

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**ISOLAMENTO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS E PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO EM ARROZ IRRIGADO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rosângela Silva Gonçalves Nunes

Santa Maria, RS, Brasil

2013

ISOLAMENTO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM ARROZ IRRIGADO

Rosângela Silva Gonçalves Nunes

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Área de concentração em Agrobiologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

Orientador: Prof Dr. Sandro José Giacomini

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ISOLAMENTO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM ARROZ IRRIGADO**

elaborada por
Rosângela Silva Gonçalves Nunes

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sandro José Giacomini, Dr.
(Presidente/Orientador)

Paola Mendes Milanesi, Dr^a. (UFSM)

Sandy Sampaio Videira, Dr^a. (UniFOA)

Santa Maria, 30 de julho de 2013.

DEDICO,

Aos meus pais João Brum Gonçalves (*in memoriam*) e Diva Silva Gonçalves,

Aos meus irmãos Angela Gonçalves Pedron e Celso Silva Gonçalves,

Ao meu companheiro, amigo e amor, Diego Guimarães Nunes.

A vocês toda minha gratidão e amor .

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde, e por sempre me mostrar o melhor caminho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, pela oportunidade de aprendizado e crescimento.

Ao professor Sandro José Giacomini, meu orientador, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, pela paciência, tranquilidade e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biotransformação de Carbono e Nitrogênio-LABCEN, em especial aos colegas do grupo de pesquisa do professor Sandro, pela amizade, pelo companheirismo, pelos ensinamentos trocados, pelos mates tomados e pelas risadas compartilhadas.

Aos bolsistas de iniciação científica, em especial a minha flor Raquel Schmatz, muito obrigada.

À pesquisadora Vera Baldani e ao pessoal do Laboratório Poáceas da Embrapa Agrobiologia, por terem me recebido tão bem e por terem sido tão importantes na realização do meu trabalho.

Ao Paulo Ferreira e Paola Milanesi pela amizade, por sempre estarem dispostos a me ouvir, ajudar e aconselhar.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, em especial aos colegas da turma de 2012, pela amizade e por sempre um apoiar ao outro.

Aos meus sogros Galileu Nunes e Carmen Nunes, meus segundos pais, por me acolherem, incentivarem a acreditarem em mim.

Aos meus cunhados Glivia Nunes, Leonardo Pedron e Lisandra Gonçalves, e aos meus sobrinhos amados Carolina, Davi e Giovana pelo carinho e apoio.

À Alessandra Bacca, Ângela Neufeld, Daiana Baldoni e Renata Machado, pela amizade, companheirismo, paciência, incentivo e por tentarem me manter calma.

As minhas amigas de sempre e pra sempre: Angélica Paim e Flaviane Brum, por entenderem minha distância e ausência e por nunca terem deixado de me apoiar.

A todos que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho e que torcem por mim.

Meus sinceros agradecimentos!

"Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã."

Chico Xavier

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia
Universidade Federal de Santa Maria

ISOLAMENTO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM ARROZ IRRIGADO

AUTORA: ROSÂNGELA SILVA GONÇALVES NUNES

ORIENTADOR: SANDRO JOSÉ GIACOMINI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de julho de 2013.

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de arroz (*Oryza sativa*) do mundo, e a maior parcela de sua produção é proveniente dos ecossistemas de várzeas, sendo o Rio Grande do Sul (RS) o maior produtor nacional. A produção de arroz é dependente de fertilizantes nitrogenados, os quais apresentam custos elevados e alta capacidade de poluir o meio ambiente. Uma alternativa para a redução na aplicação de nitrogênio (N) é a inoculação de bactérias diazotróficas capazes de promover a fixação biológica de N (FBN) e, ou, o crescimento vegetal em arroz. O objetivo deste trabalho foi selecionar e avaliar a eficiência de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de diferentes variedades de arroz, e o potencial de contribuição da FBN destes isolados na cultura em questão, sob condição de inundação. Foram realizados três estudos. No primeiro, foi realizado o isolamento de bactérias diazotróficas presentes em 20 variedades de arroz irrigado cultivadas no RS. No segundo, os isolados obtidos foram testados quanto à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, produzir e liberar ácido-3-indol-acético (AIA) e promover o crescimento de dez cultivares de arroz irrigado sob condições gnotobióticas. No terceiro estudo, foi realizado um experimento de casa de vegetação com os quatro isolados que proporcionaram melhor crescimento vegetal e as três cultivares que mais responderam a inoculação no teste *in vitro*. Nos testes com inoculação foi utilizada a estirpe BR11417 (ZAE94 – *Herbaspirillum seropedicae*) como referência. Foram obtidos 35 isolados da raiz e da parte aérea das cultivares de arroz irrigado testadas, e todos apresentaram capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e produzir e liberar AIA *in vitro*. Em experimento sob condições gnotobióticas as cultivares IRGA 409, Puitá Inta-CL e Pampa demonstraram ser as cultivares mais responsivas a inoculação, e os isolados 12, 13, 29 foram aqueles que apresentaram maior promoção de crescimento vegetal. Em casa de vegetação, a cultivar IRGA 409 foi a que mais respondeu a inoculação e o isolado 12, aquele que proporcionou os maiores benefícios em relação ao perfilhamento de plantas e produção de matéria seca nas cultivares de arroz irrigado estudadas.

Palavras-chave: bioprospecção, eficiência, fixação biológica de nitrogênio, crescimento vegetal.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Professional Graduation Program in Agrobiologia
Federal University of Santa Maria

ISOLATION AND INOCULATION DIAZOTROPHIC AND PROMOTING GROWTH IN RICE

AUTHOR: ROSÂNGELA SILVA GONÇALVES NUNES

ADVISER: SANDRO JOSÉ GIACOMINI

Defense Place and Date: Santa Maria, 30th July, 2013.

Brazil is one of the largest producers and consumers of rice (*Oryza sativa*) in the world, and the largest portion of its production comes from floodplain ecosystems, and Rio Grande do Sul (RS), the largest national producer. Rice production is dependent on nitrogen fertilizers, which have high costs and high capacity to pollute the environment. An alternative to reducing the application of nitrogen (N) is inoculated Diazotrophic able to promote biological fixation of nitrogen (BNF) and or, in rice plant growth. The aim of this study was to select and evaluate the efficiency of diazotrophic bacteria isolated from different rice varieties, and the potential contribution of BNF these isolates in the culture in question, under flooding conditions. Three studies were performed. In the first, we performed the isolation of diazotrophic bacteria present in 20 varieties of rice grown in RS. In the second, the isolates were tested for their ability to fix atmospheric nitrogen, produce and release acid-indole-3-acetic acid (IAA) and promote growth ten rice cultivars under conditions gnotobiotics. In the third study, an experiment was conducted in a greenhouse with four isolates that showed improved plant growth and the three cultivars responded more inoculation in vitro test. In tests with inoculation was used strain BR11417 (ZAE94 - *Herbaspirillum seropedicae*) as a reference. 35 isolates were obtained from roots and shoots of rice cultivars tested, and all showed the ability to fix atmospheric nitrogen and produce and release IAA in vitro. In the experiment under conditions gnotobiotics cultivars IRGA 409, Puita Inta-CL and Pampa cultivars proved more responsive to inoculation and isolates 12, 13, 29 were those who had higher plant growth promotion. In the greenhouse, the IRGA 409 was the one that responded to inoculation and isolated 12, who provided the greatest benefits in relation to plant tillering and dry matter production in rice cultivars studied.

Keywords: bioprospecting, efficiency, nitrogen fixation, plant growth.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Logaritmo (\log_{10}) do número de bactérias diazotróficas presentes na parte aérea e nas raízes das cultivares estudadas, nos três meios de cultivo testados, pela técnica do número mais provável (n° de células por grama de matéria fresca)	26
Tabela 2 - Isolados obtidos das diferentes partes das plantas das cultivares de arroz testadas, meio de cultura do isolamento, quantidade de N fixado e capacidade de Produção de Auxina dos isolados.....	28
Tabela 3 - Matéria fresca (mg) de planta inteira (parte aérea + raiz) de 10 cultivares de arroz irrigado cultivadas <i>in vitro</i> , com e sem inoculação de 10 isolados de bactérias diazotróficas.....	30
Tabela 4 - Comprimento de raiz (cm) de 10 cultivares de arroz irrigado cultivadas <i>in vitro</i> com e sem a inoculação de 10 isolados de bactérias diazotróficas.....	31
Tabela 5 - Perfilhamento, matéria seca de parte aérea, matéria seca de raiz e N acumulado em plantas de arroz irrigado cultivadas em casa de vegetação, com e sem inoculação de isolados de bactérias diazotróficas combinados ou não a doses de N	34

SUMÁRIO

ABSTRACT	8
LISTA DE TABELAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Orizicultura	13
2.2 Nitrogênio.....	14
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Densidade e isolamento de bactérias diazotróficas endofíticas de diferentes variedades de arroz.....	19
3.2 Quantificação do N ₂ fixado	20
3.3 Produção de ácido-3-indolacético (AIA)	21
3.4 Experimento de inoculação <i>in vitro</i>	22
3.5 Experimento em casa de vegetação.....	22
3.6 Análises estatísticas.....	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Contagem e isolamento de bactérias diazotróficas.....	25
4.2 N ₂ fixado pelos isolados obtidos das diferentes variedades.....	26
4.3 Produção de ácido-3-indolacético (AIA)	27
4.4 Experimento <i>in vitro</i>	29
4.5 Experimento em casa de vegetação.....	32
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXOS.....	52

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de arroz (*Oryza sativa*) do mundo, sendo a maior parcela de sua produção proveniente dos ecossistemas de várzeas do Estado do Rio Grande do Sul (RS), as quais são irrigadas por inundação. O RS produz 66% do arroz do país, sendo o arroz irrigado notadamente o que apresenta maior produtividade, quando comparado ao arroz de terras altas (CONAB, 2013; MUNARETO et al., 2010). As altas produtividades dependem, sobretudo, da disponibilidade do nitrogênio (N) para a cultura, que é proveniente principalmente da adubação com fertilizantes nitrogenados, da mineralização do N presente na matéria orgânica do solo (KUNDU; LADHA, 1995) e da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).

Estudos têm demonstrado que parte das exigências do arroz em relação ao N pode ser suprida pelo processo de FBN, por meio da associação estabelecida com bactérias diazotróficas (LADHA et al., 1987; ARAÚJO et al., 2013). As bactérias diazotróficas além de fixarem N atmosférico (HUERGO et al., 2008) podem estimular o crescimento das plantas pelo aumento na atividade da redutase do nitrato (CASSÁN et al., 2008), produção de hormônios de crescimento vegetal (PENG et al., 2002; ; GUIMARÃES; BALDANI, 2013), e outras moléculas (PERRING et al., 2007) e solubilização de fosfato (MARRA et al., 2012), ou seja, promovem o crescimento das plantas diretamente pela produção de metabólitos. A síntese de antibióticos pelos micro-organismos é uma forma indireta de promoção do crescimento, estes compostos podem diminuir os efeitos deletérios de micro-organismos fitopatogênicos (CORREA et al., 2008). Em geral, acredita-se que essas bactérias beneficiam o crescimento das plantas por uma combinação destes mecanismos (DOBBELAERE et al., 2003) ou pela presença de apenas um deles.

No Brasil, experimentos conduzidos para avaliar o potencial de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de arroz, têm demonstrado respostas diferenciadas quanto a FBN (RODRIGUES et al., 2008; FERREIRA et al., 2010; ARAÚJO et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2013). Com isso, os diferentes genótipos cultivados devem ser considerados durante a seleção de estirpes com potencial em

realizar a FBN. A seleção de genótipos de plantas responsivos à FBN é de fundamental importância para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados em diversas culturas de importância econômica (URQUIAGA et al., 1992; BALDANI et al., 1997; REIS et al., 2000). Normalmente, o melhoramento genético de espécies vegetais prioriza características como produtividade, eficiência no uso de fertilizantes e a resistência a doenças, deixando, via de regra, de considerar as interações entre plantas e micro-organismos promotores de crescimento, alguns dos quais com a capacidade de realizar a FBN (MONTANEZ et al., 2009).

Embora haja recomendação de uso de fertilizantes nitrogenados para a cultura do arroz, resultados de pesquisa sugerem que é possível que a mesma se beneficie da FBN (FERREIRA et al., 2010; ARAÚJO et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2013). A seleção de novas estirpes capazes de suprir parcial ou totalmente as necessidades de N quando em associação com o arroz, tem sido tema de pesquisas, buscando-se a redução dos custos de produção, devido ao alto custo dos fertilizantes nitrogenados e dos impactos negativos no ambiente.

Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram isolar, selecionar e avaliar a eficiência de bactérias diazotróficas endofíticas, obtidas de diferentes cultivares de arroz irrigado cultivadas no Estado do RS, no fornecimento de N e na promoção de crescimento de plantas de arroz cultivadas em condição de inundação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Orizicultura

Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz (*Oryza sativa*) destaca-se pela produção e área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social. O arroz é considerado uma das culturas de maior importância, sendo a principal fonte de calorias e proteínas essenciais e representando uma importante fonte de alimento para a população, principalmente em países em desenvolvimento, como na Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial (EMBRAPA 2005; FAO, 2010). A ampla adaptabilidade do arroz, aliada à sua habilidade de produzir nas mais diversas regiões e ao continuado esforço da pesquisa em todo o mundo, assegura que o seu grão permaneça sendo o mais importante produto de consumo do homem (TERRES et al., 2004).

O maior produtor mundial de arroz é a China, representando aproximadamente 30% da produção mundial, seguido da Índia e Indonésia (USDA, 2012). O Brasil destaca-se como o maior produtor de fora do continente asiático e o nono produtor mundial do cereal. A safra nacional de arroz 2011/12 produziu 11.559,2 mil toneladas, com uma produtividade média nacional de 4,7 Mg ha⁻¹ (CONAB, 2012).

Os Estados de Santa Catarina e RS são os principais produtores de arroz do Brasil, totalizando 70% da produção nacional, sendo considerados os estados responsáveis pelo suprimento desse cereal à população brasileira. O RS é o maior produtor nacional, responsável por cerca de 60% da produção do grão no país (SOSBAI, 2012). No RS o cultivo do arroz é realizado principalmente em várzeas, onde as condições ótimas para o desenvolvimento da cultura quanto a disponibilidade de água possibilita que alguns genótipos atinjam produtividades de até 12 Mg ha⁻¹ (GUIMARÃES et al., 2010).

2.2 Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um elemento essencial na síntese de proteínas e enzimas que garantem a vida do vegetal, além de participar direta e indiretamente de diversos processos bioquímicos das plantas (CARVALHO, 2002; FAGERIA; STONE, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2005). O N é o nutriente mineral quantitativamente mais importante para a fisiologia vegetal. Dessa forma, seu ciclo na natureza é um dos que mais afeta as variadas formas de vida no planeta (VAN LOON; DUFFY, 2001). Com exceção do potássio, o N é o nutriente que a planta de arroz acumula em maior quantidade (FAGERIA; BALIGAR, 1997).

Dentre as várias formas de incrementar a produção vegetal, destaca-se a importância do suprimento de nitrogênio. No arroz o aporte de N é de grande importância no acúmulo de massa seca, refletindo de maneira positiva na produção do vegetal; além de ser responsável por aumentar o número de panículas por área, número de espiguetas por panícula, fertilidade das espiguetas, assim como a massa dos grãos (AKITA, 1989). Os processos que se constituem fontes capazes de fornecer grandes quantidades de nitrogênio são a decomposição da matéria orgânica do solo, a utilização de fertilizantes nitrogenados e a fixação biológica de nitrogênio (FBN) da atmosfera (KUSS, 2006).

Os fertilizantes nitrogenados possuem um custo bastante elevado e a sua utilização de forma irracional pode causar danos ao meio ambiente. É importante que o manejo das culturas vise não somente a redução nos custos de produção, mas também a diminuição dos níveis de poluição causados pelo uso indiscriminado deste nutriente (GUIMARÃES, 2006).

A dinâmica do nitrogênio em sistemas de produção de arroz irrigado é extremamente complexa devido à multiplicidade de formas químicas, reações e processos nos quais está envolvido. Isto reflete no baixo aproveitamento do nutriente - proveniente de fertilizantes minerais - pela cultura, que raramente excede 50% da quantidade aplicada (EMBRAPA, 2005). Dentre os mecanismos envolvidos nas perdas de nitrogênio o sistema solo-planta, a desnitrificação é o principal. Além disso, a baixa eficiência das adubações nitrogenadas pode resultar na contaminação dos mananciais d'água pelo nitrato (NO_3^-) (REEVES et al., 2002), na acidificação do solo e a emissão de óxido nitroso (N_2O) para a atmosfera, gás que contribui para a

destruição da camada de ozônio, sendo 300% mais poluente que o CO₂ (GUIMARÃES, 2006).

Assume-se, portanto, a grande importância à adequação do sistema produtivo, visando à elevação da eficiência de utilização de nitrogênio pelo arroz, mediante o aprimoramento das práticas de manejo que não somente reduzam os custos na produção, mas também diminua os níveis de poluição ambiental causados pelo uso de fertilizantes nitrogenados (GUIMARÃES et al., 2010).

Apesar da abundante quantidade de N na atmosfera terrestre - aproximadamente 78% do ar atmosférico na forma molecular N₂ - o mesmo não é assimilável pelas plantas, uma vez que a ligação tripla e covalente desta molécula não pode ser rompida pelas plantas (FERREIRA et al., 2011). As principais formas de N assimiláveis pelas plantas são o íon nitrato (NO₃) e o íon amônio (NH₄) (FERNADES; SOUZA, 2006).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a redução do N₂ atmosférico a NH₃⁺ (amônia), tornando-o potencialmente assimilável pelas plantas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Esse processo é realizado por micro-organismos do grupo dos Procariotos, como algumas espécies de bactérias, actinomicetos e cianobactérias. Esses micro-organismos capazes de realizar a FBN são denominados genericamente de bactérias diazotróficas.

Plantas capazes de formar associações com bactérias diazotróficas podem se beneficiar da FBN. A simbiose mutualística que ocorre entre determinadas bactérias e plantas da família *Leguminosae* (ex.: soja, feijão, amendoim) são os sistemas mais estudados. Nessa associação simbiótica são observados os maiores ganhos via FBN. Nas raízes das leguminosas formam-se estruturas especializadas denominadas de nódulos, nos quais ocorre a FBN a elevadas taxas (SPRENT e SPRENT, 1990). Entretanto, outras associações, como as que ocorrem com bactérias diazotróficas e plantas da família *Poaceae* (ex.: arroz, cana-de-açúcar, trigo, milho, sorgo sacarino), também apresentam importância neste ciclo.

A associação entre bactérias diazotróficas e plantas da família das *poáceas* (antiga gramíneas) não apresenta uma interação tipicamente simbiótica, como ocorre nas leguminosas, com a formação de estruturas especializadas para a FBN (nódulos). Nesse tipo de associação as bactérias podem invadir o tecido das plantas através de ferimentos na epiderme, pontos de emissão de raízes secundárias e estômatos, sendo distribuídas para o restante da planta via vasos condutores (REIS et al., 2006). De maneira geral, a planta produz e libera para as bactérias produtos fotossintetizados, em contrapartida as bactérias fixam o N atmosférico e transferem NH_4^+ para a planta (FERREIRA et al., 2011).

Bactérias diazotróficas endofíticas são bactérias que possuem a habilidade de colonizarem principalmente o interior de raízes de poáceas. Essas bactérias são divididas em dois grupos: endofíticas facultativas, que são capazes de colonizar tanto a rizosfera, quanto o interior das plantas e em endofíticos obrigatórios, que são capazes de colonizar e sobreviver somente no interior das raízes e parte aérea (BALDANI, et al., 1987). As bactérias presentes nesses dois grupos, incluindo *Herbaspirillum seropedicae*, apresentam baixa sobrevivência no solo (Olivares et al., 1996).

Além da capacidade de converter nitrogênio atmosférico em amônia, forma de N que pode ser utilizada pela planta, as bactérias diazotróficas fazem parte das bactérias denominadas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (*plant growth-promoting rhizobacteria* – PGPR). Desta forma seus efeitos positivos podem ocorrer por influência direta ou indireta (SABINO, 2007), através da produção de hormônios vegetais, solubilização de fosfato e seu antagonismo a espécies patogênicas (BALDANI & BALDANI, 2005; MOREIRA et al. 2010; HUNGRIA, 2011). Um dos principais hormônios vegetais produzidos e liberados por PGPR é o ácido indolacético (AIA) (BHATTACHARYYA & JHA, 2012). Esse fitorregulador pode promover o aumento no número de pelos radiculares e no comprimento das raízes (Barbieri et al., 1986), possuindo importante papel na recuperação e na conservação de ecossistemas (BAZZICALUPO & OKON, 2000; MELLONI et al., 2004).

A procura por bactérias diazotróficas, capazes de converter nitrogênio gasoso da atmosfera em amônia disponível para a planta, levou o isolamento de diversas bactérias a partir do solo, da rizosfera, do rizoplane e do interior dos tecidos vegetais de poáceas e outras famílias (DÖBEREINER et al., 1995; DOBBELAERE et al.,

2003). Bactérias endofíticas facultativas, que habitam a rizosfera de poáceas e tem a capacidade de penetrar nas plantas, têm sido descritas como *Azospirillum* spp. *acillus* spp. e *Paenibacillus* spp, que quando utilizadas como inoculante, apresentam efeitos benéficos ao crescimento vegetal (SELDIN et al., 1998; CURÁ et al., 2005). Outras bactérias, por sua habilidade de colonizar os tecidos internos das plantas e estabelecer intrínsecas relações de associação com seu hospedeiro, têm apresentado eficiente fixação de nitrogênio atmosférico, como é o caso de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GILLIS et al., 1989) e *Herbaspirillum* spp. (GYANESHWAR et al., 2001).

Estudos que visem aumentar o conhecimento sobre a interação entre as plantas de arroz e bactérias diazotróficas, podem contribuir para a seleção de estirpes de bactérias diazotróficas e sistemas de produção que potencializem a contribuição da FBN, e outros mecanismos de promoção de crescimento, às plantas (GUIMARÃES et al., 2010). Tal condição pode resultar na diminuição da aplicação de fertilizantes sintéticos, principalmente os nitrogenados, na cultura do arroz.

O sucesso na utilização de bactérias diazotróficas como inoculante está relacionado à habilidade de selecionar, incorporar e manter populações benéficas no campo, sendo que se busca o desenvolvimento de sistemas de produção e manejo que beneficiem as populações de diazotróficos. Pesquisas apontam para o fato de que o arroz forma associações com variadas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio, e que alguns destes micro-organismos podem ser responsáveis por suprir as plantas com o nitrogênio necessário ao seu crescimento ou substâncias promotoras de crescimento (KUSS et al., 2008).

A cultura do arroz irrigado apresenta uma ecologia microbiana especial, com mudanças na diversidade, estrutura e dinâmica de comunidades (KUSS, 2006). O solo cultivado com arroz irrigado pode ser considerado um sistema com três compartimentos, caracterizados por diferentes condições físico-químicas (LIESACK et al., 2000), sendo formado por (i) uma camada superficial oxidada, apresentando oxigênio dissolvido e compostos oxidados, (ii) uma camada reduzida, sem a presença de oxigênio e (iii) outra camada oxidada, localizada na rizosfera do arroz, que representa a região do solo imediatamente em contato com a raiz e que sofre influências da atividade do sistema radicular (SOUZA et al., 2012). A camada reduzida formada durante o alagamento do arroz promove um ambiente adequado

ao desenvolvimento de bactérias microaerófilas como as do gênero *Azospirillum* (DÖBEREINER, 1990; CARDOSO et al., 2010; SOUZA et al., 2012), além de fornecer uma fonte constante e regular de substratos de carbono (LADHA & REDDY, 2003).

Diferentes variedades de arroz podem responder de forma diferente à inoculação com bactérias diazotróficas (GUIMARÃES et al. 2003; GUIMARÃES et al., 2010; VIANA, 2012; GUIMARÃES et al. 2013). Guimarães et al. (2000) avaliaram a capacidade de resposta de três cultivares de arroz irrigado à inoculação com diferentes estirpes de *Burkholderia* spp. e encontraram variações de 67 a 111% na massa seca produzida pelas plântulas de arroz avaliadas, em relação a testemunha, atribuindo-se estas diferenças à especificidade entre estirpes bacterianas e cultivares utilizadas. Kuss et al. (2007) ao analisar a inoculação das bactérias diazotróficas sobre o desenvolvimento de arroz em solução nutritiva, também encontrou diferenças entre cultivares de arroz irrigado na fixação de N e efeitos de diferentes estirpes bacterianas utilizadas, encontrando cultivares com melhores respostas à inoculação, avaliada através do crescimento das plântulas de arroz. A identificação de cultivares que se beneficiem do processo de FBN é uma das etapas primárias, fundamentais para viabilizar os estudos de identificação de micro-organismos e suas relações com a planta (CAMPOS et al., 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Densidade e isolamento de bactérias diazotróficas endofíticas de diferentes variedades de arroz.

O experimento para o isolamento e contagem do número de células de bactérias diazotróficas foi realizado a partir do cultivo de plantas de arroz em câmara de crescimento (fitotron), com controle de temperatura e luminosidade, durante o mês de junho de 2012. Foram utilizadas 20 cultivares de arroz irrigado produzidas no estado do Rio Grande do Sul, sendo: BRS Querência, Puitá Inta, IRGA 420, IRGA 409, IRGA 426, IRGA 423, IRGA 421, IRGA 414, IRGA 418, IRGA 425, IRGA 428, BR IRGA 410, BRS TAIM, IRGA 422 CL, IRGA 416, IRGA 417, IRGA 427, IRGA 424, BRS SINUELO e BRS PAMPA.

As 20 cultivares foram semeadas em vasos contendo 1 kg de solo de um Planossolo Hidromórfico Eutrófico arênico (EMBRAPA, 2006), coletado na área experimental pertencente ao Departamento de Fitotecnia da UFSM-RS, em uma área de várzea cultivada anteriormente com arroz. O solo apresentava as seguintes características físicas e químicas: 2,06% de matéria orgânica; 21% de argila; 42,6 mg dm⁻³ de S; 36,3 mg dm⁻³ de P; 292,0 mg dm⁻³ de K; 4,6 cmol_c dm⁻³ de Ca; 1,8 cmol_c dm⁻³ de Mg; pH H₂O de 4,7; CTC a pH7 de 14,6 cmol_c dm⁻³.

Antes do plantio, as sementes das cultivares foram desinfestadas conforme Hurek et al. (1994), para que a microbiota associada à planta correspondesse apenas àquela presente no solo. Após 30 dias, as 20 plantas foram colhidas para o isolamento e a contagem do número de células viáveis. Os micro-organismos diazotróficos foram quantificados usando a técnica de diluição seriada, com a utilização de três meios de cultivo semiseletivos livres de nitrogênio (N): JNFb, NFb e LGI. Esses meios têm sido utilizados para a quantificação e o isolamento de bactérias da espécie *Herbaspirillum seropedicae*, do gênero *Azospirillum* ssp. e da espécie *Azospirillum amazonense*, respectivamente.

Para o isolamento e contagem das células, as amostras de raiz e parte aérea foram separadas, lavadas e desinfestadas superficialmente com álcool 70%, por um minuto, hipoclorito de sódio 2%, por 5 minutos e lavagem com água destilada autoclavada. Um grama de material vegetal foi suspenso em 9 mL de solução salina e macerado com auxílio de cadinho e pistilo. A solução resultante foi diluída sucessivamente até 10^{-5} para as raízes e 10^{-4} para a parte aérea. Alíquotas de 100 μ L de cada diluição, foram inoculadas em frascos contendo 5,5 mL de cada meio de cultura semissólido. Foram utilizadas três repetições por diluição inoculada nos frascos contendo meio semissólido, os quais foram incubados a 30 °C em incubadora BOD. No sétimo dia de incubação foram realizadas as avaliações sendo considerados positivos os frascos que apresentaram a formação da película característica do crescimento de bactérias diazotróficas nos meios de cultivo. O número de frascos positivos para cada diluição foi utilizado para a estimativa do número de células por grama de matéria fresca de colmos e raízes, utilizando o método do Número Mais Provável (NMP).

As culturas que apresentaram o crescimento na forma de película característica, em ambos os meios de cultivo, foram utilizadas no isolamento e purificação das bactérias diazotróficas (DOBEREINER et al., 1995; BALDANI et al., 2000).

3.2 Quantificação do N₂ fixado

Para a quantificação do N total fixado pelas bactérias diazotróficas isoladas, uma colônia pura foi inoculada em meio de cultura líquido (DYGS modificado) e incubada sob agitação por 24h. Após a incubação, uma alíquota de 100 μ L foi transferida para os meios de cultura semissólidos: NFb e JNFb (três repetições), ausente de N, e incubado em estufa à 30°C por 72h. Como controle, utilizou-se uma prova branca, contendo apenas o meio de cultura semissólido não inoculado, e uma prova positiva, contendo o meio de cultura com uma quantidade conhecida de N (100 μ g de NH₄⁺). O nitrogênio total foi quantificado após digestão sulfúrica e destilação com NaOH conforme descrito por Camargo et al.,(1999).

3.3 Produção de ácido-3-indolacético (AIA)

Para verificar o potencial da produção de auxinas, os isolados foram testados através do método de microplaca descrito por Sarwar e Kremer (1995). As bactérias foram cultivadas em meio DYGS líquido por 24 horas sob temperatura de 30°C. Em seguida, uma alíquota de 20 µL de cultura bacteriana foi inoculada em frascos contendo 5mL de meio DYGS suplementado com L-triptofano na concentração final de 100 mg mL⁻¹. Os tubos permaneceram no escuro sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C. Alíquotas de um mL foram retiradas após 48 horas de cultivo e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos. Em microplacas de 96 poços, uma alíquota de 150 µL do sobrenadante foi misturado a 100 µL do reagente de Salkowski (1 mL de 0,5 M FeCl₃ em 49 mL de ácido perclórico 35 %) previamente preparado. As amostras permaneceram no escuro por 30 minutos sob temperatura ambiente e a leitura de absorvância foi feita em um leitor de microplaca em um comprimento de onda de 540 nm. A concentração dos compostos indólicos foi estimada utilizando uma curva padrão previamente preparada com quantidades conhecidas de ácido indolacético (25 a 300 mg mL⁻¹).

Para normalizar os valores da determinação dos compostos indólicos, o conteúdo de proteínas foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976). As células centrifugadas durante o procedimento de determinação dos compostos indólicos foram ressuspensas em 1 mL de meio DYGS líquido, alíquotas de 100 µL desta suspensão foram transferidas para um tubo contendo 100 µL de NaOH 1mol L⁻¹. A mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente para lise das células. Posteriormente, 100 µL da solução anterior foi adicionado a 900 µL de solução de Bradford e incubada sob temperatura de 37°C por 30 minutos. As leituras foram feitas em leitor de microplaca com comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteína foi determinada usando a curva padrão obtida pelos valores de absorvância das quantidades conhecidas de BSA (soro-albumina bovina), nas seguintes concentrações: 0, 2, 4, 8, 12, 16 e 25 µg mL⁻¹. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o resultado foi decorrente de uma média das 3 leituras.

3.4 Experimento de inoculação *in vitro*

As dez cultivares de arroz irrigado que apresentaram os maiores números de células de diazotróficos por grama de matéria fresca no primeiro estudo foram selecionadas para comporem o estudo *in vitro*. Estas dez cultivares foram inoculadas com as 9 estirpes de bactérias diazotróficas que obtiveram os melhores resultados nos testes de quantificação do N₂ fixado e de produção de auxinas.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial (10 x 11) em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições, onde foram analisados 10 variedades de arroz irrigado inoculadas com 9 isolados de diazotróficos, além do isolado ZAE94 (*Herbaspirillum seropedicae* - depositado na coleção de culturas de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia com o código BR11417) cedido pela Embrapa Agrobiologia e um controle sem inoculação.

O experimento foi conduzido em tubos de ensaio com capacidade para 120 mL, contendo 60 mL de solução de Hoagland's sem nitrogênio, com 6 g de agar/L. Os tubos, contendo a solução nutritiva agarizada, foram tampados com uma rolha de algodão e esterilizados em autoclave. Após a esterilização e a solidificação do ágar as sementes previamente esterilizadas de acordo com Hurek et al. (1994), foram semeadas na superfície do meio e logo após inoculadas com 1 mL de cultura bacteriana.

Aos vinte e cinco dias da condução do experimento as plântulas foram colhidas e analisadas quanto a sua matéria fresca de planta inteira, altura da parte aérea e comprimento de raiz.

3.5 Experimento em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação nos meses de março a maio de 2013. Foram utilizados vasos plásticos com capacidade de 5 kg, sendo preenchido com 4 kg de um Planossolo Háplico eutrófico arênico (EMBRAPA, 2006). O solo foi coletado de uma área de várzea não cultivada nos últimos anos com arroz, no Departamento de Solos da UFSM-RS. As características químicas e físicas do solo na camada de 0-20 cm foram: 2,2% de matéria orgânica; 29% de argila; 6

mg dm⁻³ de P; 88 mg dm⁻³ de K; 3,3 cmol_c dm⁻³ de Ca; 1,7 cmol_c dm⁻³ de Mg; pH H₂O de 4,3; CTC pH7^{de} 22,6 cmol_c dm⁻³. A correção da fertilidade do solo foi realizada segundo recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes conforme Comissão de Química e Fertilidade do Solo (CQFS) – RS-SC (2004).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com esquema fatorial 3 (cultivares) x 4 (estirpes), com três repetições, com os seguintes tratamentos: inoculação (Isol.12; Isol.12+50%N; Isol.13; Isol.13+50%N; Isol.29; Isol.29+50%N; ZAE94; ZAE94+50%N), além de três controles não inoculados, um sem nitrogênio mineral, um com 50% da dose recomendada N (30 kg de N ha⁻¹) e outro com 100% da dose de N recomendada (60 kg de N ha⁻¹), e três variedades de arroz irrigado, IRGA 409, Puitá Inta-CL e BRS Pampa. As estirpes que apresentaram melhor eficiência na associação no teste *in vitro* e as três cultivares mais responsivas a inoculação foram selecionadas.

As sementes das variedades de arroz foram previamente esterilizadas de acordo com Hurek et al. (1994). Posteriormente, foi realizada a inoculação das estirpes, com inoculante preparado com turfa esterilizada em autoclave, na proporção 2:1 de turfa e culturas em meio DYGS. O número de células viáveis foi determinado pelo método do Número Mais Provável (NMP) nos meios de cultura NFb e JNFb, obtendo-se o valor de 1,4x10⁸ células viáveis/mL.

Antes do plantio, as sementes foram envoltas na turfa e secas à sombra, na proporção de 10 g do inoculante por kg de semente. Foram semeadas 6 sementes por vasos e após 10 dias foram mantidas 2 plantas por vasos.

A adubação nitrogenada foi realizada segundo recomendação da Comissão de Química e Fertilidade do Solo (CQFS) – RS-SC (2004). O nitrogênio foi aplicado na forma de ureia, sendo parcelado em duas vezes, com a primeira aplicação aos 15 dias após emergência das plântulas, totalizando a metade da dose recomendada, e a segunda aplicação aos 30 dias após a emergência das plântulas. Em todas as parcelas, o alagamento do solo teve início 15 dias após a emergência das plantas e mantido até à colheita, através de uma lâmina de água com aproximadamente 5 cm de altura.

Após 60 dias de cultivo foram avaliadas a produção de matéria seca da parte aérea, matéria seca de raízes, altura das plantas, perfilhamento e nitrogênio total. As plantas foram colhidas, cortando-se a parte aérea rente ao solo e o material colhido

foi lavado com água destilada. A parte aérea e as raízes foram secas em estufa com circulação forçada de ar, a 60–70°C, até atingir massa constante. Após o material foi moído e analisado quanto aos teores de N total em analisador elementar (modelo FlashEA 1112, Thermo Finnigan, Milan, Itália).

3.6 Análises estatísticas

Os dados foram analisados com o auxílio do programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2003), sendo a comparação de médias realizada pelo teste Scott-Knott (SCOTT & KNOTT, 1974) a 5 % de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1 Contagem e isolamento de bactérias diazotróficas

A população de bactérias diazotróficas endofíticas na parte aérea obtidas em meio de cultivo JNFb, semisseletivo para o gênero *Herbaspirillum*, variou de 0,60 a 3,15 Log do número de células g⁻¹ de matéria fresca. Resultado semelhante foi observado para as bactérias oriundas em meio LGI, semisseletivo para *Azospirillum amazonense* (Tabela 1). Quando as contagens das populações foram realizadas em meio semissólido NFb, semisseletivo para o gênero *Azospirillum*, houve uma variação de 1,18 a 3,15 Log do número de células g⁻¹ de matéria fresca. Com relação à população de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas das raízes estes variaram (expressos em log do número de células g⁻¹ de matéria fresca) de 0,95 a 4,14 fresca para o meio JNFb, de 1,54 a 4,15 para o meio NFb e de 1,40 a 4,15 para o meio LGI. As maiores populações de bactérias diazotróficas foram obtidas das raízes das cultivares IRGA 420, IRGA 426, IRGA 422-CL, IRGA 418, IRGA 417, Puitá Inta-CL, BRS Taim e BRS Pampa.

Para a obtenção dos isolados foram utilizados somente os meios NFb e JNFb, por serem os meios mais utilizados para a obtenção de isolados de diazotróficos em arroz. Foram obtidos 35 isolados, dos quais 20 foram isolados do meio semissólido NFb e 15 do meio JNFb.. Destes, 24 foram obtidos do sistema radicular e 11 da parte aérea das plantas. Do total, 8 foram isolados da cultivar IRGA 428, 6 da cultivar Puitá Inta-CL, 3 das plantas de arroz que cresceram espontaneamente na área de várzea onde foi coletado o solo para o primeiro estudo (Puitá Inta-CL V), 7 da cultivar IRGA 426, 6 da cultivar IRGA 418, 2 da cultivar IRGA 417, 1 da cultivar IRGA 416, 1 da cultivar IRGA 422 e 3 isolados da cultivar IRGA 424 (Tabela 2).

Tabela 1- Logaritmo (\log_{10}) do número de bactérias diazotróficas presentes na parte aérea e nas raízes das cultivares estudadas, nos três meios de cultivo testados, pela técnica do número mais provável (n° de células por grama de matéria fresca).

CULTIVAR	PARTE AÉREA			RAIZ		
	JNFb*	NFb**	LGI***	JNFb	NFb	LGI
IRGA 427	0,60	1,18	1,18	4,04	3,15	3,30
IRGA 424	2,40	1,40	1,88	3,65	1,88	2,65
BRS SINUELO-CL	3,15	1,81	1,15	2,65	2,30	3,65
BRS TAIM	3,15	3,15	3,15	4,15	4,15	3,15
IRGA 422-CL	3,15	3,15	3,04	4,04	4,15	3,15
IRGA 416	3,15	3,15	3,15	4,04	4,04	3,18
BR-IRGA 414	1,18	1,40	0,60	3,65	3,04	1,40
BRS QUERENCIA	2,40	1,65	-	4,15	3,65	2,15
BR-IRGA 410	1,40	1,98	1,98	2,65	1,88	2,18
IRGA 421	2,65	2,40	1,48	1,78	1,48	-
IRGA 418	3,15	3,15	3,15	4,15	4,15	4,15
IRGA 425	1,40	2,40	3,15	4,04	2,88	2,18
IRGA 428	1,40	1,65	1,88	3,65	4,15	3,04
IRGA 417	3,15	3,15	3,15	4,15	4,15	4,15
PUITA INTA-CL	3,15	3,15	3,15	4,15	4,15	4,15
BRS PAMPA	3,15	3,15	3,15	4,15	4,15	4,15
IRGA 420	3,15	3,15	3,15	4,15	4,15	4,15
IRGA 423	3,15	3,15	3,15	0,95	1,04	2,20
PUITA INTA-CL V	3,15	3,15	3,15	4,04	4,04	4,15
BR-IRGA 409	2,48	3,15	0,78	1,40	1,54	2,88
IRGA 426	3,15	3,15	3,15	4,15	4,15	4,15

JNFb*: *Herbaspirillum seropedicae*; NFb**: *Azospirillum ssp* e LGI***: *Azospirillum amazonense*.

4.2 Fixação biológica de nitrogênio

Todos os isolados fixaram nitrogênio em meio de cultivo (Tabela 2). A taxa de nitrogênio fixado variou de 40,53 a 96,05 $\mu\text{g N mL}^{-1}$, sendo a média geral de 55 $\mu\text{g N mL}^{-1}$. Verificou-se que dos 35 isolados testados, o isolado 13, obtido da parte aérea da cultivar IRGA 418 no meio NFb, semisseletivo para *Azospirillum*, diferiu estatisticamente dos demais isolados, fixando 96,05 $\mu\text{g N mL}^{-1}$ de nitrogênio total em meio de cultura semisseletivo livre de N, 76% a mais do que a média geral; seguido

de mais 19 isolados que também obtiveram valores elevados na fixação de N atmosférico. O isolado 6, obtido da raiz da cultivar Puitá Inta - CL no meio semisseletivo para o gênero *Azospirillum*, foi o que apresentou menor valor na fixação de N atmosférico.

4.3 Produção de ácido-3-indolacético (AIA)

Os isolados analisados apresentaram produção diferenciada de AIA (Tabela 2). Os valores encontrados para as estirpes avaliadas variaram entre 0,87 e 45,56 μg AIA mg^{-1} de proteína. O isolado 14 foi o que produziu as maiores quantidades de AIA, 45,56 μg de AIA mg^{-1} de proteína, sendo este isolado obtido da parte aérea da cultivar Puitá Inta-CL em meio NFb. Os isolados 29, 31, 32 e 24 (oriundos das raízes das cultivares IRGA426; IRGA424; IRGA426 e IRGA428, respectivamente) e o isolado 26 (da parte aérea da cultivar IRGA418) produziram 31, 27, 21, 26 e 27 μg de AIA mg^{-1} de proteína, respectivamente. Não houve diferença na produção de AIA quanto ao local de isolamentos (raiz ou parte aérea) das bactérias diazotróficas e em relação aos meios utilizados. A menor produção de AIA foi do isolado 7, obtido da parte aérea da cultivar IRGA428 em meio JNFb, semisseletivo para bactérias do gênero *Herbaspirillum*.

Tabela 2- Identificação dos isolados obtidos dos diferentes tecidos das cultivares de arroz testadas, meio de cultura do isolamento, quantidade de N fixado e produção de auxina dos isolados.

ISOLADOS	CULTIVAR DE ISOLAMENTO	TECIDO VEGETAL	MEIO DE CULTURA DO ISOLAMENTO	N FIXADO µg /mL	µg AIA / mg proteína ¹
ISOLADO 1	IRGA 428	RAÍZ	JNFb	59,27 b	4,32 d
ISOLADO 2	PUITÁ INTA-CL V	PARTE AÉREA	NFb	45,56 c	2,94 d
ISOLADO 3	IRGA 428	RAÍZ	NFb	51,26 c	5,22 d
ISOLADO 4	IRGA 426	RAÍZ	NFb	55,15 b	3,71 d
ISOLADO 5	PUITÁ INTA-CL V	RAÍZ	NFb	46,08 c	3,07 d
ISOLADO 6	PUITÁ INTA-CL	RAÍZ	NFb	40,53 c	4,69 d
ISOLADO 7	IRGA 428	PARTE AÉREA	JNFb	44,39 c	0,26 d
ISOLADO 8	IRGA 428	RAÍZ	JNFb	40,72 c	6,07 d
ISOLADO 9	IRGA 418	PARTE AÉREA	NFb	43,47 c	2,79 d
ISOLADO 10	IRGA 428	RAÍZ	NFb	49,35 c	7,44 d
ISOLADO 11	IRGA 418	RAÍZ	NFb	49,35 c	10,56 d
ISOLADO 12	IRGA 428	RAÍZ	JNFb	61,60 b	20,65 c
ISOLADO 13	IRGA 418	PARTE AÉREA	JNFb	96,05 a	3,63 d
ISOLADO 14	PUITÁ INTA-CL V	PARTE AÉREA	NFb	46,59 c	45,56 a
ISOLADO 15	PUITÁ INTA-CL	RAÍZ	NFb	49,20 c	6,94 d
ISOLADO 16	PUITÁ INTA-CL	RAÍZ	NFb	58,72 b	4,81 d
ISOLADO 17	IRGA 422	RAÍZ	NFb	51,30 c	0,87 d
ISOLADO 18	IRGA 417	RAÍZ	NFb	50,89 c	19,00 c
ISOLADO 19	IRGA 426	PARTE AÉREA	NFb	55,63 b	7,08 d
ISOLADO 20	IRGA 428	RAÍZ	NFb	48,94 c	4,54 d
ISOLADO 21	IRGA 426	RAÍZ	JNFb	51,74 c	1,07 d
ISOLADO 22	IRGA 426	RAÍZ	JNFb	56,81 b	9,51 d
ISOLADO 23	IRGA 418	PARTE AÉREA	NFb	56,74 b	4,16 d
ISOLADO 24	IRGA 428	RAÍZ	JNFb	59,49 b	27,29 b
ISOLADO 25	IRGA 424	RAÍZ	JNFb	63,60 b	10,97 d
ISOLADO 26	IRGA 418	PARTE AÉREA	NFb	50,01 c	26,67 b
ISOLADO 27	IRGA 428	RAÍZ	JNFb	65,73 b	6,83 d
ISOLADO 28	IRGA 418	PARTE AÉREA	NFb	55,64 b	6,36 d
ISOLADO 29	IRGA 426	RAÍZ	JNFb	55,64 b	31,41 b
ISOLADO 30	IRGA 417	RAÍZ	NFb	53,83 b	9,59 d
ISOLADO 31	IRGA 424	RAÍZ	JNFb	60,56 b	27,71 b
ISOLADO 32	IRGA 426	RAÍZ	JNFb	60,37 b	21,34 c
ISOLADO 33	IRGA 424	RAÍZ	JNFb	66,88 b	13,82 d
ISOLADO 34	IRGA 426	PARTE AÉREA	JNFb	60,57 b	4,17 d
ISOLADO 35	IRGA 416	PARTE AÉREA	NFb	56,00 b	0,15 d

Médias na coluna seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de teste Skott Knot, a 5% de probabilidade

4.4 Experimento *in vitro*

As cultivares de arroz irrigado testadas responderam de forma diferenciada quando inoculadas com os isolados selecionados que apresentaram maiores produções de AIA e taxa de fixação de nitrogênio *in vitro*. A produção de massa fresca das variedades de arroz variou de 41,3 a 150,8 mg para os diferentes tratamentos (Tabela 3). A inoculação da variedade IRGA 409 com os isolados 12 e 13, proporcionaram incrementos na matéria fresca de 32 e 40% em relação a testemunha sem inoculação. As variedades Puitá inta-CL e BRS Pampa quando inoculadas com o isolado 12 produziram 146,2 e 133,8 mg de matéria fresca, respectivamente. A inoculação das variedades IRGA 409 e BRS Pampa com o isolado ZAE94 proporcionou incrementos significativos em relação aos demais tratamentos.

Em relação ao comprimento de raiz, a variedade IRGA 409 quando inoculada com os isolados 12 e ZAE94 apresentou comprimento de raiz de 6,10 e 4,5 cm, enquanto a testemunha sem inoculação apresentou 3,3 cm (Tabela 4). A inoculação do isolado 13 e ZAE94 proporcionou incrementos no comprimento de raízes de 129 e 82%, respectivamente em relação à testemunha sem inoculação. Para a variedade BRS Pampa, o comprimento das raízes com a inoculação com os isolados 12, 13 e ZAE94, variou de 6,16 a 7,25 cm, e a enquanto a testemunha sem inoculação apresentou 5,60 cm.

Tabela 3- Produção de matéria fresca (mg) de planta inteira (parte aérea + raiz) de 10 cultivares de arroz irrigado cultivadas *in vitro*, com e sem inoculação de 10 isolados de bactérias diazotróficas.

Cultivar	S. Inoc	Com Inoculação									
		Isol 12	Isol 13	Isol 14	Isol 24	Isol 27	Isol 29	Isol 31	Isol 33	Isol 34	ZAE94
BR-IRGA409	75,8 bB	100,3 cA	105,8 cA	98,96 bA	83,5 aB	52,0 cB	60,3 cC	59,2 cB	79,5 bB	115,3 bA	101,9 aA
IRGA417	81,8 bB	65,1 cB	117,7 bA	104,13 bA	118,2 aA	140,8 aA	113,0 aA	133,2 aA	88,5 bB	79,9 cB	81,6 bB
IRGA 418	71,7 bB	133,8 bA	106,5 bA	80,10 bB	118,0 aA	133,3 aA	102,4 bA	106,3 bA	110,8 aA	107,5 bA	54,9 bB
IRGA 422 CL	106,8 aA	127,9 bB	106,5 bB	116,93 aB	100,0 aB	150,8 aA	132,1 aA	107,1 bB	111,0 dA	88,9 cB	77,2 bB
IRGA 424	69,1 bB	131,8 bA	126,7 aA	115,63 aA	84,9 aB	113,5 aA	90,0 bB	132,2 aA	107,9 aA	67,9 cB	76,0 bB
IRGA 426	84,9 bB	126,9 bA	145,9 aA	85,56 bB	58,1 bB	88,6 bB	98,4 bB	92,7bB	105,8 aB	142,8 aA	96,8 aB
IRGA 428	76,7 bB	175,5 aA	140,1 aA	113,86 aA	95,0 aA	148,5 aA	130,5 aA	65,6 cB	115,8 aA	107,3 bB	110,3 aA
PUITÁINTACL	63,1 bC	146,2 bA	96,0 bB	105,65 bB	110,8 aB	106,2 aB	102,9 bB	102,8 bB	41,3 cD	79,1 cC	87,8 bB
BRSQUERÊNCIA	58,8 bB	105,8 cA	0,00 cC	117,30 aA	96,8 aA	95,2 bA	0,0 dC	110,9 bA	72,6 bB	96,0 cA	0,0 cC
BRS PAMPA	120,2 aA	133,8 bA	93,3 bB	141,26 aA	51,1 bC	126,7 aA	82,9 bB	98,0 bB	83,0 bB	84,5 cB	104,0 aB

Médias na coluna e na linha com letras minúsculas e maiúsculas, respectivamente, não diferem entre si pelo teste de teste Skott Knot, a 5% de probabilidade.

Tabela 4- Comprimento de raiz (cm) de 10 cultivares de arroz irrigado cultivadas *in vitro* com e sem a inoculação de 10 isolados de bactérias diazotróficas.

Cultivar	S. Inoc	Com Inoculação									
		Isol 12	Isol 13	Isol 14	Isol 24	Isol 27	Isol 29	Isol 31	Isol 33	Isol 34	ZAE94
BR-IRGA 409	3,30 cB	6,10 aA	2,50 cB	3,90 aB	4,68 bA	5,00 aA	5,06 cC	3,66 bB	5,46 cA	7,16 bA	4,50 bA
IRGA417	3,80 cA	3,30 bA	6,00 bA	4,40 aA	5,80 bA	3,83 aA	4,76 cA	5,10 bA	4,60 cA	4,73 cA	3,70 bA
IRGA 418	9,20 aA	7,20 aB	10,76 aA	5,83 aB	8,36 aA	6,46 aB	7,95 bA	8,30 aA	9,26 aA	10,03 aA	5,50 aB
IRGA 422 CL	5,01 bB	4,40 bB	7,26 bA	4,50 aB	5,93 bB	5,00 aB	8,80 aA	6,05 bB	6,30 cB	5,93 bB	5,66 aB
IRGA 424	5,35 bA	5,89 aA	6,43 bA	5,36 aA	5,70 bA	4,53 aA	7,20 bA	5,15 bA	5,00 cA	6,33 bA	5,46 aA
IRGA 426	5,86 bB	4,90 bC	9,20 aA	6,38 aB	4,30 bC	5,90 aB	10,25 aA	7,05 aB	7,13 bB	6,63 bB	7,15 aB
IRGA 428	6,00 bA	4,83 bA	5,50 bA	4,88 aA	5,33 bA	4,23 aA	4,30 cA	4,00 bA	5,65 cA	3,70 cA	4,25 bA
PUITÁ INTA-CL	3,10 cC	5,95 aA	7,10 aA	5,15 aB	6,20 bA	5,03 aB	6,53 bA	7,46 aA	7,13 bA	6,10 bA	5,63 aA
BRSQUERÊNCIA	5,50 bA	5,10 bA	0,00 dB	4,80 aA	5,05 bA	5,00 aA	0,00 dB	5,20 bA	5,90 cA	3,00 cA	0,00 cB
BRS PAMPA	5,60 bA	6,16 aA	7,25 bA	6,53 aA	7,00 aA	5,43 aA	6,20 bA	4,55 bA	6,70 bA	7,60 cA	6,66 aA

Médias na coluna e na linha com letras minúsculas e maiúsculas, respectivamente, não diferem entre si pelo teste de teste Skott Knot, a 5% de probabilidade.

4.5 Experimento em casa de vegetação

A inoculação dos diferentes isolados de modo separado ou em combinação com metade da dose de nitrogênio recomendada para a cultura do arroz aumentou o perfilhamento, a produção de matéria seca da parte aérea, matéria seca de raiz e N acumulado na parte aérea das plantas (Tabela 5). A inoculação do isolado 12 na cultivar IRGA 409, proporcionou aumento no número de perfilhos de 80, 57 e 12% em relação à testemunha sem inoculação, ao tratamento com 50% da dose de N e ao tratamento que recebeu 100% da dose de nitrogênio, respectivamente. Na cultivar Putiá Inta-CL os isolados 29 e ZAE94 foram estatisticamente iguais ao tratamento com 100% da dose de N. O isolado 12 e a combinação do isolado 12+50% N e o isolado 13+50% N, apresentaram comportamento semelhante ao tratamento com 100% de N.

Com relação à produção de matéria seca da parte aérea, a inoculação da cultivar IRGA 409 com ZAE94, o isolado 12+50% de N, isolado 29+50% de N e ZAE94+50% de N, proporcionaram incrementos de 48, 40, 44 e 45% em relação à testemunha sem a aplicação de nitrogênio (Tabela 5). A cultivar Puitá Inta-CL, apresentou os melhores resultados com a aplicação de 100% da dose de nitrogênio. A produção de matéria seca da parte aérea da cultivar BRS Pampa variou de 3,76 a 6,33 g planta⁻¹. A inoculação desta cultivar com o isolado 12+50% da dose de N, aumentou a produção de matéria seca em 69%. A cultivar IRGA 409 quando inoculada com os isolados 12 e ZAE94 com a aplicação de 50% da dose de N, favoreceu uma produção de matéria seca de raiz de 15,10 e 19,63 g vaso⁻¹, respectivamente. As cultivares Puitá Inta-CL e BRS Pampa, quando inoculadas com os isolados ZAE94 e o isolado 12, respectivamente apresentavam um sistema radicular semelhante aos das plantas do tratamento que recebeu 100% da dose do N.

Para o nitrogênio acumulado na parte aérea houve uma variação de 26,07 a 45,83 mg planta⁻¹ (Tabela 5). A cultivar IRGA 409 quando inoculada com a estirpe ZAE94, isolado 12+50% de N, isolado 29+50% de N e a estirpe ZAE94+50% da dose de N foram estatisticamente semelhantes ao tratamento com 100% da dose de N aplicada. A inoculação do isolado 12+50% da dose de

N nas cultivares Puitá Inta-CL e BRS Pampa proporcionaram incrementos de nitrogênio na parte aérea de 25 e 45%, respectivamente em relação ao tratamento sem a aplicação de N. Nas condições testadas, a inoculação dos isolados + 50% da dose de nitrogênio proporcionou maiores incrementos nos teores de nitrogênio na parte aérea em relação a 50% da dose de N aplicado.

Tabela 5 – Perfilamento, matéria seca de parte aérea, matéria seca de raiz e N acumulado em plantas de arroz irrigado cultivadas em casa de vegetação, com e sem inoculação de isolados de bactérias diazotróficas combinados ou não a doses de N.

Perfilamento por planta											
CULTIVARES	-----Com Inoculação-----				-----Com Inoculação +50% de N-----				-----Sem inoculação-----		
	Isol 12	Isol 13	Isol 29	ZAE94	Isol 12	Isol 13	Isol 29	ZAE94	Sem N	50% de N	100% de N
IRGA 409	5,62 aA	3,25 bC	4,33 bC	4,12 bC	5,13 aB	3,75 bC	4,41 aB	4,75 aB	3,12 aC	3,58 bC	5,00 aB
Puitá Inta-CL	4,75 bB	4,08 aB	5,00 aA	4,87 aA	4,75 aB	4,50 aB	4,62 aB	4,58 aB	3,58 aB	4,37 aB	5,58 aA
BRS Pampa	4,41 bA	4,33 aB	3,83 bB	4,25 bB	4,50 aA	4,62 aA	4,08 aB	5,12 aA	3,12 aC	3,75 bB	5,00 aA
Matéria seca parte aérea por planta (g)											
IRGA 409	5,32 aA	4,56 aB	4,39 bB	5,52 aA	5,19 bA	4,86 aA	5,37 aA	5,41 aA	3,72 aC	3,72 cC	5,44 aA
Puitá Inta-CL	4,54 bB	4,48 aB	5,17 aB	3,78 bC	4,62 bB	4,86 aB	4,93 aB	5,09 aB	3,41 aC	4,65 bB	6,12 aA
BRS Pampa	4,49 b C	4,17 aD	4,44 bC	4,17 bD	6,33 aA	4,95 aC	4,60 aC	5,36 aB	3,76 aD	4,7 aC	5,25 bB
Matéria seca raiz por planta (g)											
IRGA 409	10,19 aB	7,93 bB	11,46 aB	7,93 bB	15,10 aA	7,57 bB	11,2 bB	19,63 aA	7,70 aB	7,70 bB	10,29 bB
Puitá Inta-CL	12,23 aC	14,06 aC	10,04 aD	25,22 aA	11,10 bD	15,02 aC	21,58 aB	13,10 bC	7,17 aD	19,65 aB	18,28 aB
BRS Pampa	13,61 aA	6,08 bB	8,49 aB	10,27 bA	7,79 bB	11,65 aA	10,59 bA	9,67 bA	7,66 aB	6,12 bB	14,04 aA
N acumulado por planta (mg)											
IRGA 409	34,55 aB	32,06 aB	30,42 aB	40,54 aA	36,67 bA	33,72 aB	37,86 aA	41,62 aA	27,80 aB	27,26 bB	40,73 aA
Puitá Inta-CL	29,44 aB	26,78 aB	35,04 aA	26,07 bB	32,84 bA	33,12 aA	35,66 aA	35,49 aA	26,29 aB	33,03 aA	42,90 aA
BRS Pampa	30,74 aB	30,80 aB	31,25 aB	28,39 bB	45,83 aA	34,40 aB	33,88 aB	38,46 aA	31,72 aB	33,63 aB	41,42 aA

Médias na coluna e na linha com letras minúsculas e maiúsculas, respectivamente, não diferem entre si pelo teste de teste Skott Knot, a 5% de probabilidade.

5. DISCUSSÃO

Entre as bactérias diazotróficas isoladas das cultivares de arroz avaliadas, 69 e 31% foram obtidos de raízes e parte aérea, respectivamente. Diferenças na composição dos exsudatos radiculares liberados pelas plantas podem beneficiar ou prejudicar a composição microbiana da rizosfera (AIRA et al., 2010). Em estudo realizado por VIANA (2012), com as cultivares de arroz de sequeiro BRS Tropical e BRS MG Curinga, 55% dos isolados foram obtidos nas raízes. A maior quantidade de isolados obtidos no meio NFb, semisseletivo para *Azospirillum*, em relação ao meio JNFb, semisseletivo para bactérias do gênero *Herbaspirillum*, encontrados neste trabalho, está em desacordo com o observado por Viana (2012). Este autor obteve 33 isolados provenientes do meio JNFb e 8 do meio NFb, durante o isolamento de bactérias diazotróficas em cultivares de arroz de sequeiro na Bahia.

A presença de bactérias diazotróficas em maior número nas raízes do que na parte aérea já foi relatada em diversos estudos (BODDEY et al., 1995; BALDANI, 1996; BARRAQUIO e et al., 1997; GUIMARÃES, 2001; SABINO, 2003; RODRIGUES et al., 2006; SABINO, 2007; VIANA, 2012). Tal condição também foi evidenciada para bactérias diazotróficas em poáceas forrageiras, como braquiária, capim carona e capim mimoso, no Pantanal Sul Matogrossense (BRASIL et al., 2005). Uma maior colonização pelas bactérias na porção radicular pode estar relacionada à liberação de exsudatos, pois as variações que ocorrem na população microbiana da rizosfera são altamente dependentes do tipo de solo, espécie vegetal e cultivar utilizada. Por isso, um aspecto importante a ser considerado na seleção e o manejo adequado de diazotróficos é a relação de especificidade entre planta e bactéria (BALDANI; BALDANI, 2005).

Em algumas cultivares, a produção de exsudatos é mais intensa e a sua composição é bastante variável, sendo alguns deles ricos em determinados compostos mais favoráveis a alguns grupos de micro-organismos rizosféricos. Algumas substâncias presentes na rizosfera podem atuar como alelopáticas, inibindo ou estimulando esses indivíduos, entre outras, cuja ação pode ser de

sinalização molecular a fim de estabelecerem-se simbioses mutualísticas ou parasíticas entre os micro-organismos e as plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O solo rizosférico é um sistema complexo em suas interações químicas, físicas e biológicas, sendo elas dependentes dos teores de nutrientes, principalmente N. Entretanto, ainda não está suficientemente claro para os pesquisadores se essa dependência é direta ou indireta, já que os fertilizantes nitrogenados regem o crescimento da planta e, conseqüentemente, os padrões de exsudação radicular (MENG et al., 2012). A fixação biológica do nitrogênio seria a possível fonte desse nutriente para a rizosfera e bactérias associativas (WARTIAINEN et al., 2008).

O genótipo da planta é um aspecto agrônômico importante e que deve ser considerado no momento da seleção de bactérias diazotróficas endofíticas. Recentemente, foi demonstrado que algumas cultivares de arroz possuem forte influência sobre a composição populacional de comunidades bacterianas em sua rizosfera, sendo que cultivares tradicionais e melhoradas possuem diferenças no estabelecimento de associações com bactérias fixadoras de N, o que possivelmente estaria relacionado às estratégias de melhoramento genético utilizadas nessa cultura (HARDOIM et al., 2011).

A capacidade de micro-organismos diazotróficos isolados de plantas de milho fixarem N e sua eficiência durante o processo foi observada entre isolados, sendo que a liberação de N variou entre 2,12 $\mu\text{g de N mL}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e 6,27 $\mu\text{g de N mL}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (ROESCH, 2003). No mesmo estudo, para isolados do gênero *Herbaspirillum*, obteve-se uma fixação média de 5,47 $\mu\text{g de N mL}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, ou seja, 21,5% a mais que a média geral (ROESCH, 2003).

Na rizosfera, há uma maior densidade de micro-organismos quando comparada a algumas porções do solo livre de raízes. Isso acontece porque as raízes selecionam entre as diversas espécies componentes da microbiota edáfica, apenas aquelas que são mais responsivas (HARTMANN et al., 2009). Nesse sentido, visando o estabelecimento de associações eficientes para a FBN e, levando em consideração a especificidade planta-isolado, uma possibilidade seria coletar o solo para o isolamento de diazotróficos em áreas cultivadas com as mesmas variedades de arroz com as quais se deseja estudar. Isso poderia ser explicado pela melhor adaptação desses isolados e

também de sua capacidade para o estabelecimento de uma interação específica e benéfica (ARAÚJO et al., 2013).

O isolado 13, obtido da parte aérea da cultivar de arroz IRGA 418, a qual foi lançada a mais de 14 anos, foi o que mais fixou N₂ atmosférico em meio de cultura livre de nitrogênio. As novas cultivares de arroz têm sido desenvolvidas visando à máxima eficiência da adubação nitrogenada e, conseqüentemente, um alto rendimento e produtividade (TAYLARAN et al., 2009), provocando perdas no ponto de vista do estabelecimento de uma associação eficiente com isolados de bactérias diazotróficas (ARAÚJO et al., 2013).

A capacidade de micro-organismos obtidos de cultivares de arroz de sequeiro em realizar FBN, por meio da atividade da enzima nitrogenase, medida pela técnica de redução de acetileno (ARA), demonstrou que todos os isolados selecionados foram capazes de reduzir o acetileno a etileno. Isso comprovou a eficiência dessas bactérias quanto ao potencial de fixar o nitrogênio atmosférico em maior ou menor intensidade. Porém, houve uma alta variabilidade dentre os isolados na redução de acetileno, que ocorreu na faixa de 16,5 a 199,7 mmol mL⁻¹ de proteína por hora de incubação (RODRIGUES, 2006; KUSS, 2007; VIANA, 2012).

O isolado 14, obtido em meio semisseletivo para *Azospirillum*, produziu maior quantidade de AIA nas condições testadas. De acordo com a literatura, estirpes de *Azospirillum* produzem de três a sete vezes mais compostos indólicos do que isolados de *Herbaspirillum* (RADWAN et al., 2004). Em milho, um isolado de *A. lipoferum*, produziu na ordem de 36,06 µg de AIA mL⁻¹ dia⁻¹, ou seja, 46% acima da média dos outros isolados testados (ROESCH, 2003). Em testes *in vitro*, uma alta produção desse fitorregulador também foi observada em estirpes de *A. brasilense*, atingindo uma produção de 46 µg mL⁻¹ de AIA após 72 h de cultivo (EL-KHAMAS; ADACHI, 1999).

Além do isolado 14, advindo da parte aérea da cultivar Puitá Inta-CL V, também apresentaram altos valores de produção de AIA os isolados 24, 29 e 31, que foram obtidos de raízes das cultivares IRGA 428, 426 e 424, respectivamente. Cerca de 80% dos micro-organismos isolados a partir da rizosfera de diversas culturas agrícolas, possuem a habilidade para síntese e liberação de auxinas como produtos de seu metabolismo secundário (PATTERN; GLICK, 1996). De modo geral, o AIA secretado pelas bactérias

interfere na maioria dos processos de desenvolvimento das plantas em função da alteração do *pool* endógeno de auxina que a planta adquire (SPAEPEN et al., 2007). Adicionalmente, o ácido 3-indolacético também atua como uma molécula sinalizadora recíproca, ou seja, é capaz de afetar a expressão gênica em vários micro-organismos (AHEMAD; KIBRET, 2013).

Em estudo realizado por SILVEIRA (2008), estirpes isoladas de variedades de arroz irrigado, foram testadas quanto à produção de AIA, durante as fases logarítmica e estacionária do crescimento bacteriano. Os resultados obtidos indicaram que as bactérias apresentavam taxas diferenciadas de produção de AIA. Além disso, o aumento do teor desse fitorregulador estaria relacionado com o número de células presentes no cultivo, sendo que os maiores valores encontrados na produção de AIA (9,80 a 120 µg/mL, aproximadamente) ocorreram nos estágios mais tardios de cultivo. Nesse mesmo estudo, as estirpes E4-10 e RZ01 que produziram 25,27 e 29,36 µg/mL de AIA, respectivamente, foram as que mais se destacaram. Com base nesses resultados pode-se dizer que a alta produção de compostos indólicos dos isolados do presente trabalho também estariam relacionados ao aumento do número células bacterianas em relação ao tempo de cultivo.

O ácido 3-indolacético (AIA) é um dos mais importantes fitohormônios, pois coordena diferentes processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (KHALID et al., 2004). A maioria dos isolados bacterianos advindos de canola foram hábeis na síntese de compostos indólicos na presença do precursor L-triptofano (FARINA et al., 2012). A síntese de ácido 3-indolacético, na presença de triptofano, também foi evidenciada em isolados bacterianos responsáveis pela promoção de crescimento em milho (MEHNAZ et al., 2010).

Embora inoculadas com bactérias promissoras testadas *in vitro*, as cultivares de arroz irrigado testadas neste estudo responderam de forma diferenciada quando inoculadas com os isolados bacterianos. Por isso, com relação aos parâmetros avaliados, algumas cultivares obtiveram melhores resultados quando inoculadas. A complexidade das respostas à inoculação está diretamente relacionada com a interação do genótipo da planta e a estirpe inoculada. Isso é bastante variável entre cultivares e reflete a especificidade da interação planta-bactéria (SALA, 2005). As afinidades entre plantas e bactérias

envolvem interações específicas entre o micro-organismo e os componentes celulares da planta. Dessa forma, bactérias comumente aderem-se às raízes através de mecanismos independentes, tais como: i) adsorção, aderência fraca e mediada principalmente por proteínas; e ii) ancoragem, uma aderência forte e mediada por polissacarídeos (HORI; MATSUMOTO, 2010; RODRÍGUEZ-NAVARRO et al., 2007).

Os benefícios proporcionados pela interação planta-micro-organismo no aumento do crescimento vegetal são bastante complexos, pois alguns dos seus mecanismos ainda não foram totalmente elucidados. A utilização de bactérias que possuam a capacidade de produzir AIA e que tenham um potencial para fixação de N é uma forma inicial de seleção de estirpes promissoras para aumento de produtividade em diferentes culturas agrícolas (TEIXEIRA et al. 2007). Em milho, para a cultivar AS3466 foi observado que na presença da bactéria diazotrófica houve um maior crescimento de plantas, porém, para os demais genótipos testados, essa resposta não foi observada. Dependendo da bactéria utilizada (MIYAUCHI et al., 2008), provavelmente não houve especificidade entre a planta e o inóculo da bactéria (DOBBELAERE et al., 2003; RAIMAM et al., 2007).

O aumento de matéria fresca de planta inteira na cultivar de arroz irrigado IRGA 420, quando inoculada com *A. lipoferum* entre outros isolados, obtiveram valores mais altos em relação ao tratamento sem inoculação. Esse crescimento pode ser devido a uma interação eficiente planta-bactéria na região da raiz, aumentando o número de pêlos radiculares e, conseqüentemente, uma maior absorção de nutrientes (KUSS et al., 2007). A inoculação de diazotróficas, em meio de cultivo Hogland's com e sem adição de nitrogênio, possibilitou observar que algumas estirpes em conjunto com a aplicação de N, propiciaram os maiores acúmulos de biomassa em plântulas de arroz (SABINO et al., 2012).

Quanto ao aumento do comprimento de raiz, diferentes respostas em relação à inoculação com bactérias diazotróficas têm sido relatadas. Contudo, são dependentes da especificidade da interação planta-bactéria em diferentes culturas agrícolas (RADWAN et al. 2004; BALDANI; BALDANI, 2005; SALA et al. 2005; SABINO et al. 2012). Esta resposta a inoculação também foi observada neste estudo. A variabilidade na resposta em relação à estirpe de

bactéria diazotrófica inoculada pode ocorrer tanto em experimentos gnotobióticos quanto em condições de casa de vegetação e de campo (BALDANI; BALDANI 2005), e está sob forte influência da mediação genética, pois é ela quem determina os parceiros em uma interação específica planta-bactéria (DROGUE et al., 2012).

A inoculação com bactérias diazotróficas proporcionou um aumento no número de perfilhos das plantas de arroz. Essa característica também foi observada por VIANA, 2012, para a cultivar de arroz de sequeiro BRS Tropical, em condições de campo quando inoculada com bactérias diazotróficas. Os ganhos na produção de massa seca e de grãos foram atribuídos ao maior perfilhamento. Em estudos com *Brachiaria brizantha* cv. *marandu*, o aumento de produção de forragem foi verificado nos tratamentos com a inoculação de bactérias diazotróficas e sem aplicação de N, em relação ao tratamento sem N e sem inoculação (OLIVEIRA et al., 2007).

Os aumentos de matéria seca da parte aérea para a cultivar IRGA 409 e de matéria seca de raiz para a cultivar Puitá Inta-CL, obtidos com a inoculação da estirpe ZAE94 (*H. seropedicae*) no presente estudo, apontam a estirpe como promissora para a utilização como inoculante. Em outras espécies de poáceas, a inoculação de *H. seropedicae* também proporcionou bons resultados (GUIMARÃES et al., 2003; GUIMARÃES 2006; GUIMARÃES et al., 2013; SABINO, 2003; VIANA, 2012). Ainda, o total de N acumulado por planta foi maior na cultivar IRGA 409 quando inoculado com ZAE94. O acúmulo de N na parte aérea de cultivares de arroz quando inoculadas com esta estirpe já foi bastante relatado (GUIMARÃES et al. 2003; GUIMARÃES et al., 2010; VIANA, 2012; GUIMARÃES et al. 2013).

Os resultados da inoculação dos isolados de bactérias diazotróficas com a aplicação de 50% de fertilizante nitrogenado mostrou-se bastante variável para os parâmetros analisadas, dependendo da cultivar estudada. A cultivar IRGA 409 foi a mais responsiva à inoculação suplementada com 50% de N. GUIMARÃES et al. (2010) trabalhando com plantas de arroz de sequeiro, sob diferentes doses de adubação nitrogenada (0, 50 e 100 kg N ha⁻¹), obtiveram o maior acúmulo de N quando foram adubadas com a dose de 50 kg N ha⁻¹ e inoculadas com *H. seropedicae*. Isso foi observado quando as plantas estavam

no estágio de florescimento. No entanto, o teor de matéria seca foi maior quando as plantas receberam 100 kg N ha⁻¹.

O isolado 12 advindo da raiz da cultivar IRGA 428 em meio JNFb, semisseletivo para o gênero *Herbaspirillum*, foi eficiente nos testes de fixação de N atmosférico, na produção de compostos indólicos (AIA) e quando inoculado em cultivares de arroz irrigado nos testes *in vitro* e de casa de vegetação. Dessa forma, semelhante à estirpe ZAE94, é possível que o isolado 12 seja caracterizado como um endofítico capaz de penetrar na raiz e na parte aérea das plantas, conferindo-lhes benefícios que vão além da FBN. Esse isolado poderia estar relacionado à produção de substâncias promotoras de crescimento, estimulando o crescimento radicular e, conseqüentemente, o desenvolvimento de toda a planta.

Atualmente, as abordagens biológicas para a melhoria dos índices de produtividade agrícola, vêm ganhando destaque na discussão entre agrônomos e ambientalistas, no sentido de buscar boas práticas de adubação integradas com o adequado fornecimento de nutrientes para as plantas. Nesse contexto, as pesquisas com rizobactérias (AHMAD; KIBRET, 2013) e bactérias endofíticas têm sido intensificadas, pois muitos são os benefícios que esses micro-organismos podem conferir às plantas.

6. CONCLUSÃO

- As cultivares de arroz irrigado estudadas têm distintas populações de bactérias diazotróficas, resultando na obtenção de 35 isolados.
- Os isolados obtidos apresentam capacidade para fixar N atmosférico, via FBN, e produzir AIA.
- Em experimento *in vitro* as cultivares IRGA 409, Puitá Inta-CL e BRS Pampa são as mais responsivas a inoculação.
- Os isolados 12, 13 e 29 proporcionam maiores benefícios às plantas quando inoculados nas sementes das cultivares de arroz irrigado testadas em experimento *in vitro*.
- A cultivar IRGA 409 é a cultivar mais responsiva a inoculação com bactérias diazotróficas, em experimento de casa de vegetação.
- O isolado 12 é o mais eficiente, com relação à FBN, para as cultivares de arroz irrigado estudadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEMAD, M., KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University – Science**, Netherlands, 2013.

AIRA, M.; GÓMEZ-BRANDÓN, M.; LAZCANO, C.; BÅÅTH, E.; DOMÍNGUEZ, J. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 42, p. 2276-2281, 2010.

ARAÚJO, A.E.S.; BADANI, V. L. D.; GALISAB, P.S.; PEREIRA, J.A.; BALDANI, J.I. Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the Northeast region of Brazil. **Applied Soil Ecology**, Netherlands ,v. 64 , pg. 49–55, 2013.

AKITA, S. Improving yield potential in tropical rice. In: IRRI. **Progress in irrigated rice research**. Los Baños, p.41-73, 1989.

BALDANI, V. L. D.; **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 1996. 234 f. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1996.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R. and DOBEREINER, J. Recent advances in biological nitrogen fixation with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, nº 5/6, p. 911-922, 1997.

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

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

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

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n.4, p.1327–1350, 2012.

BAZZICALUPO, M. & OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G. & NEWTON, W.E., eds. Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity. Dordrecht, Kluwer **Academic Publishers**. p.409-410, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1 –2, p. 248-254, 1976.

BRASIL, M.S., BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, V.29, p. 179-190, 2005.

BODDEY, R. M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, The Hague ,n. 14, p. 195 – 209, 1995.

CAMARGO, F. A. O.; GIANELLO, C.; RHEINHEIMER, D. S.; KAMINSKI, J.; BISSANI, C. Fracionamento do N, P e S orgânicos. In: CAMARGO, F. A. O.; SANTOS G. A. (Eds.). **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo: Ecossistemas Tropicais e Subtropicais**. Gênese: Porto Alegre: 1999. p.297-289, 1999.

CAMPOS, et al. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura de arroz sob inundação. **Agronomia**, Itaguaí, vol. 37, nº 2, p. 41- 46, 2003.

CARDOSO, et al. Ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em arroz irrigado no estado de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.9, n.2, p. 178-186, 2010.

CARVALHO, E. A. **Avaliação agronômica da disponibilização de feijão sob sistema de semeadura direta**. 2002. 80 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2002.

CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.:** cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología. p. 268, 2008.

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

CONAB – COMPANHIA NACIONAL ABASTECIMENTO. **Indicadores da produção agrícola**. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conabweb>>. Acesso em: 18 dez. 2012.

CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; SORIA, M.A.; DE ESTRADA, M. *Azospirillum*

brasilense-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) **Azospirillum sp.**: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, p.87-95, 2008.

CURÁ, J. A.; RIBAUDO, C. M.; GAETANO, A. M.; GHIGLIONE, H.O. Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el cultivo del arroz durante las primeras etapas de desarrollo. **Foro**, p. 10 – 12, mar. 2005.

DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica do nitrogênio no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 4, n. 8, p. 144-152, 1990.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. – Brasília: EMBRAPA – SPI, Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 60 p, 1995.

DOBBELAERE, S.; VANDRLEYDEN, J.; OCON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, United Kingdom, v.22, p.107-149, 2003.

DROGUE, B. et al. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? **Research in Microbiology**, France, v. 163, p. 500-510, 2012.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. **Cultivo de arroz irrigado no Brasil**. Sistemas de Produção, 3. ISSN 1806-9207 Versão Eletrônica, Nov./2005 Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/referencias.htm>>. (Acesso: 12 Abril 2013).

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; JONES, C.A. **Growth and mineral nutrition of field crops**, New York: Marcel Dekker. 2. ed. 624 p., 1997.

FAGERIA, N.K. & STONE, L.F. **Manejo do nitrogênio. Manejo da fertilidade do solo para o arroz irrigado**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p.51-94, 2003.

FAO (2010) **outlook Alimentos - análise de mercado global**. <http://www.fao.org/docrep/012/ak349e/ak349e00.pdf> (junho, 2010).

FARINA, R. et al. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, Netherlands, v. 55, p. 44- 52, 2012.

FERREIRA, J.S., Baldani, J.I., Baldani, V.L.D. Seleção de bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Sci. Agron**, Brazil, 32, 179–185, 2010.

FERREIRA, J.S.; GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, V.L.D. Produção de grãos de arroz em função da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n.13, 2011.

FERNANDES, M.S. & SOUZA, S.R. Absorção de nutrientes. In: FERNANDES, M.S., ed. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.115-152, 2006.

GILLIS, K.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, J.; De LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.39, 361-364, 1989.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N. et al... Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 8, p. 2634 – 2645, 2001.

GUIMARÃES, S.L., BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Agron.**, Itaguai, 37, 25–30, 2003.

GUIMARÃES, S. L. **Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral**. 2006. 86 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

GUIMARÃES, S. L.; CAMPOS, D. T. S.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 4, p. 32-39, 2010.

GUIMARÃES, S.G.; BALDANI, V. L. D.; Produção de arroz inoculado com bactérias diazotróficas marcadas com resistência induzida ao antibiótico estreptomicina. **Rev. Cienc. Agrar.**, v. 56, n. 2, p. 125-132, abr./jun. 2013.

HARDOIM, P.R. et al. Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 77, p. 154-164, 2011.

HARTMANN, A. et al. Plant-driven selection of microbes. **Plant and Soil**, The Hague, v. 321, p. 235-257, 2009.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture growing plant without soil. **California Agricultural Experimental Station Circular**, v. 347, p. 1-32, 1950.

HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: from mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, Netherlands, v. 48, p. 424-434, 2010.

HUERGO, L.F.MONTEIRO, R.A.; BONATTO, A.C.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.

Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina.** Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, p.17-35, 2008.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo.** Documentos n. 325, Londrina: Embrapa Soja, 2011.

HUREK T, R-H EINHOLD UREK B, VAN M M E ONTAGU K Ellenberger E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus sp* systemic strain BH72 in grasses. **J Bacteriol**, Washington, 176: 1913-1923, 1994.

KHALID, A. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere vs. non-rhizosphere soil. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 42, p. 921-926, 2004.

KUNDU, D. K.; LADHA J. K. Enhancing soil nitrogen use and biological nitrogen fixation in wetland rice. In: **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 31 n°3, p. 261-278, 1995.

KUSS, A.V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado.** 2006. 110 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; HOLTZ, E. K.; LOVATO, T. Inoculação de bactérias diazotróficas e desenvolvimento de plântulas de arroz irrigado em solução nutritiva e câmara de crescimento. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.14, n.2, p. 23-33. 2007.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; HOLTZ, E. K.; LOVATO, T. Inoculação de bactérias diazotróficas e desenvolvimento de plântulas de arroz irrigado em solo e câmara de crescimento. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.15, n.1, p. 90-102. 2008.

LADHA, J.K.; TIROL-PADRE, A.; PUNZALAN, G.C.; WATANABE, I. Nitrogen-fixing (C_2H_2 -reducing) activity and plant growth characters of 16 wetland rice varieties. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.33, p.187-200, 1987.

LADHA, J.K., Reddy, P.M. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant Soil**, The Hague, 252, 151–167, 2003.

LIESACK, W.; SCHNELL, S.; REVSBECH, N. P. Microbiology of flooded rice paddies. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam v.24, p. 625 – 645, 2000.

MARRA, M.L. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, The Hague, p. 1-19, 2012.

MELLONI, R.; NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de

mineração de bauxita em reabilitação. **R. Bras. Ci. Solo**, Campinas, 28:85-93, 2004.

MEHNAZ, S. et al. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 42, n. 10, p. 1848-1856, 2010.

MENG et al. Sensitivity of wetland methane emissions to model assumptions: application and model testing against site observations. **Biogeosciences**, Hoboken , 9, 2793–2819, 2012.

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

MONTANEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v 45, p. 253- 263, 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Rizosfera**. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2 ed, Lavras: Ed. UFLA, p. 407-447, 2006.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 84 Lavras: Editora UFLA, 729 p., 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

MUNARETO, J.D. et al. Propriedades físicas do solo e produtividade de arroz irrigado por inundação no sistema plantio direto. **Pesq. Agropec. Bras.**, Rio De Janeiro, 45:1499-1506, 2010.

OLIVARE S, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996.

OLIVEIRA, P. P. A.; OLIVEIRA, W. S.; BARIONI, W. J.; Produção de forragem e qualidade de *Brachiaria brizantha*cv. Marandu com *Azospirillum brasilense* fertilizada com nitrogênio. **Embrapa Pecuária Sudeste**, São Carlos, SP, 2007.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa ,v. 42, p. 207-220, 1996.

PENG, S., Biswas, J.C., Ladha, J.K. Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. **Agron. J.** United States,94, 925–929, 2002.

PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin v.75, p.1143-1150, 2007.

RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio De Janeiro, 39 (10): 987- 994, 2004.

RAIMAM, M.P. et al. Interaction among free-living N-fixing bacteria isolated from *Drosera villosa* var. *villosa* and AM fungi (*Glomus clarum*) in rice (*Oryza sativa*). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.35, p.25-34, 2007.

REEVES, T.G, WADDINGTON SR, ORTIZ-MONASTERIO I, BUNZIGER M, CASSADAY K (2002) Removing nutritional limits to maize and wheat production: A developing country perspective. In: Kennedy IR, Choudhury ATMA (eds) **Biofertilisers in Action. Rural Industries Research and Development Corporation**, Canberra, pp 11–36, 2002.

RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 275- 284, 2006.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N., DARDANELLI, M.S., RUÍZ-SAÍNZ, J.E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 272,p. 127-136, 2007.

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

ROESCH, L.F. W.; **Ocorrência e distribuição de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de milho**. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2003.

SABINO, D. C. C. **Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas**. 2003. 75p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2003.

SABINO, D. C.; **Estudos Ecológicos e Moleculares da Interação Planta-bactéria Diazotrófica na cultura do Arroz**. 2007. 71 f. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

SABINO, D. C. C.; FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L.. Bactérias diazotróficas como promotoras do desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 2337, 2012.

SALA, et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 29, n. 3 p. 345-352, 2005.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 172, n. 2, p. 261 – 269, 1995.

SELDIN, L.; ROSADO, A. S.; CRUZ, D. W. et al. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 64, n. 10, p. 3860 – 3868, 1998.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms. London: **Chapman and Hall**, 2 ed., 256p, 1990.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, j.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant Signaling. **FEMS Microbiol Ver**, v 31, p 425–448 ,2007.

SILVEIRA, E. L. **Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva** . 2008. 83 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008

SOSBAI, Sociedade Sul - Brasileira de Arroz Irrigado. **Arroz Irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil / Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado; Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 5., Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, 27.** Pelotas, RS: SOSBAI, 2012.

SOUZA, R. O. et al. Solos alagados. In: MEURER, E. J. (org.). **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: GENESIS, 2012. p. 126-149, 2012.

TAYLARAN, R.D. et al. Performance of a high-yielding modern rice cultivar Takanari and several old and new cultivars grown with and without chemical fertilizer in a submerged paddy field. **Plant Production Science, Japan**, v. 12, p. 365-380, 2009.

TERRES, A. L. S. et al. **Melhoramento genético do arroz irrigado**. In: GOMES, A.S. & MAGALHÃES JR., A.M., eds. Arroz irrigado no Sul do Brasil. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, p.259-303, 2004.

TEIXEIRA M.A. et al. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etno-vareidades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1 p. 43-49, 2007.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S. and BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Science Society of American Journal**, v. 56, p. 105- 114. 1992.

USDA-United States Department of Agriculture. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=681&hidReportRetrievalTemplateID=7>. Acessado em 10 de Maio de 2013.

WARTIAINEN, I. et al. Variation in the active diazotrophic community in rice paddy-nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 39, p. 65-75, 2008.

WILHITE, S. E.; LUMSDEN, R. D.; STRANEY, D .C. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 67, p. 5055-5062, 2001.

VIANA, T.O.; **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista-BA**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia)- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, 2012.

VAN LOON, G. W.; DUFFY, S. J. Microbiological processes. In: **Environmental Chemistry**. New York: Oxford University, Cap. 15. p. 492, 2001.

ANEXOS

Anexo A- Meios de Cultivo utilizados

Meio de cultura NFb

(BALDANI & DÖBEREINER, Soil Biology & Biochemistry. Oxford, v. 12,n. 4, p. 433-439, 1980)

Ácido málico	5 g
K ₂ HPO ₄ (solução 10%)	5 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 mL
NaCl (solução 10%)	1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O (solução 1%)	2 mL
FeEDTA (solução 1,64%)	4 mL
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH	2 mL
Sol. de micronutrientes para meio de cultura	2 mL
Vitamina para meio de cultura	1 mL
KOH	4,5 g

Ajustar o pH para 6,5.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 1,9g e 17g de agar/L para meio semissólido e sólido respectivamente.

Meio de cultura JNFb

(DÖBEREINER e outros, Embrapa-SPI, Brasília, 1995)

Ácido málico	5 g
K ₂ HPO ₄ (solução 10%)	6 mL
KH ₂ PO ₄ (sol. 10%)	18 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O (sol. 10%)	2 mL
NaCl (solução 10%)	1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O (solução 1%)	2 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura	2 mL
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH	2 mL
FeEDTA (solução 1,64%)	4 mL
Vitamina para meio de cultura	1 mL
KOH	4,5 g

Ajustar o pH para 5,8 com KOH e completar o volume para 1000 mL. Adicionar 1,9g e 17g de agar/L para meio semissólido e sólido respectivamente. Ao meio sólido adicionar 20mg de extrato de levedura.

- **Meio de cultura LGI**

(DÖBEREINER e outros, Embrapa-SPI, Brasília, 1995)

Açúcar cristal	5g
K ₂ HPO ₄ (solução 10 %)	2 mL

KH ₂ PO ₄ (solução 10%)	6 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O (solução 10%)	2 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O (solução. 1 %)	2 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (solução 0,1%)	2 mL
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2 N de KOH	5 mL
FeEDTA (solução 1,64 %)	4 mL
Vitamina para meio de cultura	1 mL

Ajustar o p.H para 6,0 – 6,2 com H₂SO₄ sol. 5%;
 Completar para 1000 ml com água destilada. Adicionar 1,9g e 17g de agar/L para meio semissólido e sólido respectivamente.
 SÓLIDO – Adicionar 20 mg de extrato de levedura

Meio de cultura DYGS

(RODRIGUEZ NETO, Summa Phytopathologica, Campinas, v. 12, n. 1-2,p. 16, 1986.)

Glicose	2,0 g
Ácido málico	2,0 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Ácido glutâmico	1,5 g
Água destilada	1000 mL

pH 5,0 – *Burkholderia* spp.

pH 6,0 – *Herbaspirillum* spp.

pH 6,8 – *Azospirillum* spp.

pH 6,0 – *Gluconacetobacter diazotrophicus* (sem a adição do ácido málico ao meio).

Meio Batata

(BALDANI & DÖBEREINER, Soil Biology & Biochemistry. Oxford, v.12, n. 4, p. 433-439, 1980)

Batata	200 g
Ácido málico	2,5 g
Açúcar cristal	2,5 g
Solução de micronutrientes para meio de cultura	2 mL
Solução de vitamina para meio de cultura	1 mL

Pesar a batata, descascar, lavar, cortar e colocar para ferver durante meia hora.

Paralelamente colocar 2,5 g de ácido málico em 50 ml de água destilada com 2 gotas de azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2 N de KOH, colocando aos poucos KOH até ficar com pH 6,8-7,0 (verde). Adicionar 2,5 g de açúcar cristal, 2 ml de micronutrientes para meio de cultura e 1 ml de vitamina para meio de cultura.

Depois de fervida, filtrar a batata com algodão, juntando ao filtrado, a sol. de ácido málico, açúcar cristal, micronutrientes e vitamina.

Completar para 1000 ml com água destilada e colocar o Agar por último.

Solução de Hogland's para tubos

(HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture growing plant without soil. **California Agricultural Experimental Station Circular**, v. 347, p. 1-32, 1950)

KH ₂ PO ₄ (solução 1 M)	1 mL
K ₂ HPO ₄ (solução 1 M)	1 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O (solução 1 M)	2 mL
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,172g
Solução de elementos menores para tubos(*)	1 mL
Sol. de Ferro(* *).	1 mL
Água destilada	1000 mL

pH 6,5 – 7,0

Adicionar 6g de Agar por litro.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Obs. Se turvar colocar ácido clorídrico até limpar.

(*) SOLUÇÃO DE ELEMENTOS MENORES PARA TUBOS

H ₃ BO ₃	2,86g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,02g

(**) 1,21 g Na₂H₂EDTA/100 ml de água destilada, misturar bem e adicionar 0,6 g FeCl₃.6H₂O.

Anexo B- Soluções utilizadas

Solução de micronutrientes para meio de cultura

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,75g
H_3BO_3	1,40g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,04g
	1,20g

Completar o volume para 1000mL com água destilada.

Solução de vitaminas

Biotina	10 mg
Pyridoxol-HCL	20 mg
Água destilada	100 mL

Dissolver em banho-maria

Dissolver em banho maria e completar o volume para 100 mL com água destilada estéril e manter a solução em geladeira.

Solução salina para diluição de células

K_2HPO_4 (solução 10%)	1,0 mL
MgSO_4 (solução 10%)	0,5 mL
NaCl (solução 10%)	0,2 mL
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (solução 1%)	0,5 mL
FeEDTA (solução 1,64%)	1,0 mL
Sol. de micronutrientes para meio de cultura	0,5 mL

Ajustar o pH para 6,5 com sol. de ácido sulfúrico 5%.

Completar com água destilada para 1000 mL.