra em 1645. Foi deste país que o trevo vermelho se espalhou até o continente americano (ZEVEN & ZHUKOVSKY, 1975), especificamente nos Estados Unidos, onde foi registrado pela primeira vez no ano 1663.

Atualmente o trevo vermelho está espalhado pela maioria das regiões temperadas no mundo: na Europa, na Rússia, do norte da China para o Japão, numa grande parte de América do Norte e sul de Flórida e da América do Sul (TAYLOR & QUESENBERRY, 1996). Na América Latina é cultivado em

regiões temperadas e subtropicais, principalmente no Chile, Argentina, Uruguai e o sul do Brasil (PAIM, 1988). No Brasil, o trevo foi introduzido pelos imigrantes italianos e na atualidade, tem ocorrências confirmadas na região Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) em áreas antrópicas, campos de altitude e campos limpos (IGANCI et al., 2020).

### 3.2.2 Descrição morfológica

O trevo vermelho é uma planta que alcança até 80 cm de altura, de porte ereto na ausência de doenças e condições de invernos rigorosos. A raiz é pivotante e profunda, se desenvolve a partir de uma raiz primária e sob boas condições pode crescer até mais de 1,5 m de profundidade (AMDAHL, 2016). O caule é piloso e tem um número limitado de entrenós, 4-6 (BOLLER et al., 2010). As folhas são alternas, com estípulas, elípticas e trifolioladas, com exceção das primeiras folhas verdadeiras que são unifolioladas (AMDAHL, 2016). Além disso tem uma mancha pálida em 'V' invertido na parte ventral dos folíolos (BELIZÁRIO, 2016). Nas Américas as folhas geralmente são pilosas, igual ao caule, mas na Europa são lisas. O trevo vermelho tem uma flor completa de leguminosa, que consiste num cálice, pistilo, estame e corola (TAYLOR & SMITH, 1980). A inflorescência é formada em capítulos terminais, ovoides, de cor vermelha ou violeta, com flores que variam de 30 a mais de 120 (TAYLOR & SMITH, 1980; FONTANELI et al., 2012).

Esta planta exige inseto polinizador porque a coluna sexual fica protegida dentro da corola. A transferência de pólen pode ser feita pelas abelhas, mas a flor é tão grande que geralmente as abelhas às evitam se tiverem outra fonte disponível, e nesse caso os zangões são os polinizadores eficientes do trevo vermelho (TAYLOR & SMITH, 1980). As estruturas botânicas de uma planta de trevo vermelho estão ilustradas na Figura 1.



**Figura 1.** Morfologia do trevo vermelho: (1) flor; (2) estame; (3) pistilo; (4) cálice; (5) vagem; (6) semente. Fonte: WILHELM, 1985.

### 3.2.3 Características e importância agrônômica do Trevo vermelho

O trevo vermelho é considerado uma planta bienal ou perene de curta duração, mas com verões secos torna-se anual (FONTANELI et al., 2012). Quanto às exigências climáticas, normalmente suporta geada, mas prefere outonos e invernos frios, sendo uma planta de clima temperado e subtropical, diminuindo o seu desenvolvimento no verão (BELIZÁRIO, 2016). O fator solo é essencial na produção da forrageira, pois fornece os nutrientes necessários para o correto desenvolvimento da planta, no caso do trevo vermelho, ela apresenta boa produtividade em solos semi-profundos, bem drenados, de boa fertilidade e com pH entre 6,0 – 7,0 (FONTANELI et al., 2012). Desta forma, os solos argilo-arenosos com razoável teor de matéria orgânica são os mais recomendados (BELIZÁRIO, 2016).

Esta planta não suporta pastejo intenso, sendo mais adequada para

áreas de verão seco onde são aplicados sistemas menos intensivos (EGAN et al., 2021). Em virtude do seu porte ereto é muito utilizada em fenação, também por ter uma das sementes de maior tamanho entre as leguminosas forrageiras, é uma planta de rápido estabelecimento propiciando o pastejo antes que outras forrageiras (FONTANELI et al., 2012). Em geral, o trevo vermelho admite múltiplos aproveitamentos como corte, pastejo direto, fenação e adubação verde (BALL et al., 2007).

O trevo vermelho tem diversas vantagens como o rápido estabelecimento, uso eficiente da água devido a sua raiz principal profunda, maior tolerância a pragas de pastagens (EGAN et al., 2021) e as já descritas anteriormente por ser uma leguminosa, como a melhoria na qualidade da dieta animal e aumento na fertilidade dos solos. Porém, o maior inibidor no desenvolvimento desta planta em sistemas pastoris é a sua baixa persistência (FORD & BARRETT, 2011). Esta característica pode ser consequência de fatores climáticos como temperaturas muito altas ou muito baixas, estresse hídrico, fatores agronômicos no manejo, entre outros (PORTELLA, 2002).

#### 3.2.4 URS BRS Mesclador: nova cultivar desenvolvida

As cultivares de trevo vermelho usadas no Rio Grande do Sul eram todas importadas, não existia nenhuma cultivar desenvolvida para as condições climáticas desta região. Razão pela qual o trevo vermelho precisava de uma melhor adaptação local, principalmente no que se refere à persistência (PORTELLA, 2002).

Nesse contexto, o Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS, desenvolveu em parceria com a EMBRAPA, a primeira cultivar melhorada e adaptada ao sul do Brasil, e a única com registro e proteção do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: URS BRS Mesclador (DALL'AGNOL et al., 2021). Segundo os autores, esta cultivar tem basicamente três características: persistência, produção de forragem e de semente, qualidades estas que deverão causar mudanças substanciais na produção de trevo vermelho no Brasil.

### 3.3 A Simbiose entre rizóbios e plantas leguminosas

Desde que HELLRIEGEL & WILFARTH (1888) descobriram a origem bacteriana na existência da fixação biológica de nitrogênio em leguminosas, esta interrelação vem sendo muito estudada e por isso, se conhece com detalhe as características morfológicas, fisiológicas e genéticas deste processo. Considerada como um clássico exemplo de associação mutualística, foi resultado de milhões de anos de coevolução e tornou ela um processo complexo e cuidadosamente regulado (RIVAS et al., 2009).

Entre os sistemas biológicos planta – microrganismos, a simbiose rizóbios-leguminosas é a de maior expressão econômica e importância na agricultura (FRANCO et al. 2002). A sua importância decorre da capacidade de converter o nitrogênio atmosférico em compostos facilmente assimiláveis para as plantas e animais (RUSSELLE & BIRR, 2004). As bactérias conseguem invadir e formar nódulos nas raízes das plantas, onde ocorre a fixação de nitrogênio em amônia, o qual é fornecido para a planta, em troca de compostos carbonatados e outros nutrientes. Assim, o mutualismo consiste em que a planta ganha a capacidade de crescer em solos pobres em nitrogênio (N) e a bactéria obtêm uma cobertura protetora e nutrientes das plantas (BÉCQUER, 2002).

Estes microrganismos capazes de estabelecer uma simbiose com leguminosas foram descobertos no século XIX, sendo denominados de *Rhizobium leguminosarum* (FRANK, 1889). Depois dessa data, toda bactéria que fosse capaz de nodular leguminosas foi chamada de rizóbio (RIVAS et al., 2009) e era colocada no gênero *Rhizobium*. Com o tempo, métodos mais avançados permitiram classificar melhor os rizóbios e foi no ano de 1984 que se adicionou o gênero *Bradyrhizobium* na família *Rhizobiaceae*, com a espécie *Bradyrhizobium japonicum*, originada da segregação de espécies de *Rhizobium* de crescimento lento (JORDAN, 1980). As espécies de rizóbios são consideradas como pertencentes as alfa e beta proteobacterias, sendo que a maioria é parte da ordem *Rhizobiales*, mas têm sido descobertos outros rizóbios que estão em distintos ordens das proteobactérias (LLORET & MARTÍNEZ-ROMERO, 2005). Os rizóbios estão distribuídos em 18 gêneros: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Allorhizobium*, *Pararhizobium*, *Neorhizobium*, *Shinella*,

*Mesorhizobium*, *Aminobacter*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Burkholderia*, *Cupriavidus* e *Trinickia* (PARTE et al., 2020).

A simbiose rizóbios-leguminosa é altamente específica e depende de uma troca de moléculas sinalizadoras secretadas pelas plantas, as quais induzem a expressão de genes de nodulação bacteriana (MAREK-KOZACZUK et al., 2017). É por isso que além dos fatores edafoclimáticos, a simbiose é também influenciada pelas características genóticas do macro e microsimbionte, modulado pelos diferentes sinais moleculares (XAVIER et al., 2006).

### 3.3.1 Simbiose com leguminosas do gênero *Trifolium*

O gênero *Trifolium* forma uma relação simbiótica com a bactéria *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* sob condições limitadas de nitrogênio (CIEŚLA et al., 2016). Mesmo que a interrelação entre rizóbios – leguminosa seja muito específica, o grau de especificidade varia dependendo do rizóbio. Neste caso, o *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* fixa nitrogênio unicamente com espécies do gênero *Trifolium*. Enquanto o *Rhizobium* sp. NGR234 induz a nodulação em 112 gêneros incluindo uma não leguminosa do gênero *Parasponia* (WANG et al., 2001).

A competição entre cepas autóctones e introduzidas é um tema central no uso de rizóbios como inoculantes na agricultura (FERGUSON et al., 2020) e na simbiose trevo-*Rhizobium* existem dois principais problemas: a barreira geográfica, devido aos grandes centros de diversidade dos trevos, e a barreira fenológica, devido aos ciclos de crescimentos de espécies anuais e perenes (HOWIESON et al., 2005).

DAZZO & HUBBELL (1975) propuseram um modelo *cross-bridging* que envolve a lectina no processo de reconhecimento entre trevo e *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii*. Eles postularam que a trifolína A (uma lectina das raízes de trevo) reconhece um sítio de reação cruzada com antígenos das células de *Rhizobium trifolii* e nos pelos radiculares do trevo, formando uma estrutura molecular interfacial correta para iniciar a adsorção específica da bactéria na superfície do pelo da raiz do hospedeiro.

### 3.3.2 Estabelecimento da simbiose

O estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa segue um programa morfológico muito bem definido, constituído por uma série de etapas nas quais intervêm distintas moléculas sintetizadas pelo macro e microsimbionte (DÍEZ, 2019). Podemos dividir o processo em três fases principais: a formação do nódulo, a infecção nas células do hospedeiro e a fixação biológica de nitrogênio (MARÓTI & KONDOROSI, 2014).

A formação do nódulo começa com a sinalização molecular, um diálogo químico entre os rizóbios e o seu hospedeiro. As raízes secretam compostos fenólicos, predominantemente flavonoides, que desencadeiam uma resposta específica de atração nos rizóbios circundantes até a rizosfera (HASSAN & MATHESIUS, 2012). Os flavonoides induzem a expressão dos genes de nodulação (*nod*) nos rizóbios via interação com a proteína reguladora NodD, e em resposta, as bactérias sintetizam lipo-oligossacarídeos chamados fatores Nod, reconhecidos pela planta (MAREK-KOZACZUK et al., 2017). Uma vez que os rizóbios chegam à superfície radicular, formam uma película na superfície, graças a moléculas como as ricadesinas e lectinas (NAYA, 2007). As plantas reconhecem os fatores Nod através de um receptor tipo Lys-M, ambos requeridos para a formação do nódulo e infecção (MARÓTI & KONDOROSI, 2014), assegurando assim o primeiro nível de especificidade. A base genética de todo este processo faz com que a simbiose seja específica e se estabeleça somente se a planta dispõe desse receptor capaz de reconhecer os fatores Nod (NAYA, 2007).

Após a interação entre fatores Nod e os receptores na planta, a raiz sofre uma deformação: os pelos radiculares param o seu crescimento e mudam de forma, se enrolando no ápice para prender um pequeno número de rizóbios aderidos na superfície (WANG et al., 2012). Esta pode ser considerada a primeira evidência de uma efetiva relação simbiótica (DÍEZ, 2019). Neste local, inicia-se a formação de uma passagem longa e inversa do ápice do pelo radicular, chamada de canal de infecção, na qual as bactérias são transportadas até atravessar a epiderme e o córtex radicular para obter acesso ao desenvolvimento do primórdio do nódulo (OLDROYD et al., 2011). Ao chegar ao primórdio nodular, o canal de infecção libera o seu citoplasma deixando as

bactérias no espaço intercelular, as quais são internalizadas num processo semelhante à endocitose (WANG et al., 2012), onde são rodeadas por uma membrana peribacteroide, para se converter em bacteroides (DÍEZ, 2019). Esta é a forma na qual se encontram dentro do nódulo. Por último, se dá o processo mais importante desta simbiose: a fixação biológica do nitrogênio.

A fixação do nitrogênio atmosférico é um processo catalisado pela enzima nitrogenase, que é constituída por duas proteínas (dinitrogenase e nitrogenase redutase) (BOTTOMLEY & MYROLD, 2015). Devido à alta sensibilidade da nitrogenase à desnaturação irreversível frente ao oxigênio, a FBN é feita num ambiente anaeróbico e os microrganismos e as plantas desenvolveram distintos métodos para proteger esta enzima do oxigênio (RASCIO & LA ROCCA, 2008). Um deles é a produção de leghemoglobina, quem transporta o oxigênio evitando a difusão dele nos nódulos (BINOTTO et al., 2007) e responsável pela coloração avermelhada dos nódulos eficientes.

A simbiose leguminosa-rizóbio é altamente específica, por isso não todos os rizóbios podem induzir a nodulação numa planta ou fixar nitrogênio em todas as leguminosas. Um exemplo de isto é *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* que só fixa nitrogênio em espécies de *Trifolium*, ou *Sinorhizobium meliloti* que é específica para *Medicago sativa* (JONES et al., 2007). Mesmo sendo específica, existem alguns rizóbios que possuem vários hospedeiros, como *Rhizobium leguminosarum* que induz nodulação em lentilha e ervilha (MORENO et al., 2016). Com isto destaca-se a importância dos trabalhos de seleção de rizóbios, os quais vem incrementando-se nas últimas décadas em distintas culturas, tais como *Adesmia latifolia* (MUNIZ et al., 2011; MACHADO et al., 2015), *Desmodium incanum* (DA SILVA, 2016), *Trifolium repens* (ALVES et al., 2011), *Leucaena leucocephala* (CUBILLOS-HINOJOSA et al., 2021), *Canavalia ensiformis* (HERNÁNDEZ et al., 2012), *Vigna unguiculata*, *Cajanus cajan* (FERNANDES et al., 2003), entre outras.

### **3.4 Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas**

As bactérias promotoras de crescimento de plantas, ou conhecidas também como PGPR (no inglês, *plant growth promoting rhizobacteria*), fazem parte da população residente dos vegetais como epifíticas ou endofíticas, não

sendo fitopatogênicas (MARIANO et al., 2004). Em algumas culturas, a aplicação de PGPR nos primeiros estádios da planta, tem aumentado a produção da biomassa devido ao maior crescimento dos caules e raízes (KLOEPPER et al., 2004). Estas bactérias têm a capacidade de colonizar ativamente o sistema radicular para favorecer e melhorar o crescimento e o rendimento vegetal (BERENDSEN et al., 2012), usando mecanismos diretos, indiretos ou uma combinação de ambos.

Os mecanismos diretos ocorrem quando as bactérias sintetizam metabólitos que beneficiam as plantas ou quando aumentam a disponibilidade de diferentes elementos nutricionais (MORENO et al., 2018). A influência direta inclui a produção de hormônios como o ácido indol-acético do grupo das auxinas, também do ácido giberélico, citocininas e ácido abscísico, ou a capacidade de produzir a enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, que reduz o nível de etileno nas raízes (ANGULO et al., 2014). Além disso, os mecanismos diretos incluem a solubilização de fósforo inorgânico, mineralização de fosfato orgânico, redução da toxicidade por metais pesados, produção de sideróforos, a fixação biológica de nitrogênio, entre outros (MORENO et al., 2018).

Os mecanismos indiretos de promoção de crescimento vegetal são caracterizados por causarem a diminuição ou a eliminação de microrganismos patogênicos (A. Moreno et al., 2018), atuando como agentes de biocontrole, destacando-se a liberação de sideróforos, quitinases, antibióticos, pigmentos fluorescentes e cianidas (ANGULO et al., 2014).

Trabalhos de avaliação de rizobactérias promotoras de crescimento tem sido descritos. SANTOS et al., (2019), avaliaram o efeito de inoculação de rizóbios em plantas de arroz. Da mesma forma, FLORENTINO et al. (2017) avaliaram o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas em sementes de alface. Desta forma, demonstram sua importância, visando altas produtividades e redução nos custos de produção para a agricultura sustentável.

### 3.4.1 Produção de ácido indol-acético

Os hormônios vegetais são moléculas que derivam de vias metabólicas essenciais para a planta, estando presentes em baixas concentrações e atuando localmente, ao redor de lugares de síntese ou em tecidos distantes (VEGA-CELEDÓN et al., 2016). As auxinas são reconhecidas pela sua capacidade de estimular um crescimento diferencial em resposta à gravidade ou o estímulo pela luz (ZHAO, 2010). Estas, são relacionadas a diversos processos metabólicos, como a divisão e diferenciação celular, alongação do caule, formação de raízes, dominância apical e queda de folhas (BRITANNICA, 2021). Uma das auxinas mais ativas fisiologicamente é o ácido indol-3-acético (AIA) (MOHITE, 2013), sendo uma das mais estudadas por ter uma aplicação prática na promoção de crescimento vegetal (CHAGAS-JÚNIOR et al., 2009).

A biossíntese do AIA não está limitada às plantas, organismos como bactérias, fungos e algas também são capazes de sintetizá-lo (VEGA-CELEDÓN et al., 2016). Supõe-se que 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de sintetizar o AIA (KHALID et al., 2004). As bactérias utilizam o triptofano, um dos principais componentes dos exsudados das raízes (KAMILOVA et al., 2006) como precursor para a síntese do AIA. As vias mais importantes para a produção do AIA são a via indol-3-piruvato (IPA), identificada na maioria de plantas e bactérias PGPR, e a via indol-3-acetamida (IAM), identificada geralmente em fitopatógenos (VEGA-CELEDÓN et al., 2016). A via IPA foi encontrada em diversos gêneros de bactérias benéficas às plantas, como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*. Consta de três passos principais: o primeiro é a transaminação do triptofano ao IPA mediante uma aminotransferase, depois o IPA é descarboxilado a indol-3-acetaldeído e finalmente ele é oxidado ao AIA (SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2011).

### 3.4.2 Solubilização de fosfatos

O fósforo é um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas porque constitui mais do 0,2% da massa seca (HARRISON et al., 2002)

e desempenha funções na síntese de proteínas, biossíntese de lipídios, síntese de clorofila, compostos carotenoides, etc. (NAVARRO & NAVARRO, 2003). Porém, a sua disponibilidade é limitada devido a sua escassez edáfica, baixa mobilidade, falta de reposição natural, e outros fatores (RUBIO, 2002), estando geralmente em formas minerais insolúveis ou muito pouco solúveis nos solos (BANERJEE et al., 2010).

O principal mecanismo para a solubilização microbiana de fosfatos é a diminuição do pH do meio extracelular até valores aproximados a 2.0, necessário para a solubilização (LARA et al., 2011). Isto ocorre pela produção extracelular de ácidos orgânicos, os quais intervêm na quimiotaxia microbiana (CORRALES et al., 2014). Assim, as bactérias são capazes de hidrolisar o fósforo na sua forma solúvel, conhecida como ortofosfatos (ions monobásicos e dibásicos), aumentando a aquisição deste elemento pelas plantas (BELTRÁN, 2014). Diversos gêneros bacterianos são associados com a produção de ácidos orgânicos, entre eles estão *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Rhizobium*, *Yarrowia*, *Aerobacter*, *Achromobacter* e *Erwinia*. Existem também outros mecanismos para solubilização de fosfatos como a produção de enzimas fosfatases, encontradas nos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Pantoea* e a produção de enzimas fitases, produzidas pelas bactérias do gênero *Bacillus* (CORRALES et al., 2014).

Inoculação em sementes e no solo com microrganismos solubilizadores de fosfatos tem sido utilizada para incrementar o desenvolvimento e produção das culturas (BANERJEE et al., 2010).

### 3.4.3 Produção de sideróforos

Os microrganismos desenvolveram um mecanismo de ligação ao ferro para sua assimilação: a produção de estruturas quelantes de ferro chamados sideróforos. Estas moléculas quelantes de ferro, que competem com patógenos e indiretamente impedem o crescimento deles na planta. O ferro é um dos micronutrientes essenciais para quase todos os seres vivos, pois é cofactor de muitas enzimas, tornando-o fundamental para o metabolismo celular (AGUADO et al., 2012), além de ser útil em outros processos como

transporte de oxigênio, síntese de DNA, fixação de nitrogênio, respiração e fotossíntese (GREENSHIELDS et al., 2007). Mesmo estando em abundância no solo, não está disponível para sua adsorção devido a sua baixa solubilidade na forma  $Fe^{+3}$  (STOREY et al., 2006). As plantas têm a capacidade de absorver os sideróforos bacterianos e aproveitar o ferro (BORGES et al., 2019). Elas também são capazes de produzir um tipo de sideróforo chamados fitosideróforos, porém, comparados com os sideróforos microbianos, eles têm uma afinidade menor ao ferro, uma menor diversidade de formas, menor tamanho e em alguns casos não captam só o ferro (AGUADO et al., 2012).

As bactérias capazes de produzir sideróforos influenciam de forma positiva no crescimento das plantas, funcionando como um mecanismo de promoção de crescimento direto, quando as plantas assimilam o complexo ferro-sideróforos, ou como um mecanismo indireto, porque limita a disponibilidade de ferro para as bactérias patogênicas presentes na rizosfera (COMPANT et al., 2005).

A inter-relação entre a leguminosa e o rizóbio é dependente de Fe, porque este é requerido para a formação de nódulos, produção de leg-hemoglobina, enzima nitrogenase e outras proteínas importantes durante a simbiose GUERINOT (1991). Nesse sentido, o rol dos sideróforos é importante para relação leguminosa-rizóbio e para a promoção de crescimento na planta

### **3.5 Rizóbios na agricultura sustentável**

A agricultura moderna baseia-se no uso intensivo de fertilizantes químicos, muitos deles produzidos com alto gasto energético e queima de petróleo. O Brasil é um dos principais consumidores de agrotóxicos do mundo, e não figura como principal produtor, isso quer dizer, que a dependência internacional destes insumos na produtividade brasileira é cada vez maior (GOMES et al., 2021). Além disso a eficiência dos fertilizantes químicos nitrogenados é baixa porque o nitrogênio apresenta uma dinâmica complexa no solo, sofrendo várias transformações como lixiviação, volatilização, nitrificação e outros (TEIXEIRA et al., 2018), o que gera perdas de nitrogênio no solo por processos biogeoquímicos. Isto torna estes insumos ainda mais caros, porque se precisa utilizar uma quantidade maior do que a planta

realmente consegue absorver.

Uma agricultura sustentável deve priorizar a utilização de estratégias que permitam o aumento da produtividade sem prejuízo ao ambiente e saúde (MARIANO et al., 2004). Nesse sentido, a simbiose entre rizóbios e leguminosas tem um grande impacto sobre o desenvolvimento de tecnologias agrícolas sustentáveis, porque permite a redução do uso de fertilizantes nitrogenados, bem conhecidos pela toxicidade e poluição que geram ao ambiente (DÍEZ, 2019). No Brasil, o cultivo de soja não utiliza adubos nitrogenados, sendo a necessidade de Nitrogênio suprida apenas pela simbiose com estirpes eficientes de *B. japonicum*, *B. elkanii* e *B. diazoefficiens*

A inoculação de leguminosas com rizóbios é uma das práticas agrícolas de maior sucesso no mundo devido ao alto benefício de custo-produção gerado para os agricultores, além de prover um manejo efetivo do nitrogênio para o ambiente, essencial para uma agricultura sustentável (CANTARO et al., 2019). Porém, ao ser a simbiose entre leguminosa e rizóbio altamente específica, vem ganhando cada vez mais importância estudos na seleção de estirpes mais eficazes para os cultivos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Isolamento de rizóbios

Para a obtenção de nódulos, visando o isolamento de rizóbios, plantas de trevo vermelho (cultivar URS BRS Mesclador), conhecida como trevo vermelho, foram cultivadas em casa de vegetação em vasos tipo 'Leonard' contendo substrato esterilizado (vermiculita e areia na proporção 2:1), com adição de solução nutritiva (SARRUGE, 1975) sem nitrogênio. Foram coletadas 15 amostras de solos das localidades de Encruzilhada do Sul, Pantano Grande, Tapejara e Porto Alegre no estado do Rio Grande do Sul. As amostras de Tapejara correspondem a campos comerciais onde foi cultivada soja (*Glycine max*) e as de Porto Alegre correspondem a locais onde se encontraram outras espécies leguminosas forrageiras tais como trevo branco (*Trifolium repens*), pega-pega (*Desmodium incanum*), amendoim forrageiro (*Arachis pinto*) e cornichão (*Lotus corniculatus*).

Em laboratório, as amostras foram peneiradas e após foram pesadas 10 g das amostras de solo e cestas colocadas em frascos de vidros contendo 90 ml de água destilada esterilizada. Após, os frascos foram mantidos em agitação por 2 horas e, ao final do período, mantidos em repouso por 1 hora. Foram utilizadas alíquotas de 10 ml da suspensão para a inoculação das plantas de trevo vermelho.

A coleta de nódulos foi efetuada 40 dias após a inoculação das plantas, os quais foram desinfestados em álcool (70%) e hipoclorito de sódio (2%) por 30 segundos e sucessivas lavagens com água destilada esterilizada. Em condições assépticas se prepararam placas Petri contendo meio ágar levedura-manitol com adição de corante vermelho congo (VINCENT, 1970). Num extremo da placa Petri foram adicionados 15 µl de água destilada estéril para esmagar um nódulo previamente desinfestado. Por cada amostra de solo foram utilizados 5 nódulos. Com nódulo esmagado se fez a inoculação por meio do método de esgotamento de inóculo por estrias. As placas foram incubadas a 28°C e após 5 dias de incubação, os isolados com morfologia colonial característica dos rizóbios foram purificados por inoculações sucessivas em placas com meio LMV, até a obtenção de colônias puras com morfologia

persistente e estas foram armazenadas sob refrigeração à 4°C em tubos com meio levedura-manitol (LM).

#### **4.2 Autenticação dos isolados de rizóbios obtidos de amostras de solo**

Os isolados de rizóbios foram inoculados (alíquota 3 ml,  $10^7$  UFC/ml) em plantas de trevo vermelho cultivar URS BRS Mesclador cultivadas em copos de 500 ml com substrato esterilizado (vermiculita e areia na proporção 2:1) e isento de nitrogênio. Após 30 dias da inoculação, avaliou-se a presença de nódulos eficientes, ou seja, os que apresentavam coloração vermelha no interior do nódulo. Aqueles isolados que não induziram nodulação nas plantas ou produziram nódulos ineficientes foram descartados.

Após à verificação da nodulação, foi comparada a procedência do isolado, a cultura na amostra de solo e a morfologia colonial em LMV dos isolados de rizóbios que conseguiram induzir a nodulação nas plantas para a seleção daqueles que seriam avaliados nos seguintes testes. Se dois isolados tinham características iguais, era selecionado apenas um.

Nos experimentos também foram utilizadas as estirpes SEMIA 251, 259, 276, 2038, 2076, 2075, 2079, 2081 e 2082, noduladoras de trevo vermelho, cedidas pela Coleção SEMIA de Rizóbios do DDP/SEAPDR. Cabe se destacar que as SEMIA 2081 e 2082 são as estirpes liberadas pelo MAPA (SDA, 2011) para a produção de inoculantes para Trevo vermelho.

#### **4.3 Caracterização morfológica dos isolados de rizóbios**

Os isolados de rizóbios foram inoculados em três meios distintos: placas com ágar LMV, tubos com ágar LM inclinado e placas com ágar LM com adição de corante azul de bromotimol ( $25 \text{ mg.L}^{-1}$ ), incubados durante 5 dias a 28 °C, com exceção das placas com ágar LM – azul de bromotimol que foram incubadas durante 10 dias a 28 °C.

No ágar LMV inocularam-se os isolados pelo método do esgotamento por estrias e foram avaliados os seguintes parâmetros nas colônias: bordo, forma, elevação, tamanho, opacidade e viscosidade. Nos tubos de ágar LM inclinado, inocularam-se as bactérias pelo método de

esgotamento de alça e foi avaliada a forma dos *slants* dos isolados (ramificada, frisada, equinular, filiforme, rizoide, espalhado). Por último, nas placas com corante azul de bromotimol inocularam-se as bactérias pelo método de esgotamento por estrias e foi avaliada a reação, sendo a mudança de coloração do meio de cultura de verde para amarelo indicativa de acidificação, enquanto a mudança para o azul indicativa de alcalinização do meio (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994).

#### **4.4 Produção de ácido indol -acético (AIA)**

A produção de AIA foi avaliada utilizando-se o método de ASGHAR et al. (2002) adaptado para a utilização de microtubos. Cada isolado de rizóbio foi inoculado em dois frascos, um deles contendo 20 ml de caldo LM suplementado com 50 mg. l<sup>-1</sup> de triptofano e outro sem adição deste produto. Após quatro dias de incubação a 28 °C, foram retirados 2 ml do meio, transferidos para microtubos e centrifugados a 10 000 rpm por 5 minutos. Em seguida, foi retirado 1,5 ml do sobrenadante, no qual foi adicionado 1 ml do reagente de Salkowski (4 g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O + 84 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 35%, volume final 200 ml) e mantido por 30 minutos em ausência de luz.

A quantificação do AIA produzido foi feita por espectrofotometria a 530 nm e comparações com uma curva padrão (Concentração de AIA em µg.ml<sup>-1</sup> = 78\*Absorbância + 0.1), a qual foi feita com soluções de AIA sintético em concentrações conhecidas (0, 0,2, 0,5, 1, 3, 9 µg.ml<sup>-1</sup>).

#### **4.5 Solubilização de fosfatos**

Os isolados de rizóbios obtidos foram crescidos em frascos contendo 15 ml de caldo LM e incubados a 28 °C durante 5 dias. Após este período, alíquotas de 20 µl do caldo de cultura (10<sup>8</sup> UFC/ml) foram inoculadas em placas contendo o meio para detecção da capacidade solubilizadora de fosfato (VERMA et al. 2001), onde se substituiu o fosfato de cálcio (CaHPO<sub>4</sub>) por 1 g.l<sup>-1</sup> de fosfato tricálcico (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)) como fonte de fosfato. Os isolados considerados positivos neste teste apresentaram um halo transparente em torno da colônia.

Foram medidos os diâmetros dos halos e das colônias para cálculo do índice de solubilização de fosfato ( $ISF = \text{diâmetro do halo} / \text{diâmetro da colônia}$ ) proposto por CHAGAS-JUNIOR et al. (2010). Como controle positivo foi utilizado o isolado UFRGS-Vp16, uma estirpe sabidamente solubilizadora de fosfato, da Coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ALVES et al., 2011), identificado como *Rhizobium anhuiense* (DA SILVA, 2021).

#### **4.6 Produção de sideróforos**

Foi avaliada mediante inoculação em placas com meio contendo o corante Cromoazurol S (CAS). A preparação deste meio foi feita com uma base de ágar King B diluído (glicerol 3 g.L<sup>-1</sup>, peptona 4 g.L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.23 g.L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.3 g.L<sup>-1</sup>, pH 7) (SCHWYN & NEILANDS, 1987) e uma solução corante de CAS (LOUDEN et al., 2011), que foi adicionada posteriormente ao meio King B (100 ml de corante CAS para 1 litro de meio King B).

A solução corante foi preparada utilizando-se três soluções: A) 0.06 g de cromoazurol em 50 ml de água ultrapura, B) 0.0027 g de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O em 10 ml de HCl 10 mM e C) 0.073 g de HDTMA em 40 ml de água ultrapura. A solução A e B foram misturadas, e depois a solução C foi adicionada lentamente. Nesta fase, o corante apresenta coloração azul, e foi autoclavado separadamente do meio King B diluído.

Após a preparação das placas com meio King B mais CAS, os rizóbios foram inoculados neste meio e incubados por 10 dias a 28 °C. A produção de sideróforos foi visualizada pela formação de um halo amarelo ao redor da colônia. Foram medidos os diâmetros dos halos e das colônias para o cálculo do índice de produção de sideróforos ( $IPS = \text{diâmetro do halo} / \text{diâmetro da colônia}$ ) proposto por HUASASQUICHE et al. (2020).

#### **4.7 Efeito da inoculação dos isolados e estirpes SEMIA na germinação de sementes de centeio (*Secale cereale*)**

Para a avaliação do efeito dos rizóbios na germinação de sementes de centeio (*Secale cereale*) cultivar BRS Serrano, os inóculos foram

preparados em frascos de vidro contendo 15 ml de caldo LM incubado durante 5 dias a 28 °C.

As sementes foram desinfestadas em álcool (70%) durante 1 min, hipoclorito de sódio (2%) durante 2 min e sucessivas lavagens com água destilada esterilizada e colocadas em placas Petri com papel filtro previamente esterilizado. Cada placa, em triplicata, continha 30 sementes de centeio e foi inoculada com 3 ml de água destilada esterilizada e 1 ml do inóculo bacteriano ( $10^7$  UFC/ml). Dois controles foram utilizados, um com adição de 1 ml de caldo LM sem inoculação e outro somente com água destilada esterilizada.

Os parâmetros avaliados foram a porcentagem de germinação calculada como a quantidade de sementes germinadas entre o total de sementes por placa, e o índice de velocidade de germinação (GSI pela sigla no inglês, *Germination Speed Index*), calculado pela soma do número de sementes germinadas a cada dia e dividido pelo respectivo número de dias transcorridos a partir da germinação (MAGUIRE, 1962).

#### **4.8 Eficiência dos isolados e estirpes SEMIA na FBN em trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.)**

Para avaliar a eficiência dos isolados de rizóbios na FBN o experimento foi dividido em duas etapas. A primeira etapa foi uma avaliação *in vitro* de todos os isolados (autóctones e estirpes SEMIA), na qual a fixação de nitrogênio foi avaliada de forma indireta usando-se a massa seca da parte aérea. Depois, foram selecionados os dois isolados autóctones e as duas estirpes SEMIA que apresentaram os maiores valores de IER% no experimento *in vitro* para a avaliação em plantas cultivadas em vermiculita e areia, na qual se determinou de forma direta a quantidade de nitrogênio fixado.

##### **4.8.1. Avaliação *in vitro* da FBN**

Sementes de trevo vermelho cultivar URS BRS Mesclador foram desinfestadas com álcool (70%) e hipoclorito de sódio (2%) por 30 s cada um, e sucessivas lavagens com água destilada esterilizada para serem pré-germinadas em papel filtro esterilizado. Para isso colocaram-se 50 sementes

espalhadas no papel toalha esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada, enrolando-se em seguida e cobrindo-o com papel alumínio. Esses rolos formados foram deixados em forma vertical dentro de um recipiente com água destilada esterilizada, durante dois dias a 28°C.

Após a germinação, as plântulas foram assepticamente colocadas em tubos de ensaio (20 cm comprimento e 2,4 cm de diâmetro) contendo solução nutritiva (SARRUGE, 1975) agarizada (7,5 g.L<sup>-1</sup>) e isenta de nitrogênio, considerando somente as sementes que tinham 2 mm a mais de radícula.

Os tubos foram inoculados com os rizóbios (autóctones: Tp04, Tp12, Tp22, Tp34, Tp35, Tp46, Tp57 e estirpes SEMIA: 251, 259, 276, 2038, 2076, 2075, 2079, 2081 e 2082). Cada tratamento inoculado constou de quatro repetições. Em cada tubo foi inoculado com uma alíquota de 200 µl de suspensão bacteriana (aprox. 10<sup>7</sup> UFC/ml) que foi cultivada em caldo LM incubado por 5 dias a 28 °C e 120 rpm. Dois controles foram utilizados, o controle N+ com adição de 500 µl de solução NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (5 g.L<sup>-1</sup>) equivalente a 80 kg N/ha, dose recomendada para o trevo vermelho (SBCS, 2016) e o controle N- sem adição de nitrogênio. Neste ensaio, nenhum dos tubos inoculados com rizóbios recebeu dose de nitrogênio.

O desenvolvimento das plantas foi acompanhado durante 30 dias após a inoculação. Durante esse tempo a nodulação foi avaliada semanalmente e ao final do experimento, separou-se a parte aérea da radicular, e ambas foram armazenadas em sacos de papel para secagem na estufa durante três dias a 60°C. Foram avaliados os seguintes parâmetros:, altura da planta, comprimento das raízes, e massa seca da parte aérea (MSPA). Através da MSPA calculou-se o Índice de eficiência relativa (IER%) seguindo a fórmula de BROCKWELL et al. (1996), que expressa a capacidade dos isolados em promover ou acumular massa seca da parte aérea em comparação com os controles:

$$IER\% = \frac{(MSPA_{inoculado} - MSPA_{controleN0}) * 100}{(MSPA_{controleN100} - MSPA_{controleN0})}$$

#### 4.8.2. Avaliação da FBN em plantas de trevo vermelho cultivadas em vermiculita e areia em lampadário

Foi realizado um experimento em lampadário, utilizando-se vasos plásticos (500 ml) contendo uma mistura de vermiculita e areia esterilizadas na proporção 2:1 e isenta de nitrogênio.

As sementes de trevo vermelho da cultivar URS BRS Mesclador foram desinfestadas com álcool (70%) e hipoclorito de sódio (2%) por 30 s cada um, e sucessivas lavagens com água destilada esterilizada e após isso foram plantadas nos vasos. As plantas foram inoculadas com os isolados que tiveram os melhores resultados no teste de avaliação da FBN *in vitro*. Para isto, usou-se uma alíquota de inóculo bacteriano de 3 ml (aprox.  $10^7$  UFC/ml) produzido em caldo LM e incubado durante 5 dias a 28°C. Os controles N+ e N- também foram utilizados neste experimento, sendo o controle N+ com adição de 12 ml da solução  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ) equivalente a dose recomendada (80 kg N/ha) para o cultivo de trevo vermelho (SBCS, 2016) e o controle N- sem adição de nitrogênio. Nenhum dos tratamentos inoculados recebeu qualquer dose de nitrogênio.

Em intervalos de dois dias foi adicionada a solução nutritiva (SARRUGE, 1975) esterilizada e isenta de nitrogênio. O ensaio foi conduzido por 30 dias e após as plantas foram coletadas. A parte aérea foi separada do sistema radicular, cortando-se próximo à base do caule, e estas foram armazenadas em sacos de papel para secagem na estufa a 60°C durante três dias. As raízes foram lavadas em água destilada e da mesma forma, armazenadas em sacos de papel para secagem na estufa. Foram avaliados os parâmetros de massa seca aérea, massa seca da raiz e o teor de nitrogênio total na parte aérea. Este último sendo avaliado no Laboratório de Química do Solo da UFRGS seguindo a metodologia semi micro Kjeldhal descrito por TEDESCO et al. (1995).

#### **4.9 Avaliação dos isolados e estirpes SEMIA na promoção de crescimento em centeio (*Secale cereale* L.)**

A avaliação da eficiência dos isolados na promoção de crescimento

em centeio (*Secale cereale* L.) foi realizada em dois experimentos. O primeiro experimento foi uma avaliação *in vitro* da promoção de crescimento vegetal de todos os isolados (autóctones e estirpes SEMIA) e o segundo foi realizado em lampadário com plantas cultivadas em vermiculita e areia, sendo inoculados com os dois isolados autóctones e as duas estirpes SEMIA que apresentaram os maiores valores de IER% no experimento *in vitro* da FBN.

#### 4.9.1. Avaliação *in vitro* da promoção de crescimento em centeio

Sementes de *Secale cereale* cultivar BRS Serrano foram desinfestadas em álcool (70%) durante 1 min, hipoclorito de sódio (2%) durante 2 min e sucessivas lavagens com água destilada esterilizada. Após foram pré-germinadas em papel filtro esterilizado. Para isso colocaram-se 50 sementes espalhadas no papel úmido e enrolou-se, cobrindo-o com papel alumínio. Esses rolos formados foram deixados em forma vertical dentro de um recipiente com água destilada esterilizada, durante dois dias a 28°C. Em seguida, as plântulas foram colocadas em tubos de ensaio considerando só as sementes que tinham 2 mm a mais de radícula, e inoculadas. Em condições assépticas, cada semente foi colocada no centro do tubo contendo solução nutritiva (SARRUGE, 1975) agarizada. Após isso, os tubos foram inoculados com os rizóbios (autóctones: Tp04, Tp12, Tp22, Tp34, Tp35, Tp46 e Tp57, e estirpes SEMIA: 251, 259, 276, 2038, 2076, 2075, 2079, 2081, 2082), considerando 5 tubos cada. Em cada tubo foi inoculado 200 µl de suspensão bacteriana (aprox.  $10^7$  UFC/ml) cultivada em caldo LM de cada rizóbio e incubado por 5 dias a 28 °C a 120 rpm. Dois controles foram utilizados, o controle 100% com adição de 300 µl da solução  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (5 g.L<sup>-1</sup>) equivalente a dose recomendada (50 kg N/ha) para o cultivo de centeio (SBCS, 2016) e controle 50% com adição de 150 µl da solução  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (5 g.L<sup>-1</sup>) equivalente à metade da dose de nitrogênio recomendada. Os tubos inoculados com os rizóbios também receberam a metade da dose de nitrogênio (150 µl da solução  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  5 g.L<sup>-1</sup>). O desenvolvimento das plantas foi acompanhado durante 10 dias após a inoculação.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: altura da planta, comprimento das raízes, massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de

raiz (MSR).

#### 4.9.2. Avaliação da promoção de crescimento em plantas de centeio cultivadas em vermiculita e areia em lampadário

Foi realizado um experimento em lampadário, utilizando vasos plásticos (500 ml) contendo uma mistura de vermiculita e área esterilizada na proporção 2:1 e isento de nitrogênio.

As sementes de centeio da cultivar BRS Serrano foram desinfestadas em álcool (70%) durante 1 min, hipoclorito de sódio (2%) durante 2 min e sucessivas lavagens com água destilada esterilizada. Após, foram plantadas nos vasos e inoculadas com 3 ml de caldo LM com aproximadamente  $10^7$  UFC/ml que foi incubado com o isolado de rizóbio por 5 dias a 28 °C. Foram utilizados neste experimento o controle 100% com adição de 7,5 ml da solução  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (5 g.L<sup>-1</sup>) equivalente a dose recomendada (50 kg N/ha) para o cultivo de centeio (SBCS, 2016) e o controle 50% com adição de 3,25 ml da solução  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (5 g.L<sup>-1</sup>) equivalente à metade da dose recomendada. As plantas inoculadas com os rizóbios também receberam a metade da dose de nitrogênio semanalmente ao longo do experimento. Em todos os tratamentos adicionou-se 15 ml solução nutritiva (SARRUGE, 1975) sem nitrogênio e esterilizada a cada dois dias aproximadamente.

O ensaio foi conduzido por 20 dias e após as plantas foram coletadas e a parte aérea foi separada do sistema radicular e armazenada em sacos de papel para secagem na estufa a 60°C durante três dias. As raízes foram lavadas em água destilada e da mesma forma, armazenadas em sacos de papel para secagem na estufa a 60°C durante três dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros: altura da planta, massa seca aérea (MSA), massa seca da raiz, e índice de eficiência relativa (IER%), calculada usando-se a fórmula de BROCKWELL et al. (1996):

$$IER\% = \frac{(MSPA_{inoculado} - MSPA_{controleN0}) * 100}{(MSPA_{controleN100} - MSPA_{controleN0})}$$

#### **4.10 Análise integral da promoção de crescimento em centeio dos isolados de rizóbios**

Devido ao grande número de variáveis envolvidas, a análise integral dos isolados bacterianos foi realizada através de uma Análise de Componentes Principais (ACP) no programa Past3, para uma melhor visualização dos resultados de cada isolado e também para uma possível correlação entre os parâmetros analisados na promoção de crescimento em centeio.

#### **4.11 Análise estatística dos resultados**

Se avaliaram os supostos de normalidade de dados e homocedasticidade em cada teste. Aqueles que obedeciam a ambos supostos foram analisados com testes paramétricos, e os que não, com testes não paramétricos.

Assim, para a produção de sideróforos, efeito na germinação de sementes de centeio, eficiência na FBN em lampadário, promoção de crescimento de centeio em lampadário e alguns parâmetros da promoção de crescimento *in vitro*, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA paramétrico) e LSD Fisher ( $\alpha=0,05$ ) para a comparação de médias.

Enquanto à produção de AIA, à eficiência na FBN *in vitro*, alguns parâmetros da promoção de crescimento *in vitro*, os resultados foram submetidos ao teste não paramétrico *Kruskal Wallis* e ao teste de Dunn ( $\alpha=0,05$ ) para a comparação de medianas. Os dados obtidos na solubilização de fosfatos foram submetidos ao teste não paramétrico de Wilcoxon Mann Whitney ( $\alpha=0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Isolamento e autenticação de rizóbios

Foram obtidos sessenta isolados de rizóbios a partir de nódulos radiculares de trevo vermelho cultivar URS BRS Mesclador em quinze das dezoito amostras de solos estudadas de diferentes locais de RS. Destes, cinco isolados foram obtidos das amostras de Encruzilhada do Sul, cinco de Pantano Grande, dez de Tapejara e quarenta de Porto Alegre (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características das amostras de solo coletadas em diferentes municípios e códigos dos isolados de rizóbios obtidos das mesmas.

N° amostra de solo	Origem	Coordenadas	Cultura no local	N° isolados obtidos	Códigos dos isolados
1	Encruzilhada do Sul	30°27'08.9"S 52°30'14.7"W	Sem cultura	5	Tp01 - Tp05
2	Pantano Grande	30°17'47.1"S 52°21'52.1"W	Sem cultura	5	Tp06 - Tp10
3	Tapejara	28°06'43.5"S 51°57'37.9"W	Soja	4	Tp11 - Tp14
4	Tapejara	28°06'43.5"S 51°57'37.9"W	Soja	6	Tp15 - Tp20
5	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	Trevo branco	5	Tp21 - Tp25
6	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	Trevo branco	5	Tp26 - Tp30
7	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	Trevo branco	2	Tp31 - Tp32
8	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	<i>Desmodium</i> sp.	3	Tp33 - Tp35
9	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	<i>Desmodium</i> sp.	3	Tp36 - Tp38
10	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	<i>Desmodium</i> sp.	3	Tp39 - Tp41
11	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	<i>Desmodium</i> sp.	6	Tp42 - Tp47
12	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	<i>Desmodium</i> sp.	0	---
13	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	Amendoim forrageiro	3	Tp48 - Tp50
14	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	Amendoim forrageiro	5	Tp51 - Tp55

15	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	Amendoim forrageiro	1	Tp56
16	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	Amendoim forrageiro	4	Tp57 - Tp60
17	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	Cornichão	0	---
18	Porto Alegre	30°04'25.1"S 51°08'06.1"W	Trevo branco	0	---

A autenticação de rizóbios simbiotes foi feita nos sessenta isolados obtidos das amostras de solo, onde foram avaliados os fenótipos Nod+ (formação de nódulos) e Fix+ (evidência da FBN através da coloração avermelhada no interior do nódulo). Quarenta isolados foram autenticados como rizóbios (Tabela 2) porque estabeleceram uma simbiose com o trevo vermelho, observada pela formação de nódulos eficientes.

**Tabela 2.** Autenticação dos isolados obtidos das amostras do solo.

N' amostra de solo	Código do isolado	Nod	Fix	Simbionte
1	Tp01	+	+	Sim
	Tp02	+	+	Sim
	Tp03	-		Não
	Tp04	+	+	Sim
	Tp05	+	+	Sim
2	Tp06	+	-	Não
	Tp07	+	+	Sim
	Tp08	+	+	Sim
	Tp09	+	+	Sim
	Tp10	+	+	Sim
3	Tp11	+	+	Sim
	Tp12	+	+	Sim
	Tp13	+	+	Sim
	Tp14	-		Não
4	Tp15	-		Não
	Tp16	+	+	Sim
	Tp17	-		Não
	Tp18	+	+	Sim
	Tp19	+	+	Sim
	Tp20	-		Não
5	Tp21	+	-	Não
	Tp22	+	+	Sim
	Tp23	+	+	Sim
	Tp24	+	+	Sim
	Tp25	+	+	Sim

6	Tp26	+	+	Sim
	Tp27	+	+	Sim
	Tp28	+	-	Não
	Tp29	+	+	Sim
	Tp30	+	-	Não
7	Tp31	+	+	Sim
	Tp32	+	-	Não
8	Tp33	-		Não
	Tp34	+	+	Sim
	Tp35	+	+	Sim
9	Tp36	+	+	Sim
	Tp37	+	-	Não
	Tp38	+	-	Não
10	Tp39	+	+	Sim
	Tp40	+	+	Sim
	Tp41	+	+	Sim
11	Tp42	+	+	Sim
	Tp43	-		Não
	Tp44	+	+	Sim
	Tp45	+	+	Sim
	Tp46	+	+	Sim
	Tp47	+	-	Não
	Tp48	+	-	Não
13	Tp49	-		Não
	Tp50	+	+	Sim
14	Tp51	+	+	Sim
	Tp52	+	+	Sim
	Tp53	+	+	Sim
	Tp54	+	-	Não
	Tp55	+	+	Sim
15	Tp56	-		Não
16	Tp57	+	+	Sim
	Tp58	+	+	Sim
	Tp59	+	+	Sim
	Tp60	+	-	Não

## 5.2 Rizóbios estudados

Após a comparação das características dos quarenta isolados simbiotes, sete foram selecionados para este trabalho em base aos critérios descritos anteriormente (seção 4.2), os quais foram codificados como Tp4, Tp12, Tp22, Tp34, Tp35, Tp46 e Tp47 (Tabela 3) e denominados isolados autóctones nos futuros testes. As nove estirpes moduladoras de trevo vermelho cedidas pela Coleção SEMIA de Rizóbios (DDPA/SEAPDR) também foram avaliadas nos futuros testes.

**Tabela 3.** Características dos rizóbios estudados neste trabalho

ISOLADOS AUTÓCTONES				
Código	Local da amostra de solo	Cultura no local	Induz a nodulação	Densidade ótica da colônia
Tp04	Encruzilhada do Sul	Sem vegetação	Sim	Translúcida
Tp12	Tapejara	Soja	Sim	Translúcida
Tp22	Porto Alegre	Trevo branco	Sim	Opaca
Tp34	Porto Alegre	Desmodium sp.	Sim	Opaca
Tp35	Porto Alegre	Desmodium sp.	Sim	Translúcida
Tp46	Porto Alegre	Desmodium sp.	Sim	Opaca
Tp57	Porto Alegre	Amendoim forrageiro	Sim	Translúcida

ESTIRPES SEMIA		
Código	Espécie	Instituição de origem
SEMIA 251	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	USDA
SEMIA 259	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	USDA
SEMIA 276	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	DDPA/SEAPDR
SEMIA 2038	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	INTEC
SEMIA 2075	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	Universidade de Helsinki
SEMIA 2076	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	Universidade de Helsinki
SEMIA 2079	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	Universidade de Helsinki
SEMIA 2081	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	EPAGRI
SEMIA 2082	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	EPAGRI

### 5.3 Caracterização morfológica dos isolados de rizóbios

Todos os isolados autóctones e as estirpes SEMIA apresentaram colônias com bordo liso, forma circular, elevação convexa e superfície brilhosa, as quais são características comuns em colônias de rizóbios (Tabela 4).

**Tabela 4.** Morfologia colonial dos isolados de rizóbios selecionados e das estirpes SEMIA.

Rizóbio	Tamanho da colônia (mm)		Densidade ótica	Consistência	Slants	pH do meio
	3 dias	6 dias				
Tp04	3,0	7,5	Translúcida	Butirosa	Filiforme	Ácido
Tp12	1,5	6,0	Translúcida	Butirosa	Filiforme	Ácido
Tp22	2,0	4,0	Opaca	Gomosa	Filiforme	Ácido
Tp34	3,0	7,5	Opaca	Gomosa	Filiforme	Ácido
Tp35	1,5	6,5	Translúcida	Gomosa	Filiforme	Ácido

Tp46	2,0	5,0	Opaca	Gomosa	Filiforme	Ácido
Tp57	2,5	5,5	Translúcida	Butirosa	Filiforme	Ácido
SEMIA 251	<1,0	5,0	Translúcida	Gomosa	Echinular	Ácido
SEMIA 259	<1,0	3,5	Translúcida	Gomosa	Echinular	Ácido
SEMIA 276	1,0	4,0	Opaca	Gomosa	Frisado	Ácido
SEMIA 2038	0,5	5,0	Translúcida	Gomosa	Echinular	Ácido
SEMIA 2075	1,0	2,0	Translúcida	Butirosa	Echinular	Neutro
SEMIA 2076	<1,0	1,5	Opaca	Seca	Echinular	Neutro
SEMIA 2079	0,5	6,0	Translúcida	Butirosa	Filiforme	Ácido
SEMIA 2081	0,5	7,0	Translúcida	Gomosa	Filiforme	Ácido
SEMIA 2082	1,0	6,0	Opaca	Gomosa	Echinular	Ácido

#### 5.4 Produção de ácido indol-acético (AIA)

Observou-se que todos os isolados foram capazes de produzir AIA em ambos os meios (LM com e sem adição de triptofano). No caldo LM sem adição de triptofano, as concentrações de AIA variaram entre 0,12 – 0,83  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , destacando-se as estirpes SEMIA 2076 e 2079 que produziram concentrações de AIA superiores às dos tratamentos: SEMIA 2081, Tp34, Tp35 e Tp46. No caldo LM com adição de triptofano, as concentrações variaram entre 0,88 – 5,33  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , destacando-se o isolado Tp46, que foi estatisticamente o maior produtor de AIA, sendo superior que as estirpes SEMIA 2038, 2076, 2081, 2082 e os isolados autóctones Tp04, Tp22, Tp34, Tp35, Tp57 (Tabela 5).

**Tabela 5.** Concentrações de AIA produzidas pelos isolados de rizóbios em caldo LM sem e com adição de triptofano.

Rizóbio	Produção de AIA ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	
	Sem adição de triptofano	Com adição de triptofano
Tp04	0,49 $\pm$ 0,2 abcd	0,96 $\pm$ 0,3 d
Tp12	0,59 $\pm$ 0,1 abcd	3,43 $\pm$ 0,9 ab
Tp22	0,64 $\pm$ 0,0 abc	1,68 $\pm$ 1,8 cd
Tp34	0,44 $\pm$ 0,1 cd	0,88 $\pm$ 0,3 d
Tp35	0,46 $\pm$ 0,1 bcd	1,01 $\pm$ 0,0 d
Tp46	0,12 $\pm$ 0,0 d	5,33 $\pm$ 0,8 a
Tp57	0,77 $\pm$ 0,4 abc	1,27 $\pm$ 0,1 bcd
SEMIA 251	0,51 $\pm$ 0,2 abcd	2,49 $\pm$ 0,8 abc

SEMIA 259	0,72 ± 0,1	ab	2,15 ± 0,9	abc
SEMIA 276	0,67 ± 0,2	abc	1,61 ± 0,2	abcd
SEMIA 2038	0,72 ± 0,3	abc	1,16 ± 0,2	cd
SEMIA 2075	0,72 ± 0,3	abc	1,42 ± 0,1	abcd
SEMIA 2076	0,83 ± 0,2	a	1,35 ± 0,5	bcd
SEMIA 2079	0,75 ± 0,1	a	3,09 ± 1,4	abc
SEMIA 2081	0,33 ± 0,3	cd	1,19 ± 0,3	cd
SEMIA 2082	0,67 ± 0,2	abc	0,93 ± 0,2	d

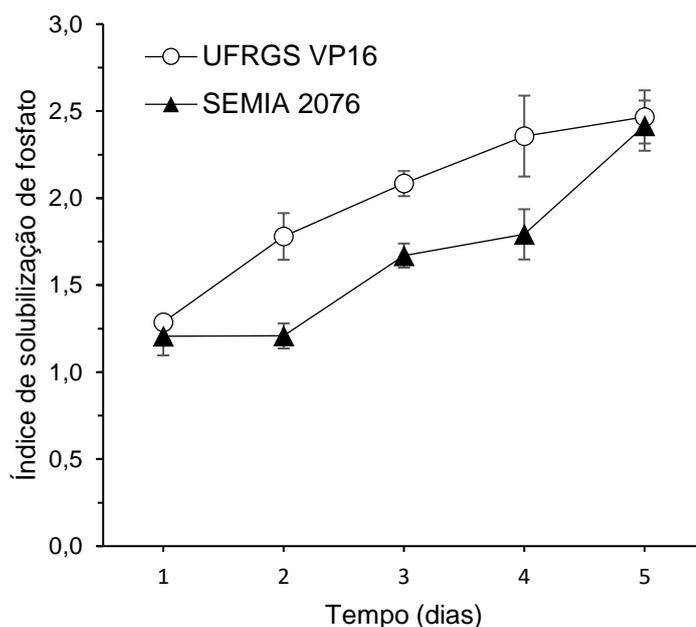
Média ± DP de 3 repetições. Tratamentos na mesma coluna com uma letra comum não são significativamente diferentes, pelo teste de Dunn,  $\alpha=0,05$  (Apêndice 2)

### 5.5 Solubilização de fosfato tricálcico

A produção de um halo transparente ao redor da colônia indica que o isolado bacteriano é positivo para a solubilização de fosfatos (Figura 2). A estirpe SEMIA 2076 foi a única que mostrou capacidade solubilizadora de fosfatos, alcançando valores estatisticamente iguais ao Índice de Solubilização de Fosfato (ISF) do controle positivo utilizado, a estirpe UFRGS-VP16 (Figura 3).



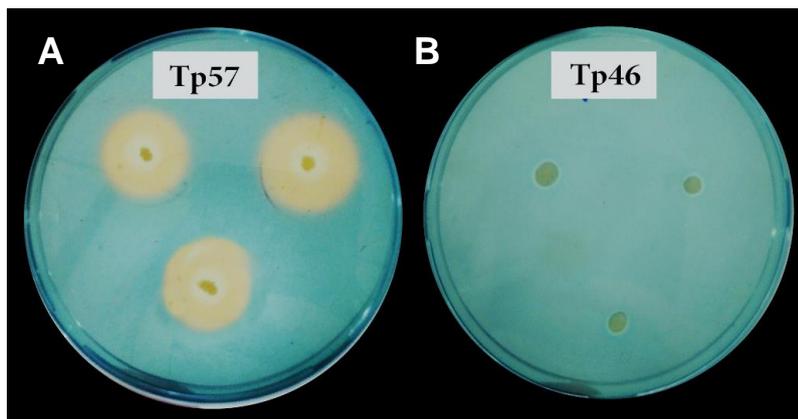
**Figura 2.** Controle positivo para solubilização de fosfatos (estirpe UFRGS-VP16)



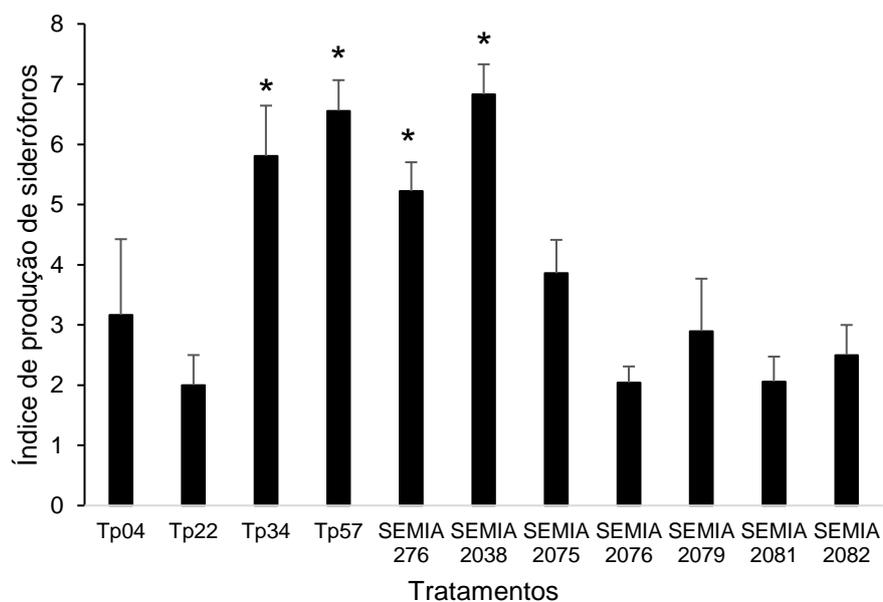
**Figura 3.** Índice de Solubilização de Fosfato da SEMIA 2076 e do controle positivo, estirpe UFRGS-VP16. Médias  $\pm$  DP de 3 repetições. Médias estatisticamente iguais pelo teste de Wilcoxon Mann Whitney,  $\alpha=0,05$  (Apêndice 2).

### 5.6 Produção de sideróforos

Um total de 11 isolados de rizóbios mostraram a capacidade de produção de sideróforos, observada por meio da formação de um halo de cor amarela (Figura 4). Quatro isolados foram autóctones: Tp04, Tp22, Tp34 e Tp57 e sete foram estirpes SEMIA: 2038, 276, 2075, 2079, 2082, 2081 e 2076. Os isolados que se destacaram foram os autóctones Tp57 e o Tp34 e as estirpes SEMIA 2038 e 276 (Figura 5), cujos valores de índice de produção de sideróforos superaram aos do resto de isolados de rizóbios (Tabela 6).



**Figura 4.** Produção de sideróforos indicada pela formação de um halo amarelo em volta da colônia. a) positivo e b) Isolado de rizóbio negativo.



**Figura 5.** Índice de produção de sideróforos obtido pelos isolados autóctones e estirpes SEMIA. \*Médias estatisticamente significativas pelo teste LSD Fisher,  $\alpha=0,05$  (Apêndice 2)

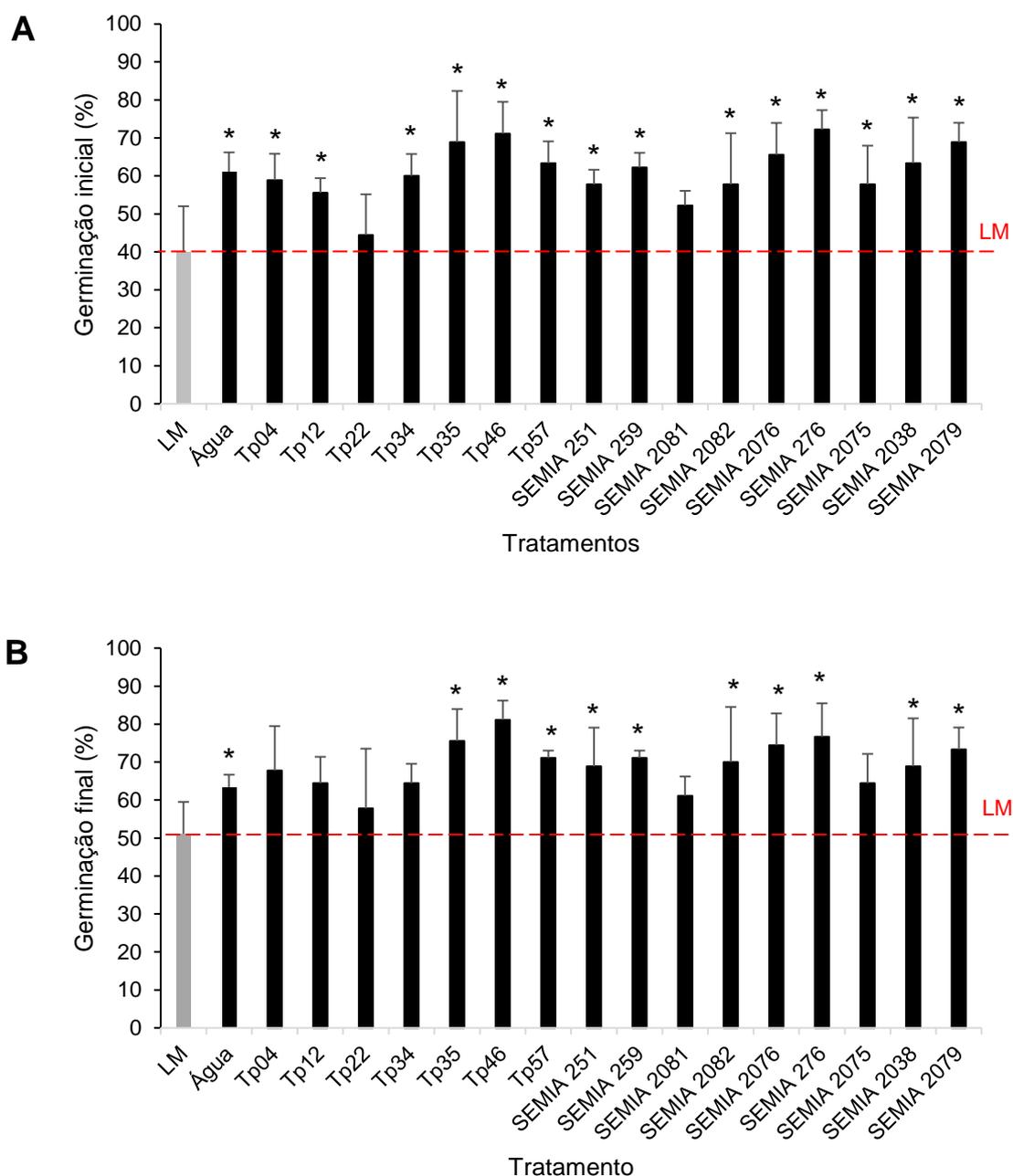
**Tabela 6.** Diâmetros de colônia e dos halos formados pelos isolados autóctones e estirpes SEMIA produtores de sideróforos.

Rizóbio	Diâmetro de colônia (mm)	Diâmetro de halo (mm)	Índice de produção de sideróforos	
Tp04	2,0 ± 0,0	6,3 ± 2,5	3,2 ± 1,2	cd
Tp22	2,7 ± 1,1	5,0 ± 1,0	2,0 ± 0,5	e
Tp34	4,0 ± 1,0	22,7 ± 2,5	5,8 ± 0,8	ab
Tp57	3,0 ± 0,0	19,7 ± 1,5	6,6 ± 0,5	a
SEMIA 276	2,3 ± 0,6	12,0 ± 1,7	5,2 ± 0,5	b
SEMIA 2038	3,0 ± 0,0	20,5 ± 1,5	6,8 ± 0,5	a
SEMIA 2075	4,0 ± 1,0	15,3 ± 4,0	3,9 ± 0,5	c
SEMIA 2076	3,6 ± 1,1	7,3 ± 1,5	2,0 ± 0,3	e
SEMIA 2079	6,3 ± 2,3	17,0 ± 0,0	2,9 ± 0,9	cde
SEMIA 2081	2,6 ± 0,6	5,3 ± 0,6	2,1 ± 0,4	de
SEMIA 2082	2,0 ± 0,0	5,0 ± 1,0	2,5 ± 0,5	de

Média ± DP de 3 repetições. Tratamentos com uma letra comum na mesma coluna não são significativamente diferentes, pelo teste LSD Fisher,  $\alpha=0,05$  (Apêndice 2)

### 5.7 Efeito da inoculação dos isolados de rizóbios na germinação de sementes de centeio (*Secale cereale*)

Todos os isolados autóctones e estirpes SEMIA com exceção de SEMIA2081 e Tp22 superaram o percentual de germinação do controle LM no primeiro dia de avaliação (Figura 6a). Já no final do experimento, só 7 estirpes SEMIA (276, 2076, 2079, 259, 2082, 251, 2038) e 4 isolados autóctones (Tp46, Tp35, Tp57 e Tp04) superaram o percentual de germinação do controle LM com um incremento de até 30% (Figura 6b). Comparados com o controle água, os isolado Tp46 e a estirpe SEMIA 276 o superaram no terceiro e quarto dia, mas no final do experimento só o isolado Tp46 foi superior (Tabela 7). O isolado Tp46 também foi o único com uma velocidade de germinação superior aos controles (Tabela 7).



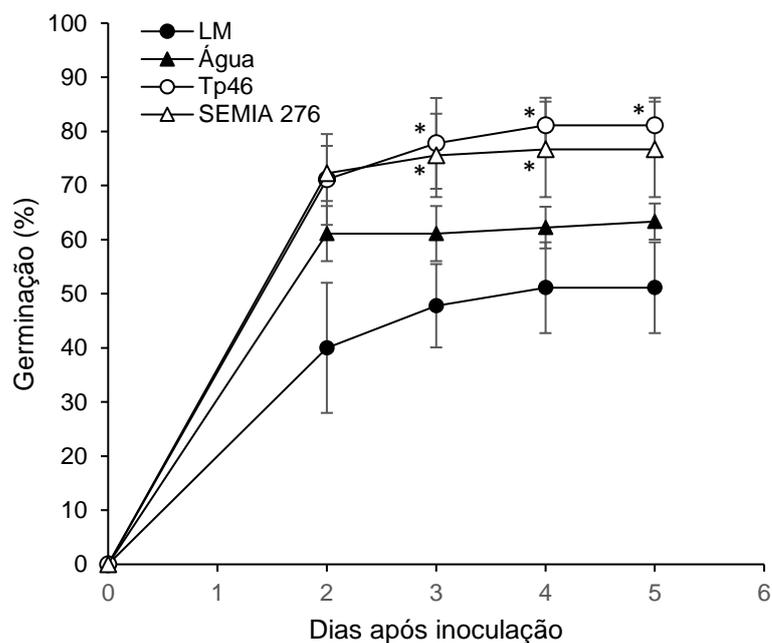
**Figura 6.** Efeito dos isolados de rizóbios e estirpes SEMIA nos percentuais de germinação de sementes de centeio ao a) início e b) final do experimento em placas. Barras de erro: desvio padrão. \* Médias estatisticamente significativas comparadas com o controle LM pelo teste LSD Fisher,  $\alpha=0,05$  (Apêndice 2).

**Tabela 7.** Percentuais de germinação e índice de velocidade de germinação dos isolados autóctones e estirpes SEMIA inoculados em sementes de centeio.

Tratamento	Germinação (%)				Velocidade de germinação
	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	
LM	40 ± 12,0	48 ± 7,7	51 ± 8,4	51 ± 8,4	7,0 ± 1,2
Água	61 ± 5,1	61 ± 5,1	62 ± 3,8	63 ± 3,3	9,3 ± 0,6
Tp04	59 ± 6,9	67 ± 13,3	68 ± 11,7	68 ± 11,7	9,7 ± 1,5
Tp12	56 ± 3,8	61 ± 6,9	63 ± 6,7	64 ± 6,9	9,1 ± 0,8
Tp22	44 ± 10,7	53 ± 12,0	57 ± 14,5	58 ± 15,8	7,9 ± 1,8
Tp34	60 ± 5,8	64 ± 5,1	64 ± 5,1	64 ± 5,1	9,4 ± 0,8
Tp35	69 ± 13,5	73 ± 8,8	76 ± 8,4	76 ± 8,4	10,9 ± 1,5
Tp46	71 ± 8,4	78 ± 8,4 *	81 ± 5,1 *	81 ± 5,1 *	11,6 ± 1,0 *
Tp57	63 ± 5,8	66 ± 5,1	71 ± 1,9	71 ± 1,9	10,1 ± 0,5
SEMIA 251	58 ± 3,8	62 ± 5,1	69 ± 10,2	69 ± 10,2	9,6 ± 1,0
SEMIA 259	62 ± 3,8	68 ± 5,1	70 ± 3,3	71 ± 1,9	10,1 ± 0,5
SEMIA 276	72 ± 5,1	76 ± 7,7 *	77 ± 8,8 *	77 ± 8,8	11,3 ± 1,1
SEMIA 2038	63 ± 12,0	68 ± 10,7	69 ± 12,6	69 ± 12,6	10,0 ± 1,8
SEMIA 2075	58 ± 10,2	61 ± 8,4	63 ± 8,8	64 ± 7,7	9,2 ± 1,2
SEMIA 2076	66 ± 8,4	68 ± 5,1	71 ± 3,8	74 ± 8,4	10,5 ± 1,1
SEMIA 2079	69 ± 5,1	71 ± 5,1	73 ± 5,8	73 ± 5,8	10,7 ± 0,8
SEMIA 2081	52 ± 3,8	58 ± 5,1	61 ± 5,1	61 ± 5,1	8,6 ± 0,7
SEMIA 2082	58 ± 13,5	69 ± 13,9	69 ± 13,9	70 ± 14,5	9,8 ± 1,8

Médias ± DP de 3 repetições. \*Tratamentos na coluna significativamente diferentes comparados com o controle água, pelo teste LSD Fisher,  $\alpha=0,05$  (Apêndice 2)

Na figura 7 pode-se observar a comparação individual dos percentuais de germinação dos controles e do isolado Tp46, o único que conseguiu superar ao controle água. Desde o primeiro dia de avaliação, o isolado Tp46 apresentou um incremento na germinação de 31% comparado com o controle LM e um incremento de 10% em relação ao controle água. O Tp46 se manteve superior até o final do experimento, incrementando a germinação em 18% em relação ao controle água e de 30% com o controle LM.



**Figura 7.** Percentual acumulado de germinação de sementes de centeio inoculadas com os rizóbios SEMIA 276 e Tp46, em comparação com os controles água e LM. Médias  $\pm$  DP de 3 repetições. \*Médias estatisticamente significativas comparadas com o controle LM pelo teste LSD Fisher,  $\alpha=0,05$  (Apêndice 2).

## 5.8 Eficiência dos isolados de rizóbios na FBN em trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.)

### 5.8.1. Avaliação *in vitro* da FBN

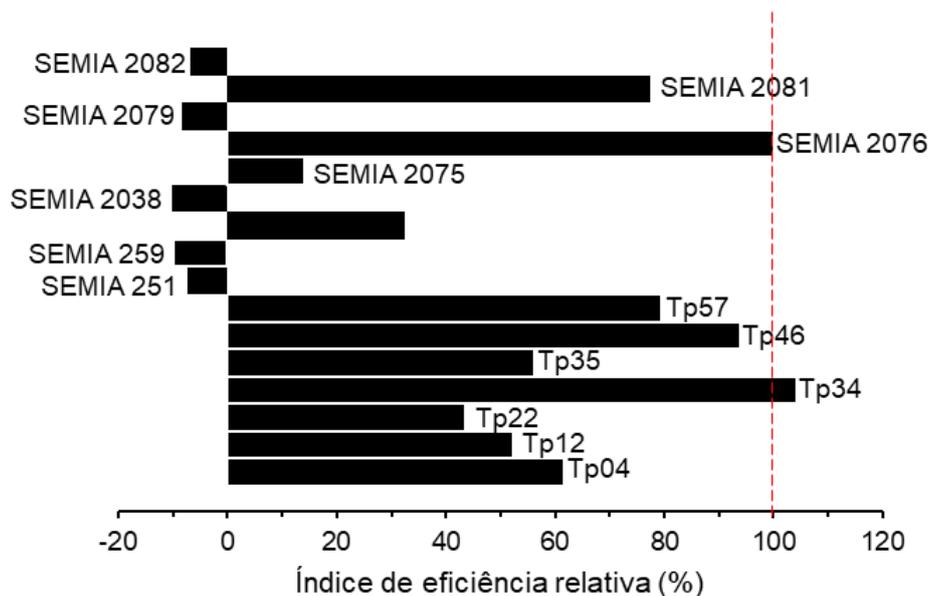
Os seguintes parâmetros foram avaliados nas plantas inoculadas: altura da planta, massa seca da parte aérea, massa seca de raiz, índice de eficiência relativa de fixação (IER) e nodulação. Na altura da planta, 5 isolados autóctones (Tp04, Tp12, Tp34, Tp35 e Tp46) e 3 estirpes SEMIA (2076, 2081, 276) superaram ao controle N- e igualaram ao N+ (Tabela 8). Na massa seca da parte aérea, só os isolados autóctones Tp34, Tp46 e Tp57 e as estirpes SEMIA 2076 e 2081 superaram ao controle N- e também igualaram ao N+ (Tabela 8). Conseqüentemente, os cinco rizóbios (Tp34, Tp46, Tp57, SEMIA 2076 e SEMIA 2081) tiveram os valores mais altos no IER, destacando-se o

isolado autóctone Tp34 quem superou o 100% de IER (Figura 8). Nenhum isolado autóctone obteve um valor negativo no IER. No caso das estirpes SEMIA, cinco delas (2082, 2079, 2038, 259 e 251) tiveram IER negativos (Figura 8). Na massa seca de raiz, os isolados Tp22, Tp34, Tp35 e estirpes SEMIA 2075, 2076 e 2081 superaram ao N- e igualaram ao N+ (Tabela 8). Porém, a SEMIA 2075 obteve um dos valores mais baixos de IER.

**Tabela 8.** Altura de planta, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e índice de eficiência relativa (IER) em plantas de trevo vermelho cultivar URS BRS Mesclador inoculadas com os isolados autóctones e estirpes SEMIA.

Tratamento	Altura de planta		MSPA		MSR		IER
	<i>cm</i>		<i>mg</i>				<i>%</i>
N+	10,0 ± 1,4	ab	11,1 ± 2,9	ab	3,2 ± 0,7	a	100,0
N-	5,3 ± 1,0	d	4,7 ± 0,6	cd	1,6 ± 0,5	de	0,0
Tp04	10,1 ± 1,7	ab	8,6 ± 1,0	abc	2,0 ± 0,5	bcd	61,6
Tp12	8,2 ± 1,4	abc	8,1 ± 1,2	abc	1,7 ± 0,3	cde	52,4
Tp22	7,4 ± 2,0	bcd	7,5 ± 2,1	bc	3,0 ± 0,2	a	43,6
Tp34	11,1 ± 1,7	a	11,3 ± 0,8	a	2,3 ± 0,3	abc	104,2
Tp35	9,8 ± 1,9	ab	8,3 ± 0,4	abc	2,3 ± 0,3	abcd	56,2
Tp46	10,9 ± 1,1	a	10,7 ± 1,4	ab	2,0 ± 0,5	bcd	93,8
Tp57	8,1 ± 0,9	abcd	9,8 ± 2,0	ab	1,9 ± 0,4	bcde	79,6
SEMIA 251	6,1 ± 1,1	cd	4,3 ± 0,4	d	1,7 ± 0,	cde	-7,4
SEMIA 259	5,4 ± 1,1	cd	4,1 ± 0,8	d	1,5 ± 0,7	de	-9,8
SEMIA 276	9,3 ± 1,8	ab	6,8 ± 1,0	bcd	1,8 ± 0,2	cde	32,6
SEMIA 2038	5,5 ± 1,3	cd	4,1 ± 0,7	d	1,2 ± 0,3	e	-10,1
SEMIA 2075	5,5 ± 0,5	cd	5,6 ± 0,2	bcd	4,4 ± 0,8	a	14,1
SEMIA 2076	9,3 ± 1,4	ab	11,1 ± 1,7	ab	2,5 ± 0,3	ab	100,2
SEMIA 2079	5,6 ± 1,3	cd	4,2 ± 0,6	d	2,2 ± 0,4	bcd	-8,3
SEMIA 2081	10,8 ± 0,9	a	9,6 ± 1,2	ab	2,5 ± 0,4	ab	77,3
SEMIA 2082	5,4 ± 0,7	cd	4,3 ± 0,2	d	1,7 ± 0,7	cde	-6,9
<b>CV (%)</b>	17,28		17,36		21,87		-

Tratamentos na mesma coluna com letra comum não são significativamente diferentes pelo teste de Dunn,  $\alpha=0,05$  (Apêndice 2)



**Figura 8.** Índice de eficiência relativa dos isolados autóctones e as estirpes SEMIA na avaliação *in vitro* da fixação de nitrogênio em trevo vermelho cultivar URS BRS Mesclador.

Na avaliação da nodulação nas plantas, nas condições do experimento observou-se que as estirpes que induziram nodulação foram as SEMIA 251, 259, 276, 2038, 2076, 2081 e 2082, e todos os isolados de rizóbios autóctones. Observou-se também que as plantas inoculadas com os isolados autóctones foram os primeiros na formação de nódulos eficientes e mantiveram-se dessa forma até o final do experimento. No caso das estirpes SEMIA, todos os nódulos observados na primeira semana eram de coloração branca no seu interior e ao final do teste somente as SEMIA 2081, 2076 e 276 formaram nódulos eficientes (Tabela 9). Além disso, as estirpes SEMIA 2079 e 2075 não conseguiram nodular as plantas.

**Tabela 9.** Nodulação em plantas de trevo vermelho cultivar URS BRS Mesclador inoculadas com isolados autóctones e estirpes SEMIA

Tratamento	Nodulação (nódulos. planta <sup>-1</sup> )				Fenótipo final
	Início		Final		
N+	-		-		-
N-	-		-		-
Tp04	3,0 ± 0,7	abc	5,4 ± 1,1	ab	Fix +
Tp12	1,2 ± 0,8	de	5,6 ± 2,1	ab	Fix +
Tp22	1,7 ± 1,0	cde	3,5 ± 0,5	bcde	Fix +
Tp34	3,9 ± 2,0	ab	4,8 ± 2,2	abc	Fix +
Tp35	1,8 ± 1,1	cde	6,0 ± 3,7	abc	Fix +
Tp46	1,3 ± 1,3	de	2,7 ± 1,3	cde	Fix +
Tp57	2,6 ± 1,9	bcd	6,6 ± 2,1	a	Fix +
SEMIA 251	-		6,6 ± 4,0	ab	Fix -
SEMIA 259	0,3 ± 0,8	e	0,8 ± 1,6	e	Fix -
SEMIA 276	1,0 ± 0,9	e	4,2 ± 1,3	abcd	Fix +
SEMIA 2038	-		2,3 ± 4,9	de	Fix -
SEMIA 2075	-		-		Nod -
SEMIA 2076	4,2 ± 1,6	a	5,7 ± 3,1	abc	Fix +
SEMIA 2079	-		-		Nod -
SEMIA 2081	1,7 ± 0,5	cde	4,2 ± 2,1	abcd	Fix +
SEMIA 2082	1,2 ± 0,8	de	4,5 ± 2,6	abcd	Fix -
<b>CV (%)</b>	62,26		62,32		

Tratamentos na mesma coluna com letra comum não são significativamente diferentes pelo teste de Dunn,  $\alpha=0,05$  (Apêndice 2)

#### 5.8.2. Avaliação em plantas de trevo vermelho cultivadas em vermiculita e areia em lampadário

Para esta avaliação foram selecionadas as estirpes SEMIA 2076, SEMIA 2081 e os isolados autóctones Tp34 e Tp46 porque apresentaram os maiores valores de IER (Figura 8). Na matéria seca da parte aérea observou-se que os quatro rizóbios superaram ao N-, e o isolado Tp34 e estirpe SEMIA 2081 conseguiram igualar ao N+ (Tabela 10). Na avaliação da massa seca de raiz não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 10). Observou-se que nos valores de nitrogênio total na parte aérea, o único rizóbio que conseguiu superar ao N- foi o isolado autóctone Tp34, com uma média de 0,522 mg de N total.

**Tabela 10.** Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e nitrogênio total em plantas de trevo vermelho cultivar URS BRS Mesclador inoculadas com os isolados Tp34, Tp46, SEMIA 2081 e SEMIA 2076.

Tratamento	MSPA (mg)		MSR (mg)		N total (mg)	
N+	15,6 ± 1,1	a	4,9 ± 1,4	n.s	0,542 ± 0,049	a
N-	6,7 ± 1,5	c	2,5 ± 1,0		0,005 ± 0,003	b
Tp34	14,7 ± 0,7	ab	5,7 ± 2,6		0,522 ± 0,020	a
Tp46	12,2 ± 2,3	b	5,8 ± 2,1		0,390 ± 0,070	ab
SEMIA 2081	14,2 ± 3,2	ab	5,8 ± 1,5		0,419 ± 0,146	ab
SEMIA 2076	12,4 ± 0,6	b	5,1 ± 0,5		0,442 ± 0,026	ab
<b>CV (%)</b>	14,36		-		18,15	

Médias ± DP de 3 repetições. Tratamentos na mesma coluna com letra comum não são significativamente diferentes pelo teste de LSD Fisher e Dunn,  $\alpha=0,05$  (Apêndice 2). n.s. não há significância

## 5.9 Avaliação dos isolados de rizóbios na promoção de crescimento em centeio (*Secale cereale* L.)

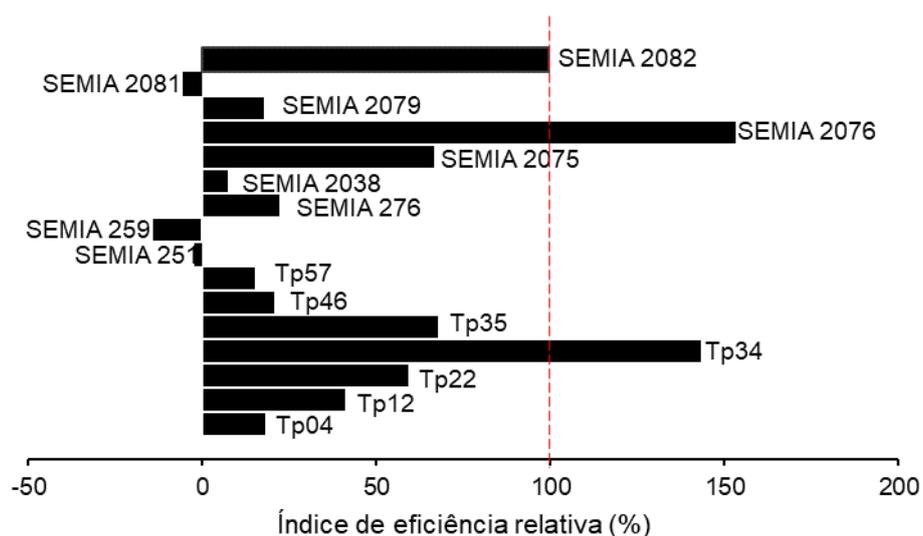
### 5.9.1. Avaliação *in vitro* da promoção de crescimento vegetal

Os dados de massa seca da parte aérea, massa seca de raiz, altura de planta, comprimento de raiz e índice de eficiência relativa são apresentados na Tabela 11. Os rizóbios Tp34, SEMIA 2076 e SEMIA 2082 obtiveram valores de massa seca da parte aérea superiores ao N 50%, e também igualaram ao N 100%. Em consequência, foram os rizóbios que alcançaram os maiores valores de eficiência relativa na promoção de crescimento, superando o 100% no caso da SEMIA 2076 e Tp34 (Figura 9). Na massa seca de raiz, unicamente os isolados autóctones Tp34 e Tp35 superaram ao N 50%, e deles, o Tp34 superou também ao N 100%. Observou-se que os isolado Tp34 também superou ao valor de altura de planta do N 50%, junto com as SEMIA 2076 e 2082, porém, foi o único que conseguiu superar ao N 100% na altura de planta. No comprimento de raiz, nenhum rizóbio superou ao N 50%.

**Tabela 11.** Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), altura de planta, comprimento de raiz e índice de eficiência relativa em plantas de centeio inoculadas com os isolados autóctones e estirpes SEMIA

Tratamento	MSPA	MSR	Altura da planta	Comprimento de raiz	IER
	<i>mg</i>			<i>cm</i>	%
N 100%	12,4 ± 1,3	2,2 ± 0,5	26,2 ± 3,3	7,0 ± 1,5	100,0
N 50%	9,4 ± 2,2	2,3 ± 0,7	23,9 ± 6,1	8,4 ± 1,1	0,0
Tp04	10,0 ± 2,8	1,2 ± 0,4	21,1 ± 1,4	5,1 ± 2,2	18,3
Tp12	10,7 ± 1,6	3,3 ± 0,7	24,1 ± 6,2	6,4 ± 1,2	41,3
Tp22	11,2 ± 1,4	2,3 ± 0,6	25,6 ± 2,0	7,5 ± 1,8	59,6
Tp34	13,7 ± 3,1	* 5,7 ± 1,8	** 30,8 ± 1,3	** 11,6 ± 3,2	143,4
Tp35	11,5 ± 1,4	4,2 ± 0,6	* 24,1 ± 4,3	8,8 ± 2,9	68,1
Tp46	10,1 ± 0,8	2,5 ± 1,2	25,9 ± 3,4	5,8 ± 1,1	21,0
Tp57	9,9 ± 1,4	1,5 ± 0,4	23,3 ± 3,0	7,3 ± 1,9	15,5
SEMIA 251	9,4 ± 1,4	1,8 ± 0,3	23,9 ± 3,6	5,0 ± 1,1	-2,4
SEMIA 259	9,0 ± 1,3	1,6 ± 0,5	24,1 ± 5,8	5,9 ± 0,9	-14,6
SEMIA 276	10,1 ± 0,3	2,1 ± 0,5	24,6 ± 4,8	6,2 ± 0,7	22,3
SEMIA 2038	9,7 ± 0,6	2,0 ± 0,5	26,6 ± 2,4	6,3 ± 1,9	7,5
SEMIA 2075	11,4 ± 2,0	2,2 ± 0,4	27,9 ± 4,7	7,2 ± 1,7	67,1
SEMIA 2076	14,0 ± 2,3	* 3,6 ± 1,4	30,8 ± 3,3	* 10,8 ± 3,3	153,6
SEMIA 2079	10,0 ± 1,5	2,3 ± 1,0	26,0 ± 3,9	8,3 ± 1,5	17,9
SEMIA 2081	9,3 ± 1,4	1,4 ± 0,6	22,2 ± 5,0	7,1 ± 1,9	-5,5
SEMIA 2082	12,4 ± 0,9	* 2,0 ± 0,9	31,4 ± 4,2	* 8,7 ± 1,7	99,5
<b>CV (%)</b>	15,6	32,76	16,52	24,53	-

\*Tratamentos na coluna significativamente diferentes comparados com o controle N 50% e \*\* com o controle N 100%, pelo teste LSD Fisher e de Dunn,  $\alpha=0,05$  (Apêndice 2)



**Figura 9.** Índice de eficiência relativa dos isolados autóctones e as estirpes SEMIA na avaliação *in vitro* da promoção de crescimento em centeio.

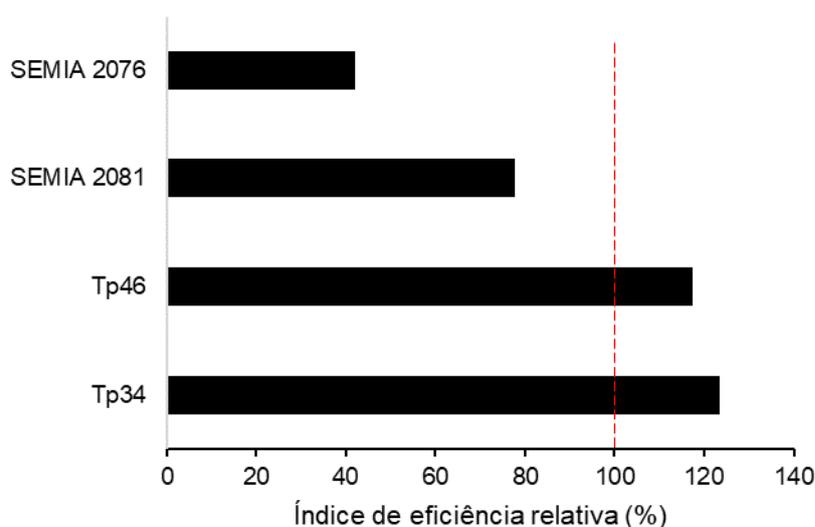
#### 5.9.2. Avaliação em plantas de centeio cultivadas em vermiculita e areia em lampadário

Os parâmetros massa seca da parte aérea, massa seca de raiz, altura da planta, e eficiência relativa foram avaliados nas plantas inoculadas com a SEMIA 2076, 2081, Tp34 e Tp46 (Tabela 12). Na produção de massa seca da parte aérea, observou-se que os isolados autóctones Tp46 e Tp34 superaram o valor do controle N 50%, e também igualaram ao valor do N 100%. Em consequência tiveram valores altos no índice de eficiência relativa, 117 e 123%, respectivamente. Nenhum dos tratamentos teve valores negativos no IER (Figura 10). Na massa seca de raiz, unicamente a estirpe SEMIA 2076 superou o controle N 50%. Na altura de planta todos os tratamentos superaram ao controle N 50%, e 3 deles (Tp34, Tp46, SEMIA 2076) superaram também ao controle N 100%.

**Tabela 12.** Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), altura de planta e índice de eficiência relativa em plantas de centeio inoculadas com os rizóbios Tp34, Tp46, SEMIA 2076 e SEMIA 2081.

Tratamento	MSPA		MSR		Altura de planta		IER
		mg			cm	%	
N 100%	30,3 ± 4,7	a	60,0 ± 10,1	abc	29,5 ± 3,9	c	100,0
N 50%	25,6 ± 4,9	b	48,7 ± 11,4	bcd	24,6 ± 4,3	d	0,0
Tp34	33,8 ± 3,8	a	67,6 ± 12,0	ab	35,9 ± 2,2	a	123,5
Tp46	33,3 ± 8,8	a	48,2 ± 11,5	cd	34,7 ± 5,4	ab	117,3
SEMIA 2076	27,2 ± 3,2	ab	69,5 ± 9,1	a	33,2 ± 3,9	ab	42,0
SEMIA 2081	30,1 ± 5,7	ab	38,2 ± 8,4	d	31,5 ± 3,3	bc	77,8
<b>CV (%)</b>	17,02		18,99		12,64		-

Médias ± DP de 5 repetições. Tratamentos na mesma coluna com letra comum não são significativamente diferentes pelo teste de LSD Fisher e Dunn,  $\alpha=0,05$  (Apêndice 2).

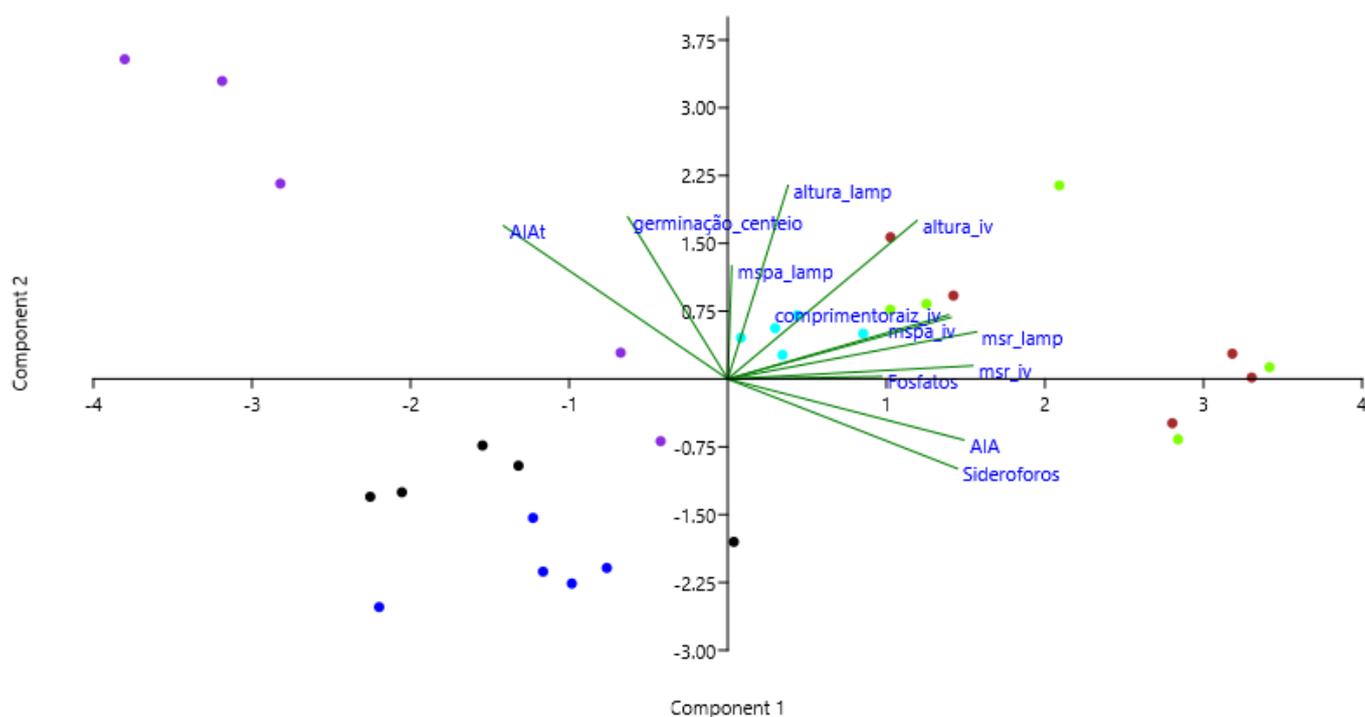


**Figura 10.** Índice de eficiência relativa de promoção de crescimento em plantas de centeio inoculadas com os isolados autóctones Tp34 e Tp46 e as estirpes SEMIA 2076 e 2081.

Através da análise de componentes principais (ACP) observou-se que os isolados SEMIA 2076 e Tp34 foram semelhantes ao controle N 100% e tiveram uma maior influência na promoção de crescimento em centeio quando comparadas com a SEMIA 2081 e o isolado Tp46, sendo uma maior massa seca aérea e de raiz (*in vitro* e no lampadário), maior altura (*in vitro* e no

lampadário) (Figura 11).

A produção de AIA com a adição de triptofano ao meio de cultura LM teve correlação com a germinação de sementes em centeio, enquanto a produção de sideróforos e as solubilização de fosfatos estão correlacionadas com as variáveis de massa seca, comprimento de raiz e altura da planta.



**Figura 11.** Análise de componentes principais dos parâmetros relacionados à promoção de crescimento de centeio quando inoculados com os isolados de rizóbios Tp34 (vermelho) e Tp46 (roxo), e as estirpes SEMIA 2076 (verde) e 2081 (preto) e comparados com os controles N 100% (celeste) e N 50% (azul). AIA<sub>t</sub>= produção de ácido indol-acético com adição de triptofano, AIA = produção de ácido indol acético sem adição de triptofano, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, altura da planta *in vitro* e em lampadário, MSPA= massa seca da parte aérea *in vitro* e no lampadário, MSR = massa seca de raiz *in vitro* e no lampadário e germinação de sementes em centeio. Variabilidade total= 53,5%.

## 6. DISCUSSÃO

Para este estudo, foram obtidos isolados de rizóbios autóctones simbiotes com o trevo vermelho, cultivar URS BRS Mesclador, de amostras de solo provenientes de áreas sem histórico de cultivo desta espécie forrageira, que é uma planta introduzida no país. Isto pode ser explicado pela presença de outras leguminosas forrageiras, incluindo outra espécie de trevo (*Trifolium repens* ou trevo branco) nesses solos. Se sabe que *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* nodula espécies de trevos (CIEŚLA et al., 2016) e é provável que este microrganismo esteve presente no solo com o trevo branco e por isso foi capaz também de nodular ao trevo vermelho. No caso dos solos com outras forrageiras, possivelmente o rizóbio foi parte de uma população autóctone que se encontrava em forma de vida livre na rizósfera dessas forrageiras, e quando entrou em contato com o trevo vermelho fez associação simbiótica com ele. Resultados semelhantes foram observados em trabalhos com *Lotus glaber* (FONTOURA et al. (2011), onde os autores selecionaram rizóbios eficientes de solo de áreas sem histórico deste cultivo, e no estudo de CUBILLOS-HINOJOSA et al. (2021), onde se selecionaram rizóbios eficientes com *Leucaena* a partir de solos com *Desmodium* sp., bracatinga (*Mimosa* sp.), maricá (*Mimosa bimucronata*) e ingá (*Inga marginta*).

Na autenticação dos isolados obtidos, se observaram plantas de trevo vermelho sem nódulos, indicando que aqueles isolados não eram rizóbios, os quais foram descartados. Porém, se observaram também plantas com nódulos brancos, o que indica uma ineficiência na FBN. Isto pode ser explicado porque mesmo sabendo que *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* tem uma faixa de hospedeiros limitados para espécies do gênero *Trifolium*. (KUMAR et al., 2015), se tem evidenciado nodulações não efetivas entre *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* e trevos. Algumas cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* são efetivas em *Trifolium subterraneum* mas parcialmente efetivas em *Trifolium pratense*, ou estirpes que são totalmente efetivas em *Trifolium ambiguum* porém não efetivas em *Trifolium pratense* (MAREK-KOZACZUK et al., 2017).

Dos 40 isolados de rizóbios autenticados, sete foram selecionados pela diversidade das características da amostra de solo de onde foram isoladas

(Tabela 3). Junto com as estirpes SEMIA 251, SEMIA 259, SEMIA 276, SEMIA 2038, SEMIA 2075, SEMIA 2076, SEMIA 2079, SEMIA 2081 e SEMIA 2082 foram avaliados quanto à morfologia colonial e todos apresentaram características coloniais típicas de rizóbios (bordo liso, forma circular, elevação convexa e superfície brilhosa). Quanto ao crescimento colonial (Tabela 4), os isolados autóctones e estirpes SEMIA tiveram colônias de 3-7 mm aos 6 dias de incubação, característica relacionada ao gênero *Rhizobium*, que é caracterizado por um crescimento rápido, geralmente de 2-4 mm de diâmetro aos 3-5 dias de incubação, com colônias circulares, convexas e de reação ácida em meio LMA (WANG et al., 2001). As estirpes SEMIA 2075 e 2076 foram as únicas estirpes que não tiveram esse crescimento colonial rápido, já que ao sexto dia de incubação, suas colônias tinham 1,5 - 2 mm de diâmetro. Além disso, não mostraram acidificação no meio de cultura, indicando-nos que é provável que não estejam relacionadas ao gênero *Rhizobium*.

No nosso estudo, tanto os isolados autóctones quanto as estirpes SEMIA apresentaram a capacidade de produção de ácido indol acético em meio LM com e sem adição de triptofano, considerada uns dois mecanismos mais estudados para avaliar a capacidade na promoção de crescimento (BORGES et al., 2019). O rizóbio que se destacou foi o isolado autóctone Tp46 com uma média de  $5.33 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  (Tabela 5). Este valor é baixo comparado com os resultados encontrados na literatura, tais como o estudo de CHAGAS-JÚNIOR et al. (2009), onde se obtiveram valores de produção de AIA na faixa de 12 – 1232  $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$ , ou mais recentemente no estudo de MACHADO et al. (2018), onde se teve um valor máximo de  $60.7 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de AIA. Porém, sabe-se que certos fito-hormônios (por exemplo auxinas, etileno) estimulam o crescimento da planta dentro de uma janela estreita de baixa concentração (BISWAS et al., 2000). Uma alta produção deste hormônio pode ter um efeito prejudicial ao desenvolvimento das plantas, como observado no trabalho de SCHLINDWEIN et al. (2008). Estes autores avaliaram a influência da inoculação de rizóbios em germinação de alface em que o isolado TV-13 teve um valor de produção de AIA de  $171.1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , sendo 100 vezes maior do que os outros isolados avaliados, mas deletéria para as plântulas de alface, enquanto os isolados que produziram entre  $1.2\text{-}3.3 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  foram os melhores. Resultados semelhantes foram observados no estudo de MACHADO et al.

(2018), onde a bactéria com maior produção de AIA foi o pior tratamento na promoção de crescimento em casa de vegetação. No presente estudo, os resultados mostraram que o rizóbio Tp46 incrementou a germinação de sementes de centeio em 30% em relação ao controle LM (Tabela 7). Em razão deste efeito estimulatório, parece que as quantidades de AIA produzidas por Tp46 se encontram dentro de uma faixa benéfica para a planta.

Outro mecanismo de promoção de crescimento muito estudado é a solubilização de fosfatos. Rizóbios e rizobactérias solubilizadoras de fosfatos incrementam o conteúdo de fósforo e o crescimento em plantas leguminosas e não leguminosas (PEIX et al., 2001, LARA et al., 2011). No presente estudo, apenas a estirpe SEMIA 2076 apresentou capacidade para solubilização de fosfato tricálcico apresentando um índice de solubilização de fosfato (ISF = diâmetro do halo/diâmetro de colônia) de 2.42 no final do experimento, igualando ao controle positivo VP16 (Figura 3). Este resultado é semelhante com os valores obtidos no estudo de CHAGAS-JUNIOR et al. (2010), onde os autores reportaram que 85% dos seus rizóbios solubilizadores de fosfatos tiveram um ISF baixo (menor a 2), e 13% tiveram um valor médio (2-4). A estirpe SEMIA 2076 teve valores maiores de ISF comparado com os resultados obtidos por BARROS et al. (2015) no seu estudo de rizóbios de nódulos de *Cajanus cajan* onde o valor máximo de ISF foi de 1.53. A capacidade de solubilização da estirpe SEMIA 2076 foi precoce porque houve formação de halo ao redor da colônia desde o primeiro dia após inoculação.

Um dos mecanismos mais usados pelas bactérias para solubilizar fosfatos é a produção extracelular de ácidos orgânicos, os quais formam complexos com os íons metálicos associados ao fosforo e tornam ele numa forma solúvel (CORRALES et al., 2014). A estirpe SEMIA 2076 não mostrou acidificação do meio (Tabela 4), o que descarta a possibilidade de ser produtora de ácidos. Resultados similares foram observados no estudo de CHAGAS-JUNIOR et al. (2010), no qual isolados solubilizadores de fosfatos alcalinizaram ou não alteraram o pH do meio.

Neste estudo, onze isolados produziram sideróforos no meio CAS com valores de IPS na faixa de 1,5 – 7,3 e diâmetro de halo na faixa 5 – 23 mm. Os isolados que se destacaram foram os rizóbios autóctones Tp57 e Tp34 e as estirpes SEMIA 2038 e 276 (Figura 5), cujos diâmetros de produção de

sideróforos foram 19,7, 22,7 e 20,5 e 12,0 mm respectivamente (Tabela 6). Estes valores foram maiores comparados com os resultados obtidos por OGUTCU & AVSAR (2020), onde os autores observaram diâmetros de halo na faixa de 9 – 12.5 mm, e no estudo de HARSHITHA et al. (2020) em rizóbios de *Cajanus cajan*, onde observaram diâmetros de halo na faixa de 6.5 – 10.5 mm. Dos quatro rizóbios mencionados, o isolado Tp34 teve um alto valor de IER na promoção de crescimento em centeio (Figura 10), pode ser a produção de sideróforos um mecanismo potencial para ele na promoção de crescimento.

Na germinação de sementes inoculadas pelos rizóbios deste estudo, o isolado autóctone Tp46 alcançou um percentual de germinação de 81%, proporcionando um aumento de 18 % no percentual de germinação comparado com o controle água (Tabela 7). Além disso, as sementes inoculadas com o Tp46 apresentaram uma velocidade de germinação de 11,6 sementes por dia, sendo superior ao controle água. Esses valores são menores em relação aos obtidos no estudo de SCHLINDWEIN et al. (2008), em que rizóbios do gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* foram inoculados em sementes de alface e produziram percentuais de germinação na faixa de 84 – 96.5 % e velocidades de germinação maiores a 15. STROSCHEIN et al. (2011), também descrevem que os rizóbios alcançaram percentuais de germinação maiores que 90% e valores na velocidade de germinação maiores que 20. Porém é importante destacar que na cultivar BRS Serrano de centeio, a germinação esperada é de 60% e com o uso do isolado Tp46, esta chegou a 80%. Existem estudos que demonstram que os benefícios da inoculação de rizóbios em não leguminosas pode começar desde a germinação de sementes. No estudo de STROSCHEIN et al. (2011) os autores concluíram que a inoculação com rizóbios acelerou o processo e o crescimento das plântulas de arroz. Da mesma forma, HAHN et al. (2016) descreveram que o rizóbio UFRGS Lc348 acelerou a germinação inicial de um cultivar de arroz em mais de 38%. Por outro lado, nas fases iniciais do desenvolvimento de plantas, a inoculação de rizóbios produtores de AIA pode incrementar a velocidade de germinação de sementes inoculadas como observado por SCHLINDWEIN et al. (2008) e VARGAS et al. (2009). Em nosso estudo se observou que o isolado de rizóbio Tp46 foi quem se destacou na produção de AIA e também na germinação de sementes. Porém, não é possível estabelecer uma correlação nestas variáveis, porque se observou também que

o isolado Tp35 proporcionou um alto valor de germinação (Tabela 7) e teve um dos mais baixos valores de produção de AIA (Tabela 5). Outros compostos sintetizados por estes rizóbios podem estar influenciando a germinação de sementes de centeio, como a produção de giberelinas, as quais são hormônios que atuam em processo de quebra de dormência e emergência da plântula (FLORENTINO et al., 2017).

No teste *in vitro* de promoção de crescimento se destacaram as estirpes SEMIA 2076 e o isolado autóctone Tp34, os quais alcançaram uma IER maior ao 100% (Figura 9), considerando-se a produção de massa seca da parte aérea. No teste de promoção de crescimento com plantas em substrato esterilizado de vermiculita e areia, os resultados variaram. O isolado Tp34, manteve uma forte influência positiva na promoção de crescimento, mas a estirpe SEMIA 2076 não teve um ótimo resultado (Figura 10). Caso contrário aconteceu com o isolado Tp46, que não mostrou bons resultados no teste *in vitro*, mas se destacou no teste com plantas em substrato esterilizado. Os resultados mostram que é necessária a realização de experimentos a campo para se avaliar esses rizóbios. DA SILVA (2016) em seu estudo de plantas de aveia inoculadas com rizóbios para avaliação na promoção de crescimento, também observou que a inoculação foi estatisticamente igual ao controle N+, quanto ao acumula de massa seca da parte aérea. Por outro lado, STROSCHEIN et al. (2011) também observaram que a inoculação de rizóbios em sementes de arroz promoveram aumento na altura das plantas.

Na avaliação da FBN *in vitro*, os isolados que se destacaram foram novamente a estirpe SEMIA 2076 e o rizóbio autóctone Tp34, com valores de IER de 100,2% e 104,2%, respectivamente (Tabela 8), superando ambos ao controle N+. Cabe destacar que todos os isolados autóctones induziram a nodulação de forma eficiente em plantas de trevo vermelho cultivar URS BRS Mesclador, e no caso das estirpes SEMIA, quatro delas não apresentaram uma fixação eficiente (SEMIA 251, 259, 2038 e 2082) resultando em valores de IER muito baixos (Figura 8). Já as estirpes SEMIA 2075 e SEMIA 2079 não induziram a formação de nódulos nas raízes de Trevo vermelho (cultivar URS BRS Mesclador), nas condições de realização do experimento. Na avaliação da FBN em plantas cultivadas em substrato vermiculita e areia foram observadas diferenças quanto ao N total, sendo que o isolado autóctone Tp34

foi o único que superou ao controle N-, com uma média de 0,522 mg de N por planta (Tabela 10).

As estirpes SEMIA 2081 e SEMIA 2082 são as liberadas pelo MAPA (SDA, 2011) para a produção de inoculantes para Trevo vermelho. No entanto, nossos resultados de avaliação da Fixação Biológica de Nitrogênio em plantas da cultivar URS BRS Mesclador de Trevo vermelho *in vitro*, mostraram que a estirpe SEMIA 2082 não induziu a nodulação eficiente. Já no experimento com plantas de Trevo vermelho cultivadas em substrato areia e vermiculita esterilizada, a inoculação com a estirpe SEMIA 2081, produziu o menor valor de nitrogênio total (Tabela 10). Isto confirma a importância da seleção de estirpes fixadoras de nitrogênio para esta nova cultivar.

Os isolados autóctones Tp34 e Tp46 mostraram um grande potencial para estudos futuros, principalmente o isolado Tp34, com uma eficiência relativa da FBN superior às das estirpes SEMIA 2081 e SEMIA 2082, atualmente recomendadas para produção de inoculantes para o trevo vermelho. É importante destacar também a estirpe SEMIA 2076, sendo que foi a única estirpe com morfologia colonial diferente ao gênero *Rhizobium* e que induziu a nodulação eficiente em plantas de trevo vermelho URS BRS Mesclador (Tabela 9). Além disso, teve uma boa capacidade na promoção de crescimento em centeio, alcançando uma IER de 100% no experimento *in vitro* (Figura 9).

Atualmente não existem trabalhos de seleção de estirpes na cultivar URS BRS Mesclador de trevo vermelho, sendo estes resultados uma base importante para a futura produção de inoculantes para este cultivo. Em função dos resultados obtidos neste trabalho, os isolados Tp34 e Tp46 apresentam potencial para serem considerados em estudos de seleção de estirpes a campo para a nova cultivar de trevo vermelho URS BRS Mesclador.

## 7. CONCLUSÕES

Existem rizóbios autóctones nos solos do Rio Grande do Sul que são capazes de formar simbiose com a nova cultivar de trevo vermelho URS BRS Mesclador.

Dos rizóbios estudados, o isolado Tp46 se destaca na produção de AIA, a SEMIA 2076 na solubilização de fosfatos, e os isolados Tp57, Tp34 e estirpes SEMIA 2038 e SEMIA 276 na produção de sideróforos.

Os isolados de rizóbios Tp34 e Tp46 apresentam uma alta eficiência simbiótica em plantas de trevo vermelho cultivar URS BRS Mesclador e promovem o crescimento em centeio BRS Serrano.

Nas condições do nosso trabalho, os isolados Tp46 e Tp34 são mais eficientes do que as estirpes SEMIA 2081 e SEMIA 2082, recomendadas pelo MAPA como inoculantes para o trevo vermelho.

Os isolados Tp34 e Tp46 apresentam potencial para serem considerados em estudos de seleção a campo para a nova cultivar de trevo vermelho.

## 8. REFERÊNCIAS

- Aguado GA, Moreno B, Jiménez B, García E, Preciado RE. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35(1): 9–21.
- Almeida GA, Costa C, Monteiro ALG, Garcia, CA, Munari DP, Neres MA. 2004. Desempenho, características de carcaça e resultado econômico de cordeiros criados em *creep feeding* com silagem de grãos úmidos de milho. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 33(4): 1048–1059.
- Alves JB, Sá ELS, Muniz AW. 2011. Seleção de rizóbios para o *Trifolium repens* em condições de solo alagado. *Biotemas*. 25(1).
- Amdahl H. 2016. Improving the seed yield potential of tetraploid red clover (*Trifolium pratense* L.). Tese – Department of Plant Sciences, Norwegian University of Life Sciences, Norway.
- Angulo VC, Sanfuentes EA, Rodríguez F, Sossa KE. 2014. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina Microbiología*. 46(4):338–347.
- Asghar HN, Zahir ZA, Arshad M, Khaliq A. 2002. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*. 35(4):231–237.
- Asseng S, Zhu Y, Basso B, Wilson T, Cammarano D. 2014. Simulation Modeling: Applications in Cropping Systems. In *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. Vol. 5. pp. 102–112.
- Ball DM, Hoveland CS, Lacefield GD. 2007. Southern forages. International Plant Nutrition Institute (IPNI), Georgia. 4.edição. 322 p.
- Banerjee S, Palit R, Sengupta C, Standing D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science*. 4(6): 378–383.
- Barreto PM. 2007. Caracterização e análise da diversidade genética da Coleção Nuclear de Germoplasma de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) a través de marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande de Sul, Porto Alegre.
- Barros B, Souto T, de Oliveira A, Ferreira EPB, Didonet CCG. 2015. Solubilização

- de fosfato inorgânico por bactérias do gênero *Rhizobium* obtidos de nódulos de *Cajanus Cajan*. *Revista de Biotecnologia e Ciência*. 4(1).
- Bécquer CJ. 2002. La simbiosis leguminosa-rizobio: características generales e importancia productiva. *Pastos y Forrajes*, vol. 25(2). 63 p. Disponível em: <[link.gale.com/apps/doc/A146835064/IFME?u=anon~541d0089&sid=google Scholar&xid=1560cd3f](http://link.gale.com/apps/doc/A146835064/IFME?u=anon~541d0089&sid=google Scholar&xid=1560cd3f)>. Acesso em: 6 Feb. 2022.
- Belizário KK. 2016. Produtividade e qualidade fisiológica de sementes de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) na região serrana de Santa Catarina. Dissertação (Mestre em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.
- Beltrán ME. 2014. Bacterias solubilizadoras de fosfato con potencial biofertilizante en suelos cultivados con papa (*Solanum tuberosum*). *Revista Agronomía* 22(2): 7–20.
- Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*. 17(8):478–486.
- Binotto E, Medeiros SLP, Manfron PA, Casaroli D, Simon J, Neto DD, de Jong van Lier Q, Santos OS, Muller L. 2007. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja: Revisão. *Revista Da FZVA*. 14(1): 89–106.
- Biswas JC, Ladha JK, Dazzo FB, Yanni IG, Rolfe BG. 2000. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agronomy Journal*. 92(5): 880-886.
- Boller B, Schubiger FX, Kölliker R. 2010. Red Clover. In *Fodder Crops and Amenity Grasses* (pp. 439–455). Springer New York.
- Borges CS, Saccol de Sá EL, Wuniz AW, Osorio-Filho BD. 2019. Potential use of rhizobium for vegetable crops growth promotion. *African Journal of Agricultural Research*. 14(8): 477–483.
- Bottomley PJ, Myrold DD. 2015. Biological N inputs. In *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Fourth Edition. pp. 447–470.
- Britannica. "auxin". Encyclopedia Britannica. Disponível em: <<https://www.britannica.com/science/auxin>>. Acesso em 7 Feb. 2022.
- Brockwell J, Hely FW, Neal-smith CA. 1966. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal*. 6(23): 365-370
- Burger JA, Zippers CE. 2018. How to restore forests on surface-mined land.

- Virginia Cooperative Extension, publication 460-123.
- Cantaro H, Huaranga A, Zúñiga D. 2019. Efectividad simbiótica de dos cepas de *Rhizobium* sp. en cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Perú. *Idesia*, 37(4): 73–81.
- Chagas-júnior AF, Oliveira LA, Oliveira AN. 2009. Produção de ácido indol acético por rizóbios isolados de caupi. *Revista Ceres*. 56(6): 812–817.
- Chagas-júnior AF, Oliveira LA, Oliveira AN, WILLERDING AL. 2010. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 32(2):359–366.
- Cieśła J, Kopycińska M, Łukowska M, Bieganowski A, Janczarek M. 2016. Surface properties of wild-type *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* strain 24.2 and its derivatives with different extracellular polysaccharide content. *PLoS ONE*. 11(10).
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka EA. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology*. 71:4951-4959.
- Corrales L, Arévalo Z, Moreno V. 2014. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA - Publicación Científica En Ciencia Biomédicas*. 12(21): 67–79.
- Costa NL, Avelar J, Ramalho C, Tadeu V. 2004. Fisiologia e manejo de plantas forrageiras. 1º Edição. Embrapa Rondônia.
- Cubillos-Hinojosa J, da Silva-Araujo F, Saccol-de Sá E. 2021. Rizóbios nativos eficientes en la fijación de nitrógeno en *Leucaena leucocephala* en Rio Grande do Sul, Brasil. *Bioteχνología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 19(1):128–138.
- Dall’agnol M, Montardo DP, Weiler RL, Köpp MM, Ferreira JL, Mills A, Simioni C, Brunet AP. 2021. URS BRS Mesclador—the first red clover cultivar bred in southern Brazil. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*.
- Da Silva F. 2016. Seleção de rizóbios nativos simbiotes de *Desmodium incanum* e avaliação da promoção de crescimento de gramíneas. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Da Silva F. 2020. Comunicação pessoal.

- Dazzo FB, Hubbell DH. 1975. Cross-Reactive Antigens and Lectin as Determinants of Symbiotic Specificity in the *Rhizobium*-Clover Association. *Applied microbiology*, 30(6): 1017–1033.
- Díez A. 2019. Análisis genómico y funcional de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2 como bioinoculante agrícola y estudio de la regulación del operón celABC en la biosíntesis de celulosa bacteriana. Tese – Universidad de Salamanca, Salamanca.
- Dos Santos FL, Da Silva FB, Sá ELS, Vian AL, Muniz AW, Dos Santos RN. 2019. Inoculation and co-inoculation of growth promoting rhizobacteria in irrigated rice plants. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 14(3).
- Egan LM, Hofmann RW, Ghamkhar K, Hoyos V. 2021. Prospects for Trifolium Improvement Through Germplasm Characterisation and Pre-breeding in New Zealand and Beyond. *Frontiers in Plant Science*. 12:1–19.
- Ferguson S, Major AS, Sullivan JT, Bourke SD, Kelly SJ, Perry BJ, Ronson CW. 2020. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NodD2 Enhances Competitive Nodule Colonization in the Clover-Rhizobium Symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 86(18):
- Fernandes M, Fernandes R, Hungria M. 2003. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 38(7):835–842.
- Ferri CM, Sáenz AM, Jouve VV. 2015. Terms of frequent use in topics of pasture production and utilization. *Revista de la Facultad de Agronomía UNLPam*. 25(1): 41–61.
- Florentino L, Silva AB, Landgraf P, Souza F. 2017. Inoculação de bactérias produtoras de ácido 3-indol acético em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 11(1):88–96.
- Fontaneli RS, Pereira H, Roberto S, Fontaneli S (eds). 2012. Forrageiras para Integração Lavoura-Pecuária-Floresta na Região Sul-Brasileira. Segunda edição. 544 p.
- Fontoura R, Frizzo ML, Saccol de Sá EL, Osorio-Filho B, Tonon B, Binz A, da Silva M, Camargo FA, Selbach PA. 2011. Rizóbios nativos do Rio Grande do Sul simbioticamente eficientes em *Lotus glaber*. *Ciência Rural*. 41(3):440–446.
- Ford JL, Barrett BA. 2011. Improving red clover persistence under grazing. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 119–124.

- Franco MC, Cassini STA, Oliveira VR, Vieira C, Tsai SM. 2002. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 37(8):1145–1150.
- Frank B. 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Berichte. Deutschen Botanischen Gesellschaft.7:332–46
- Fung KM, Tai AP, Yong T, Liu X, Lam HM. 2019. Co-benefits of intercropping as a sustainable farming method for safeguarding both food security and air quality. *Environmental Research Letters*, 14.
- Gomes JPA, Souza MN, Júnior ACS, Moulin MM. 2021. Uso de microrganismos eficientes como alternativa para agricultura sustentável: um referencial teórico. In *Agroecologia: métodos e técnicas para uma agricultura sustentável*. Vol. 5.
- Greenshields LD, Guosheng L, Feng J, Selvaraj G, Wei Y. 2007. The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. *Molecular Plant Pathology*. 8:411-421.
- Guerinot ML. 1991. *Iron uptake and metabolism in the rhizobia/legume symbioses*. 239–249.
- Hahn L, Saccol de Sá EL, Osório Filho BD, Machado RG, Damasceno RG, Giongo A. 2016. Rhizobial inoculation, alone or coinoculated with *Azospirillum brasilense*, promotes growth of wetland rice. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 40.
- Harshitha BA, Goudar G, Krishnaraj PU, Koti R. 2020. Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobial Isolates for Pigeon Pea (*Cajanus cajan* [L.] Millsp). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 9(7): 3776–3788.
- Harrison MJ, Dewbre GR, Liu J. 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*. 14:2413–2429.
- Hassan S, Mathesius U. 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*. 63(9):3429–3444.
- Hellriegel H, Wilfarth, H. 1888. Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineon und Leguminosen. Berlin: Buchdruckerei der "Post" Kayssler. Disponível em:

- <<https://archive.org/details/untersuchungen00hell/page/n7/mode/2up>>.  
Acesso em 15 Ene. 2022,
- Hernández I, Pérez G, Nápoles M, Rosales P, Baños R, Ramirez J. 2012. Selección de aislados de rizobios provenientes de nódulos de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*. 33(3):27–33.
- Hernández L, Munive JA, Sandoval E, Martínez D, Villegas MC. 2012. Poblaciones bacterianas nativas: Alternativa sustentable para la agricultura. *Terra Latinoamericana*. 30(2):129–138.
- Howieson JG, Yates RJ, O'Hara GW, Ryder M, Real D. 2005. The interactions of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* nodulation of annual and perennial *Trifolium* spp. from diverse centres of origin. *Australian Journal Experimental Agriculture*. 45:199–207
- Huassquiche L, Moreno P, Jiménez J. 2020. Caracterización y evaluación del potencial PGPR de la microflora asociada al cultivo de tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet). *Ecología Aplicada*. 19(2), 65-76.
- Iganci JRV, Vincent MA, Miotto STS. 2020. *Trifolium* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB597294>>. Acesso em: 01 fev. 2022
- Jingura R, Hamudikuwanda H, Jingura RM, Sibanda S, Hamudikuwanda H. 2001. Yield and nutritive value of tropical forage legumes grown in semi-arid parts of Zimbabwe. In *Tropical Grasslands* (Vol. 35).
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium*-Medicago model. *Nature Reviews Microbiology*. 5(8):619–633.
- Jordan DC. 1980. Transfer of *Rhizobium japonicum* to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 32:136-139
- Kamilova F, Kravchenko LV, Shaposhnikov AI, Azarova T, Makarova N, Lugtenberg B. 2006. Organic Acids, Sugars, and L-Tryptophane in Exudates of Vegetables Growing on Stonewool and Their Effects on Activities of Rhizosphere Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*. 19(3):250–256.
- Khalid A, Tahir S, Arshad M, Zahir ZA. 2004. Relative efficiency of rhizobacteria

- for auxin biosynthesis in rhizo-sphere and non-rhizosphere soils. *Australian Journal of Soil Research*. 42:921 – 926
- Kloepper JW, Reddy MS, Rodríguez-Kabana R, Kenney DS, Kokalis-Burelle N, Martínez-Ochoa N. 2004. Application for rhizobacteria in transplant production and yield enhancement. *Acta Hort (ISHS)*. 631:219-229.
- Kjærsgaard T. 2003. A plant that changed the world: The rise and fall of clover 1000-2000. *Landscape Research*. 28(1):41–49.
- Kumar N, Lad G, Giuntini E, Kaye ME, Udomwong P, Jannah Shamsani N, Peter W, Young J, Bailly X. 2015. Bacterial genospecies that are not ecologically coherent: Population genomics of *Rhizobium leguminosarum*. *Open Biology*. 5(1).
- Lara C, Esquivel LM, Negrete JL. 2011. Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 9(2):114–120.
- Lino E, Rodrigues PJ, Salezzi C, Azevedo M. 2018. Plantas forrageiras para pastos de alta produtividade Bovinocultura, equídeocultura, forragem, ovinocaprino-cultura, produção. *Nutritime*. 15(4):8272–8284.
- Lloret L, Martínez-romero E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47(1–2):43–60.
- Louden BC, Haarmann D, Lynne AM. 2011. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*. 12(1):51–53.
- Machado R, Sá ELS, Costa M, Dalagnol G, Oldra S, Silva V. 2015. Isolamento, autenticação e seleção de rizóbios isolados de *Adesmia*. *Tecno-Lógica*, 20(1):14.
- Machado R., Sá ELS, Hahn L, Sant'ana W. 2018. Inoculation of plant growth promoting rhizobia in Sudan grass (*Sorghum x sudanense* (Piper) Stapf cv. Sudanense) and millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R.Br. cv. BRS1501). *Acta Agronomica*. 67(1).
- Maguire J. 1962. Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor. *Crop Science*, 2(2):176–177.
- Marek-Kozaczuk M, Wdowiak-Wróbel S, Kalita M, Chernetsky M, Deryło K, Tchórzewski M, Skorupska A. 2017. Host-dependent symbiotic efficiency of

- Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains isolated from nodules of *Trifolium rubens*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110(12): 1729-1744.
- Mariano RLR, Silveira EB, Assis SMP, Gomes AMA, Nascimento ARP, Donato VMTS. 2004. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais Da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*. 1:89–111.
- Maróti G, Kondorosi É. 2014. Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Frontiers in Microbiology*, 5:1-6
- Mohite B. 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. In *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* (Vol. 13, Issue 3).
- Montardo D, Dall’Agnol M, Facchini A, Rodrigues N. 2003. Análise de Trilha para Rendimento de Sementes em Trevo Vermelho (*Trifolium pratense* L.). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 32(5):1076–1082.
- Moreno A, García V, Reyes JL, Vásquez J, Cano P. 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 20(1):68–83.
- Moreno Z, Valdez R, Soriano B, Ruesta N. 2016. Eficiencia en la nodulación por rizobios nativos, procedentes de nódulos de *Pisum sativum* “arveja” colectados de diferentes Departamentos del Perú. *Scientia Agropecuaria*. 7(3):165–172.
- Muniz A, Costa M, Wolff C, de Oliveira W, Sá ELS. 2011. Seleção de estirpes de rizóbio para *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vogel. *Biotemas*. 25(1):177–180.
- Navarro S, Navarro G. 2003. Química Agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. Segunda edición. Ediciones Mundi-Prensa.
- Naya L. 2007. Respuesta Fisiológica, Bioquímica y Molecular de las Leguminosas a Estreses Abióticos. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Nutrición Vegetal, Zaragoza.
- Ogutcu H, Avsar H. 2020. Characterization and Siderophores Production of *Rhizobium* spp. Isolated from wild Legumes. *International Journal of Computational and Experimental Science and Engineering (IJCESEN)*. 6(3): 176–179.
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA. 2011. The rules of engagement

- in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*. 45:119–144.
- Paim NR. 1988. Manejo de leguminosas de clima temperado. In: Simpósio sobre manejo da pastagem. *Anais Piracicaba: FEALQ*. p 341-358
- Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70:5607-5612 Disponível em: <<https://sites.google.com/view/taxonomyagrorhizo/home/species-with-standing-in-nomenclature>> Acesso em 07 Fev 2022
- Paulino VT, Gerdes L, Valarini MJ, Ferrari E. 2006. Retrospectiva do uso de leguminosas forrageiras. In *Uso de leguminosas forrageiras* (Vol. 1), pp. 1–47.
- Peix A, Rivas-Boyer AA, Mateos PF, Rodriguez-Barrueco C, Martínez-Molina E, Velázquez E. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. 33(1), 103–110.
- Portella D. 2002. Avaliação e melhoramento genético de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) em duas regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Rascio N, la Rocca N. 2008. Biological Nitrogen Fixation. In *Encyclopedia of Ecology* (Vol. 16) pp. 412–419.
- Rehman A. 2019. Biological Activities of *Trifolium pratense*: A Review. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*. 3(9):36–42.
- Rivas R, García-fraile, P, Velázquez E. 2009. Taxonomy of Bacteria Nodulating Legumes. *Microbiology Insights*. 2:51–69.
- Rubio G. 2002. Conectando el fósforo del suelo con la planta. Simpósio Enfoque Sistémico de la fertilización fosfórica. In *Informaciones Agronómicas del Cono Sur*. n 16
- Russelle MP, Birr AS. 2004. Biological nitrogen fixation. Large-scale assessment 1. of symbiotic dinitrogen fixation by crops: Soybean and alfalfa in the Mississippi river basin. *Journal Agronomy*. 96: 1754.
- Sarruge JR 1975. Soluções nutritivas. *Summa Phitopathologica*. 1(3):231–234.
- Scheffer-Basso SM, Avila AV, Dall’Agnol M, Riboldi J, Jesuz SM. 2001. Disponibilidade e Valor Nutritivo de Forragem de Leguminosas Nativas

- (Adesmia DC.) e Exóticas (Lotus L.) 1. In *UFRGS. Revista brasileira de Zootecnia*. 30(3): 975-982.
- Sch lindwein G, Kayser Vargas L, Brito B, Augusto LI, Azambuja C. 2008. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. *Ciência Rural*. 38(3):658–664.
- Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores'. *Analytical biochemistry*. 160: 47–56.
- SDA. 2011. Instrução normativa N'13. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf/view>. Acesso em 18 Mar 2022
- Simioni, TA, Gomes FJ, Gomes UH, Fernandes GA, Botini LA, Mousquer CJ, Rodrigues WJ, Hoffmann A. 2014. Potencialidade da consorciação de gramíneas e leguminosas forrageiras em pastagens tropicais. *PUBVET*. 8(13).
- Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2016. Manual de Calagem e adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.
- Somasegaran P, Hoben JH. 1994. Handbook for rhizobia: methods in legume - Rhizobium technology. New York: Springer-Verlag. 450p.
- Spaepen S, Vanderleyden J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3.
- Stivari TSS, Monteiro ALG, Evaristo de Paula EF, Fernandes SR, de Souza DF, Gilaverte S. 2011. Leguminosas na alimentação de ovinos: possibilidades de uso e resposta animal. *PUBVET*. 5(32).
- Storey EP, Boghozian R, Little JL, Lowman DW, Chakraborty R. 2006. Characterization of “Schizokinen”; a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917. *BioMetals*. 19(6):637–649.
- Stroschein MRD, de Sá ELS, Machado RG, Cabral T de L, Bruxel M, Giongo A, da Fontoura RC 2011. Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. *Ciência Rural*. 41(10): 1738–1743.
- Taylor NL, Quesenberry KH. 1996. Red clover science. New York: Kluwer Academy Publishing; 226p.
- Taylor NL, Smith RR. (1980). Red clover. Breeding and genetics. *Advances in agronomy*. 31:125–154.

- Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweis SJ. 1995. *Análises de solo, plantas e outros materiais* (2'). Boletim Técnico de Solos - UFRGS.
- Teixeira W, Ramos D, Dominghetti AW, Carvalho L. 2018. Perdas de nitrogênio com o uso de fertilizante nitrogenado de liberação controlada na cultura do café. *Revista Cultivar*, Disponível em: <<https://revistacultivar.com.br/artigos/perdas-de-nitrogenio-com-o-uso-de-fertilizante-nitrogenado-de-liberacao-controlada-na-cultura-do-cafe> acesso> Acesso em 07 Fev 2022.
- Vargas L, Lisboa B, Schlindwein G, Granada C, Giongo A, Beneduzi A, Passaglia L. 2009. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul State. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*. 33:1227–1235.
- Vega-celedón P, Canchignia H, González M, Seeger M. 2016. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*. 37(especial): 33–39.
- Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*. 91:127–141.
- Vincent JM. 1970. *Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. Blackwell Scientific.
- Wang D, Yang S, Tang F, Zhu H. 2012. Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*. 14(3): 334–342.
- Wang ET, Martínez J, López I. 2001. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. En: Microbios. (Eds. E. Martínez Romero y J.C. Martínez Romero). Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Wilhelm TF. 1885. Österreich und der Schweiz. Gera, Germany
- Xavier GB, Martins LMV, Ribeiro JR, Gouvêa N. 2006. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. *Revista Caatinga*. 19(1):25–33.
- Zeni M. 2020. Desempenho forrageiro de consorciações de cultivares de centeio de diferentes ciclos de produção. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo.
- Zeven A, Zhukovsky P. 1975. Dictionary of cultivated plants and their centres of

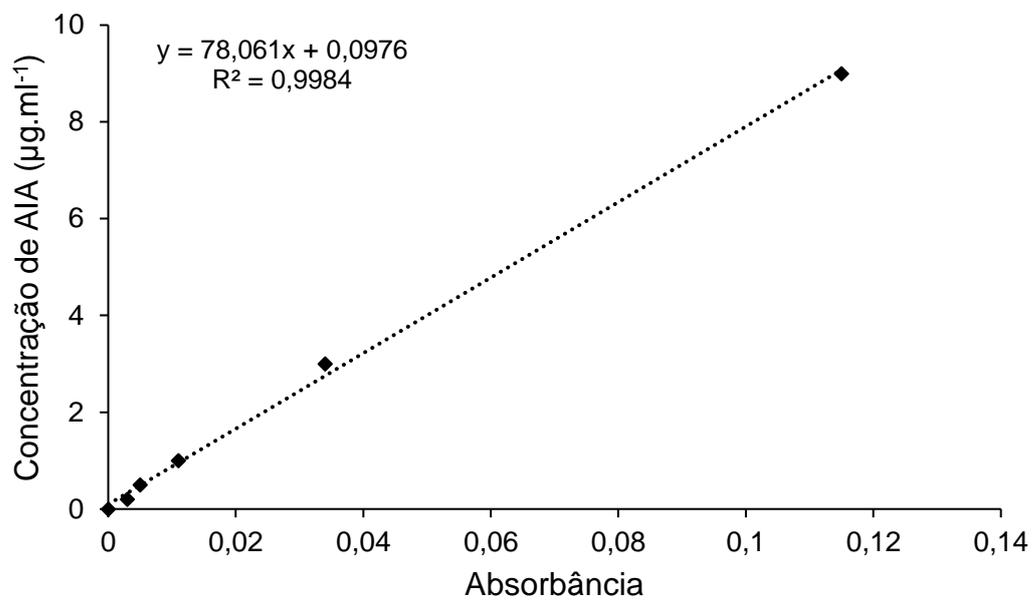
diversity. Centre of Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.  
217 p.

Zhao Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*. 21:49–64.

## 9. APÊNDICES

### APÊNDICE 1

Curva padrão de AIA sintético usada no teste de produção de AIA



## APÊNDICE 2

## Análise estatística com software InfoStat

## 1. Produção de ácido indol acético

*Produção em caldo LM sem adição de triptofano*

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.0456.

**Significância**

- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

<b>Tratamento</b>	<b>Medianas</b>				
SEMIA 2076	0.80	A			
SEMIA 2079	0.80	A			
SEMIA 259	0.72	A			
SEMIA 276	0.72	A	B	C	
Tp22	0.64	A	B	C	
Tp57	0.64	A	B	C	
SEMIA 2082	0.64	A	B	C	
SEMIA 2075	0.57	A	B	C	
SEMIA 2038	0.57	A	B	C	
Tp12	0.64	A	B	C	D
SEMIA 251	0.57	A	B	C	D
Tp04	0.49	A	B	C	D
Tp35	0.49		B	C	D
Tp34	0.41			C	D
SEMIA 2081	0.25			C	D
Tp46	0.10				D

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

*Produção em caldo LM com adição de triptofano*

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.0024.

**Significância**

- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

<b>Tratamento</b>	<b>Medianas</b>	
Tp46	5.02	A
Tp12	3.53	A B
SEMIA 2079	3.45	A B C
SEMIA 251	2.05	A B C
SEMIA 259	1.81	A B C
SEMIA 276	1.66	A B C D
SEMIA 2075	1.42	A B C D
Tp57	1.27	B C D
SEMIA 2076	1.11	B C D
SEMIA 2081	1.35	C D
Tp22	1.03	C D
SEMIA 2038	1.11	C D
Tp04	1.11	D
Tp35	1.03	D
SEMIA 2082	0.80	D
Tp34	1.03	D

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

## 2. Solubilização de fosfatos

*1° dia*

- Teste de Wilcoxon Mann Whitney  $\alpha=0,05$ , p-valor  $> 0,2$ . **Não significância**

*2° dia*

- Teste de Wilcoxon Mann Whitney  $\alpha=0,05$ ,  $0,05 < \text{p-valor} < 0,1$ . **Não significância**

*3° dia*

- Teste de Wilcoxon Mann Whitney  $\alpha=0,05$ ,  $0,05 < \text{p-valor} < 0,1$ . **Não significância**

*4° dia*

- Teste de Wilcoxon Mann Whitney  $\alpha=0,05$ ,  $0,05 < \text{p-valor} < 0,1$ . **Não significância**

*5° dia*

- Teste de Wilcoxon Mann Whitney  $\alpha=0,05$ , p-valor  $> 0,2$ . **Não significância**

### 3. Produção de sideróforos

2° dia

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.0043.

#### Significância

- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

Tratamento	Medianas	
Tp34	4.00	A
SEMIA 2081	2.00	A B
SEMIA 276	2.00	A B
Tp57	2.00	A B
SEMIA 2038	1.75	B C
SEMIA 2075	1.67	B C
SEMIA 2079	1.50	C

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

4° dia

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.0042.

#### Significância

- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

Tratamento	Medianas	
Tp57	5.25	A
SEMIA 2038	5.00	A
Tp34	4.50	A
SEMIA 2075	3.83	A B
SEMIA 276	3.50	A B
SEMIA 2081	2.50	A B C
Tp22	2.00	B C
SEMIA 2082	1.75	B C
SEMIA 2079	1.50	C

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

6° dia

- ANOVA  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.000. **Significância**
- Teste LSD Fisher para comparações múltiplas de médias

Tratamento	Médias	
SEMIA 2038	5.86	A
Tp57	5.50	A B
SEMIA 276	4.94	B
SEMIA 2075	4.14	C
Tp34	3.83	C
SEMIA 2081	2.67	D
SEMIA 2082	2.13	D E
Tp22	1.87	E F
SEMIA 2079	1.75	E F
Tp04	1.67	E F
SEMIA 2076	1.23	F

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

11° dia

- ANOVA  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.000. **Significância**
- Teste LSD Fisher para comparações múltiplas de médias

Tratamento	Médias	
SEMIA 2038	6.83	A
Tp57	6.56	A
Tp34	5.81	A B
SEMIA 276	5.22	B
SEMIA 2075	3.86	C
Tp04	3.17	C D
SEMIA 2079	2.90	C D E
SEMIA 2082	2.50	D E
SEMIA 2081	2.06	D E
SEMIA 2076	2.04	E
Tp22	2.00	E

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

#### 4. Efeito na germinação de sementes de centeio

Percentagem de germinação

2° dia

- ANOVA  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.002. **Significância**
- Teste LSD Fisher para comparações múltiplas de médias

Tratamento	Médias	
SEMIA 276	72.23	A
Tp46	71.10	A B
Tp35	68.90	A B C
SEMIA 2079	68.87	A B C
SEMIA 2076	65.57	A B C D
Tp57	63.37	A B C D
SEMIA 2038	63.33	A B C D
SEMIA 259	62.23	A B C D
Água	61.13	A B C D
Tp34	60.03	A B C D
Tp04	58.90	A B C D
SEMIA 2075	57.80	B C D E
SEMIA 2082	57.77	B C D E
SEMIA 251	57.77	B C D E
Tp12	55.53	C D E
SEMIA 2081	52.23	D E F
Tp22	44.47	E F
LM	40.00	F

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

3° dia

- ANOVA  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.010. **Significância**
- Teste LSD Fisher para comparações múltiplas de médias

Tratamento	Médias	
Tp46	77.80	A
SEMIA 276	75.57	A B
Tp35	73.33	A B C
SEMIA 2079	71.13	A B C D
SEMIA 2082	68.87	A B C D
SEMIA 259	67.77	A B C D

SEMIA 2076	67.77	A B C D
SEMIA 2038	67.77	A B C D
Tp04	66.67	A B C D E
Tp57	65.57	A B C D E
Tp34	64.43	A B C D E
SEMIA 251	62.23	B C D E
Água	61.13	C D E F
SEMIA 2075	61.10	C D E F
Tp12	61.10	C D E F
SEMIA 2081	57.77	D E F
Tp22	53.33	E F
LM	47.77	F

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

#### 4° dia

- ANOVA  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.022. **Significância**
- Teste LSD Fisher para comparações múltiplas de médias

Tratamento	Médias	
Tp46	81.13	A
SEMIA 276	76.67	A B
Tp35	75.57	A B C
SEMIA 2079	73.33	A B C D
SEMIA 2076	71.10	A B C D
Tp57	71.10	A B C D
SEMIA 259	70.00	A B C D E
SEMIA 251	68.90	A B C D E
SEMIA 2038	68.87	A B C D E
SEMIA 2082	68.87	A B C D E
Tp04	67.80	A B C D E
Tp34	64.43	B C D E F
Tp12	63.33	B C D E F
SEMIA 2075	63.33	B C D E F
Água	62.23	C D E F
SEMIA 2081	61.13	D E F
Tp22	56.67	E F
LM	51.10	F

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

5° dia

- ANOVA  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.033. **Significância**
- Teste LSD Fisher para comparações múltiplas de médias

Tratamento	Médias	
Tp46	81.13	A
SEMIA 276	76.67	A B
Tp35	75.57	A B C
SEMIA 2076	74.43	A B C
SEMIA 2079	73.33	A B C
SEMIA 259	71.10	A B C D
Tp57	71.10	A B C D
SEMIA 2082	70.00	A B C D
SEMIA 251	68.90	A B C D
SEMIA 2038	68.87	A B C D
Tp04	67.80	A B C D
Tp12	64.47	B C D E
SEMIA 2075	64.43	B C D E
Tp34	64.43	B C D E
Água	63.33	B C D E
SEMIA 2081	61.13	C D E
Tp22	57.77	D E
LM	51.10	E

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

Velocidade de germinação (GSI)

- ANOVA  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.004. **Significância**
- Teste LSD Fisher para comparações múltiplas de médias

Tratamento	Médias	
Tp46	11.58	A
SEMIA 276	11.25	A B
Tp35	10.94	A B C
SEMIA 2079	10.72	A B C
SEMIA 2076	10.50	A B C D
Tp57	10.14	A B C D
SEMIA 259	10.12	A B C D
SEMIA 2038	10.03	A B C D
SEMIA 2082	9.84	A B C D
Tp04	9.69	A B C D E

SEMIA 251	9.61	B	C	D	E	
Tp34	9.44	B	C	D	E	
Água	9.32	B	C	D	E	
SEMIA 2075	9.23		C	D	E	
Tp12	9.12		C	D	E	
SEMIA 2081	8.64			D	E	F
Tp22	7.87				E	F
LM	7.02					F

---

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

## 5. Fixação biológica de nitrogênio em trevo vermelho

### 5.1. Avaliação *in vitro*

Altura de plantas

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.000.

#### Significância

- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

Tratamento	Medianas	
Tp34	11.00	A
Tp46	11.00	A
SEMIA 2081	10.50	A
Tp04	10.25	A B
N+	10.25	A B
Tp35	10.00	A B
SEMIA 2076	9.00	A B
SEMIA 276	9.25	A B
Tp12	8.00	A B C
Tp57	8.00	A B C D
Tp22	7.50	B C D
SEMIA 251	6.50	C D
SEMIA 2079	5.25	C D
SEMIA 259	5.50	C D
SEMIA 2075	5.50	C D
SEMIA 2038	5.50	C D
SEMIA 2082	5.75	C D
N-	5.50	D

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

Massa seca parte aérea

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.000.

### Significância

- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

Tratamento	Medianas	
Tp34	11.40	A
Tp57	10.68	A B
SEMIA 2076	10.35	A B
N+	12.20	A B
Tp46	10.15	A B
SEMIA 2081	9.50	A B
Tp04	8.60	A B C
Tp35	8.30	A B C
Tp12	8.50	A B C
Tp22	8.10	B C
SEMIA 276	6.65	B C D
SEMIA 2075	5.50	B C D
N-	5.00	C D
SEMIA 2082	4.15	D
SEMIA 251	4.45	D
SEMIA 2079	4.18	D
SEMIA 259	4.05	D
SEMIA 2038	4.43	D

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

Massa seca radicular

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.000.

### Significância

- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

Tratamento	Medianas	
SEMIA 2075	4.85	A
Tp22	3.00	A
N+	3.35	A
SEMIA 2081	2.70	A B
SEMIA 2076	2.50	A B
Tp34	2.35	A B C
Tp35	2.40	A B C D
SEMIA 2079	2.18	B C D
Tp04	2.25	B C D

Tp46	1.90	B C D
Tp57	1.80	B C D E
SEMIA 2082	1.85	C D E
SEMIA 276	1.85	C D E
SEMIA 251	1.55	C D E
Tp12	1.85	C D E
N-	1.75	D E
SEMIA 259	1.65	D E
SEMIA 2038	1.18	E

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

### Nodulação

#### *Início do teste*

- ANOVA  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.000. **Significância**
- Teste LSD Fisher para comparações múltiplas de médias

<b>Tratamento</b>	<b>Médias</b>	
SEMIA 2076	4,17	A
Tp34	3,88	A B
Tp04	3,00	A B C
Tp57	2,60	B C D
Tp35	1,80	C D E
Tp22	1,67	C D E
SEMIA 2081	1,67	C D E
Tp46	1,29	D E
Tp12	1,20	D E
SEMIA 2082	1,17	D E
SEMIA 276	1,00	E
SEMIA 259	0,33	E

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

*Final do teste*

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.0027.

**Significância**

- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

<b>Tratamento</b>	<b>Medianas</b>	
Tp57	7,0	A
Tp04	5,00	A B
SEMIA 251	6,00	A B
Tp12	6,00	A B
Tp35	6,00	A B C
SEMIA 2076	5,50	A B C
Tp34	4,50	A B C
SEMIA 2082	4,00	A B C D
SEMIA 276	5,00	A B C D
SEMIA 2081	4,00	A B C D
Tp22	3,50	B C D E
Tp46	2,00	C D E
SEMIA 2038	0,00	D E
SEMIA 259	0,00	E

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

## 5.2. Avaliação em lampadário

Massa seca parte aérea

- ANOVA  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.0008. **Significância**
- Teste LSD Fisher para comparações múltiplas de médias

Tratamento	Médias	
N+	15.66	A
Tp34	14.74	A B
SEMIA 2081	14.22	A B
SEMIA 2076	12.36	B
Tp46	12.25	B
N-	6.69	C

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

Massa seca radicular

- ANOVA  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.205. **Não significância**

Nitrogênio total

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.0318. **Significância**
- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

Tratamento	Medianas	
N+	0,53	A
Tp34	0,53	A
SEMIA 2076	0,43	A B
SEMIA 2081	0,35	A B
Tp46	0,40	A B
N-		B

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

## 6. Promoção de crescimento em centeio

### 6.1. Avaliação *in vitro*

Altura de plantas

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.004.

#### **Significância**

- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

<b>Tratamento</b>	<b>Medianas</b>	
Tp34	31.50	A
SEMIA 2082	31.00	A B
SEMIA 2076	30.75	A B C
SEMIA 2075	26,00	A B C D
SEMIA 2038	26,75	A B C D E
N 100%	27,00	B C D E
Tp46	26,00	C D E
SEMIA 2079	26,00	C D E
Tp22	26,00	C D E
SEMIA 259	27,50	D E
SEMIA 276	24,00	D E
Tp12	24,00	D E
N 50%	21,75	D E
Tp35	22,75	D E
SEMIA 251	24,50	D E
Tp57	23,00	D E
SEMIA 2081	22,50	D E
Tp04	21,00	E

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

## Cumprimento de raiz

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.0001.

**Significância**

- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

Tratamento	Medianas	
Tp34	13.00	A
SEMIA 2076	12.25	A B
SEMIA 2082	9.50	A B C
N 50%	8.25	A B C
SEMIA 2079	8.50	A B C D
Tp35	8.75	A B C D E
Tp22	7.50	A B C D E F
Tp57	7.25	A B C D E F
SEMIA 2075	7.00	B C D E F
N 100%	6.75	C D E F
SEMIA 2081	6.50	C D E F G
Tp12	6.50	D E F G
SEMIA 2038	6.50	D E F G
SEMIA 276	6.50	E F G
SEMIA 259	6.00	F G
Tp46	5.50	F G
Tp04	4.00	F G
SEMIA 251	4.75	G

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

## Massa seca aérea

- ANOVA  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.000. **Significância**
- Teste LSD Fisher para comparações múltiplas de médias

Tratamento	Médias	
SEMIA 2076	13,97	A
Tp34	13,67	A
N 100%	12,39	A B C
SEMIA 2082	12,38	A B C
Tp35	11,45	A B C D
SEMIA 2075	11,42	B C D
Tp22	11,20	C D E
Tp12	10,66	C D E
SEMIA 276	10,10	D E
Tp46	10,06	D E

Tp04	9.98	D E
SEMIA 2079	9.97	D E
Tp57	9.90	D E
SEMIA 2038	9.66	D E
N 50%	9.44	D E
SEMIA 251	9.37	D E
SEMIA 2081	9.28	D E
SEMIA 259	9.01	E

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

#### Massa seca radicular

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.0001.

#### **Significância**

- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

<b>Tratamento</b>	<b>Medianas</b>	
Tp34	5.60	A
Tp35	4.40	A B
SEMIA 2076	3.23	A B C
Tp12	3.30	A B C
SEMIA 2075	2.30	B C D
N 100%	2.10	B C D
Tp46	2.00	B C D
Tp22	2.50	B C D
N 50%	2.15	C D
SEMIA 2079	2.00	C D E
SEMIA 276	2.00	C D E
SEMIA 2082	1.88	C D E
SEMIA 2038	1.95	D E
SEMIA 251	1.80	D E
SEMIA 259	1.70	D E
Tp57	1.50	D E
SEMIA 2081	1.05	D E
Tp04	1.00	E

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

## 6.2. Avaliação em lampadário

Massa seca da parte aérea

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.045.

**Significância**

- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

Tratamento	Medianas	
Tp34	35,00	A
N 100%	32,50	A
Tp46	35,00	A
SEMIA 2081	31,00	A B
SEMIA 2076	26,50	A B
N 50%	24,00	B

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

Massa seca radicular

- Teste não paramétrico Kruskal Wallis  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.004.

**Significância**

- Teste de Dunn para comparações múltiplas de medianas

Tratamento	Medianas	
SEMIA 2076	69,00	A
Tp34	61,00	A B
N 100%	59,00	A B C
N 50%	47,50	B C D
Tp46	46,50	C D
SEMIA 2081	37,50	D

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*

Altura da planta

- ANOVA  $\alpha=0,05$ , p-valor = 0.000. **Significância**
- Teste LSD Fisher para comparações múltiplas de médias

<b>Tratamento</b>	<b>Médias</b>	
Tp34	35,90	A
Tp46	34,65	A B
S-2076	33,20	A B
S-2081	31,50	B C
N100	29,50	C
N50	24,63	D

*Tratamentos com letra comum não são diferentes estatisticamente significativos*