

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

**RESPOSTA DE CULTIVARES DE ARROZ IRRIGADO A
INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juliana Gress Bortolini

Santa Maria, RS, Brasil

2015

RESPOSTA DE CULTIVARES DE ARROZ IRRIGADO A INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Juliana Gress Bortolini

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 obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia.**

Orientador: Prof. Dr. Sandro José Giacomini

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bortolini, Juliana Gress

Resposta de cultivares de arroz irrigado a inoculação de bactérias diazotróficas. / Juliana Gress Bortolini.- 2015.

46 f.; 30cm

Orientador: Sandro José Giacomini
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2015

1. Nitrogênio 2. Fixação biológica de N 3. Cultura 4. Produtividade de grãos I. Giacomini, Sandro José II. Título.

© 2015 Todos os direitos autorais reservados a Juliana Gress Bortolini.

A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Avenida Vaz Ferreira, 341 Bairro Centro - Santa Maria, RS, 98170-000.

End. Eletr: julianagbortolini@gmail.com

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

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

**RESPOSTA DE CULTIVARES DE ARROZ IRRIGADO A INOCULAÇÃO
DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

elaborada por
Juliana Gress Bortolini

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sandro José Giacomini, Dr.
(Presidente/Orientador)

Steffen Pujol, Dr. (UFSM)

Eduardo Lorensi de Souza, Dr. (UERGS)

Santa Maria, 10 de setembro de 2015.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Orion e Ariete Bortolini, a meu irmão João Victor Gress Bortolini,
A minha vó Arlete Gress e meu tio Alberto Henrique Gress,
A meu avó Valter Henrique Gress (*in memoriam*),

A vocês todo meu amor e a minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela vida que me deste e a oportunidade de cursar uma pós-graduação. Ao meu fiel anjo da guarda, pela força e a fé que tem me dado para enfrentar os obstáculos e dificuldades, que a vida tem me imposto nos últimos tempos.

A meu orientador Sandro José Giacomini pela disponibilidade de orientar-me, pela amizade, paciência, compreensão, ensinamentos transmitidos, por ter acreditado em mim, me incentivado sempre aconselhando, dizendo alguma palavra amiga.

A minha vó Arlete Gress e meu tio Alberto Henrique Gress, sem eles o sonho de ter concluído um ensino superior e uma pós-graduação não poderia ser realizado, a vocês devo muito o que hoje sou.

A meus pais Orion e Ariete Bortolini e a meu irmão João Victor Bortolini por serem meu alicerce, meus melhores amigos, confidentes, possuírem essa imensa paciência comigo, sempre acreditarem sempre em mim, me incentivando e sempre fazendo de tudo por mim.

A minhas queridas Dinda Cleyd e Tia Lú que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, desde as caronas, até os momentos especiais de felicidade e tristeza sempre com muita ternura, carinho e amor, torcendo para que tudo desse certo sempre.

A minhas amigas de longa data, que o destino colocou no meu caminho Ana Maria Nascimento, Fernanda Bortolini, Ludmille Cazarotto muito obrigada pela amizade, carinho, companheirismo mesmo longe sempre estão presentes de alguma forma, amizade verdadeira pra toda vida.

A minha melhor amiga Camila Elicker, obrigada pela amizade, pelos choros, desabafos e momentos de alegria compartilhados, se não fosse você sempre presente em todos os momentos contribuindo e incentivando, nada disso teria sido possível.

Aos Bolsistas do Labcen, colegas e pós-graduação, pela ajuda no serviço de campo, amizade e momentos bons compartilhados em especial aos que estiveram nos momentos bons e ruins comigo, incentivando e contribuindo para a minha vida e meu trabalho, Getúlio, Guilherme, Maiara, Mariana, Lethícia, Patrick, Pedro, Carolina, Raquel, Adriane, Ismael, Heitor, Cledir, Michael, Bruno e os demais colegas.

Em especial a colega de laboratório e bolsista Carolina Schultz Pollet, pela amizade que construímos, cumplicidade e carinho que com certeza permanecerão por toda a vida, amizade verdadeira que quero levar para sempre. Aos queridos colegas Getúlio e Guilherme, os quais muito me ajudaram, nos momentos bons e ruins, nas muitas vezes que eu queria

largar tudo, obrigada por me aconselharem, me ensinarem, me ajudarem e principalmente agradeço a Deus por ter colocado vocês três em minha vida pois foram pessoas que fizeram valer a pena eu seguir em frente e conseguir concluir o mestrado.

Ao querido ex-colega do Labcen, Dr. Eduardo Lorenzi, muito obrigada pela amizade, pelos ensinamentos transmitidos, pela confiança, incentivo sempre acreditar em mim e me motivar, por estar presente em todos os momentos até a conclusão deste trabalho.

Ao colega de Labcen Dr. Marciel Redin, pela amizade, conselhos, ensinamentos transmitidos, a ajuda que me deste e as palavras sempre de incentivo.

Ao pós doutorando, do grupo do professor Aita, Stefen, muito obrigada por toda a ajuda na parte de laboratório, ensinamentos transmitidos, amizade, incentivos.

À CAPES por ter concedido essa bolsa de estudos.

Ao PPG Agrobiologia pelo auxílio financeiro as viagens de estudos.

À secretária do PPG Agrobiologia Nice, pela boa vontade sempre em nos ajudar.

À Embrapa Agrobiologia Seropédica-RJ, pela disponibilidade de envio da turfa para a conclusão deste trabalho.

À Stoller por ceder o inoculante Materfix Gramíneas para este estudo.

Meus sinceros agradecimentos!

Quem observe a outrem que alcançou o topo no empreendimento encetado, não poderá fazer
ideia dos empecilhos que foram enfrentados.

A existência humana enriquece-se, cada vez mais, na razão direta em que o indivíduo
adiciona conhecimento e experiência, emoções e ações que o impulsionam para a frente.

Psicografia de Divaldo Franco. Livro: Libertação pelo Amor

Joanna de Ângelis

Tudo tem seu apogeu e seu declínio...
É natural que seja assim, todavia, quando tudo parece convergir para o que supomos o nada,
eis que a vida ressurge, triunfante e bela...
Novas folhas, novas flores, na infinita benção do recomeço!

Chico Xavier

O homem é assim o árbitro constante de sua própria sorte.
Ele pode aliviar o seu suplício ou prolongá-lo indefinidamente.
Sua felicidade ou sua desgraça dependem da sua vontade de fazer o bem.

Allan Kardec

RESUMO

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

RESPOSTA DE CULTIVARES DE ARROZ IRRIGADO À INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

AUTORA: JULIANA GRESS BORTOLINI

ORIENTADOR: SANDRO JOSÉ GIACOMINI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de setembro de 2015

A seleção de estirpes de bactérias diazotróficas para uso na cultura do arroz por alagamento é importante para a redução dos custos de produção e do potencial de contaminação do ambiente pelo uso excessivo de nitrogênio (N). O presente estudo teve como objetivo selecionar e avaliar o efeito de bactérias diazotróficas sobre a fixação biológica de N (FBN) e a produtividade de duas variedades de arroz. O estudo foi realizado a campo, durante o cultivo de arroz por alagamento, na área experimental pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria-RS. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições em um fatorial 2 x 4 x 3, sendo duas cultivares de arroz irrigado (BR IRGA-409 e Puitá Inta-CL), quatro condições de inoculação (sem inoculação - SI, estirpe UFSM-11, estirpe UFSM-13 e o *Azospirillum brasiliense* presente no inoculante comercial Masterfix Gramíneas, Stoller - IC) e três doses de N (0, 50% e 100% da dose recomendada para a cultura). As avaliações realizadas foram: produção de matéria seca (MS) e N acumulado nas plantas de arroz, FBN pela técnica da abundância natural e produtividade de grãos. A inoculação de bactérias diazotróficas aumentou a produção de MS e o acúmulo de N na maturação fisiológica do arroz, com destaque para as estirpes UFSM-13 e o IC. O uso combinado da inoculação e adubação nitrogenada promoveu aumento na produção de MS e acúmulo de N, no entanto isso não resultou em maior produtividade de grãos. A FBN ocorreu naturalmente nas variedades de arroz BR IRGA-409 e Puitá Inta-CL e foi aumentada nessas variedades com a inoculação da estirpe UFSM-13 e do *Azospirillum brasiliense* do IC. A produtividade de grãos aumentou apenas com o uso da estirpe UFSM-13. O efeito positivo da inoculação dessa bactéria ocorreu nas duas variedades de arroz avaliadas (BR IRGA-409 e Puitá Inta-CL).

Palavras-chave: Nitrogênio. Fixação biológica de N. Cultura. Produtividade de grãos.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Professional Graduation Program in Agrobiologia
Universidade Federal de Santa Maria

INOCULATION OF BACTERIA DIAZOTROPHIC IN RICE CULTIVARS IRRIGATION

AUTHOR: JULIANA GRESS BORTOLINI

ADVISER: SANDRO JOSÉ GIACOMIN

Defense Place and Date: Santa Maria, 10th September, 2015

The selection of strains of diazotrophic bacteria for use in rice culture by flooding is important for the reduction of production costs and the potential for contamination of the environment by excessive use of nitrogen (N). The present study aimed to select and evaluate the effect of diazotrophic bacteria on biological fixation of N (FBN) and productivity of two varieties of rice. The study was carried out in the field, during cultivation of rice by flooding, in the experimental area belonging to the Department of plant science at the Federal University of Santa Maria-RS. The experimental design used was the random blocks with four replications in a factorial 2 x 4 x 3, being two irrigated rice cultivars (IRGA-409 and Puitá Inta-CL), four inoculation conditions (without inoculation-SI, strain UFSM-11 strain UFSM-13 and *Azospirillum brasiliense* present in commercial inoculant Masterfix grasses, Stoller-IC) and three doses of N (0, 50 and 100 of the recommended dosage for culture). The evaluations performed were: production of dry matter (DM) and N accumulated in the rice plants, FBN by the technique of natural abundance and productivity of grain. Inoculation of diazotrophic bacteria increased the production of MS and the accumulation of N in rice physiological maturation, especially strains UFSM-13 and the IC. The combined use of inoculation and nitrogen fertilization promoted increase in production of MS and accumulation of N, however this did not result in higher productivity of grain. The BNF occurred naturally in varieties of rice BR-409 and Puitá Inta IRGA-CL and was increased in those varieties with the inoculation of strain UFSM-13 and of *Azospirillum brasiliense* of IC. Grain productivity increased only using strain UFSM-13. The positive effect of inoculation of this bacteria occurred in two rice varieties evaluated (BR IRGA-409 and Puitá Inta-CL).

Keywords: Nitrogen. Biological fixation of N. Culture. Productivity of grain.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de abundância natural de ^{15}N das plantas testemunhas.	24
Tabela 2 – Produção de matéria seca (Mg ha^{-1}) da parte aérea em duas cultivares de arroz em dois estádios de desenvolvimento (R0 e R4) sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas.	26
Tabela 3 – de matéria seca (Mg ha^{-1}) da parte aérea em duas cultivares de arroz em três estádios de desenvolvimento (R0, R4 e R9) e sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas.	27
Tabela 4 – Produção de matéria seca (Mg ha^{-1}) da parte aérea de duas cultivares de arroz em três estádios de desenvolvimento (R0, R4 e R9) e três doses de N.	28
Tabela 5 – Produção de matéria seca (Mg ha^{-1}) da parte aérea de arroz em três estádios de desenvolvimento (R0, R4 e R9) e sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas e três doses de N.	28
Tabela 6 – Acúmulo de N (kg ha^{-1}) na parte aérea de duas cultivares de arroz sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas.....	29
Tabela 7 – Acúmulo de N (kg ha^{-1}) na parte aérea da cultura do arroz sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas e três doses de N.	30
Tabela 8 – Acúmulo de N (kg ha^{-1}) na parte aérea de duas cultivares de arroz em três estádios de desenvolvimento (R0, R4 e R9) sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas.	30
Tabela 9 – Acúmulo de N (kg ha^{-1}) na parte aérea de duas cultivares de arroz em três estádios de desenvolvimento (R0, R4 e R9) e três doses de N.....	30
Tabela 10 – Valores de $\delta^{15}\text{N}$ e porcentagem e quantidade de N proveniente da FBN em duas cultivares de arroz em quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas e sem o uso de adubação nitrogenada.	32
Tabela 11 – Produtividade de grãos (Mg ha^{-1}) da cultura do arroz sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas e três doses de N.	34

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Meios de Cultivo utilizados	44
Anexo B – Soluções utilizadas.....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.2	Fisiologia da cultura do arroz	14
2.3	Produtividade da cultura do arroz	15
2.4	Importância do N na cultura do arroz	16
2.5	FBN na cultura do arroz	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Local do estudo	21
3.2	Delineamento experimental e tratamentos utilizados	21
3.3	Inoculação das sementes de arroz irrigado com bactérias diazotróficas e meios de cultura	22
3.4	Semeadura e manejo da cultura do arroz	22
3.5	Produção de matéria seca e produtividade de grão	23
3.6	Acúmulo de N e quantificação da FBN	23
3.7	Análise dos resultados	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Produção de MS	26
4.2	Acúmulo de N	29
4.3	Fixação biológica de N (FBN)	31
4.4	Produtividades de grãos	33
5	CONCLUSÕES	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
	ANEXOS	43

1 INTRODUÇÃO

No Brasil o arroz é cultivado em aproximadamente 2,4 milhões de hectares (CONAB, 2015), sendo que em 40% desta área o cultivo é realizado no sistema com alagamento, o qual é responsável por 60% da produção nacional (GUIMARÃES et al., 2006). O cultivo do arroz com alagamento apresenta ótimas condições para o desenvolvimento da cultura comparado ao sistema de arroz de sequeiro (EMBRAPA, 2005). Segundo dados da CONAB (2015) na última safra 2014/15 houve registro de produtividades acima de 12 Mg ha⁻¹ no sistema por alagamento.

Dentre as várias formas de aumentar a produção vegetal, destaca-se a importância do suprimento de N, elemento importante na síntese de proteínas e enzimas que garantem a vida do vegetal. Os processos que se constituem fontes capazes de fornecer importantes quantidades de N às plantas são a decomposição da matéria orgânica do solo, a utilização de fertilizantes nitrogenados e a fixação biológica de N₂ (FBN) da atmosfera (CARVALHO, 2002).

A FBN é o processo pelo qual o N₂ é transformado em NH₃ através da ação da enzima nitrogenado presente em microrganismos. A capacidade de realizar a FBN é exclusiva de alguns microrganismos procarióticos dos domínios *Archaea* e *Bacteria*, incluindo bactérias, cianobactérias e o actinomiceto *Frankia*. As bactérias fixadoras de nitrogênio são denominadas diazotróficas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Recentemente, estudos têm demonstrado que plantas da família *Poaceae* conhecidas também como gramíneas que incluem espécies como trigo, cana-de-açúcar, milho e arroz, também fazem associação com bactérias diazotróficas, embora nesta família não haja formação de nódulos (BALDANI et al., 2002). No caso do arroz, diversas bactérias foram isoladas em associação com a planta, como por exemplo, espécies dos gêneros *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Pseudomonas* (BALDANI, 1984, 1996). Atualmente, estudos têm buscado analisar a utilização desses microrganismos em inoculantes, visando diminuir a demanda de fertilizantes nitrogenados na cultura do arroz.

O presente trabalho fundamenta-se na necessidade de aprofundar conhecimentos em alguns aspectos ainda carentes de resultados perante a inoculação de bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. Para isso foi conduzido um experimento de campo onde foi realizada a inoculação de bactérias diazotróficas em duas cultivares de arroz irrigado com o objetivo de avaliar a produção de biomassa, o acúmulo de N, a FBN e a produtividade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História da cultura do arroz no mundo

Historiadores e cientistas relatam que o arroz já era cultivado por volta de 3.000 a.C, tendo origem no sudeste da Ásia. Deste país surgiu a espécie *Oryza sativa*, disseminada primeiramente na Índia. Alguns autores apontam que o Brasil foi o primeiro país a cultivar esse cereal no continente americano. Esse é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. Aproximadamente 90% de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido na Ásia (EMBRAPA, 2005).

A América Latina ocupa o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo. Assim como na Ásia, o arroz é um produto importante na economia de muitos dos países latino-americanos pelo fato de ser item básico na dieta da população, como nos casos do Brasil, Colômbia e Peru, ou por ser um produto importante no comércio internacional, como no de Uruguai, Argentina e Guiana, como exportadores, e de Brasil, México e Cuba, entre outros, como importadores (FAGERIA e SANTOS, 2007). Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz destaca-se pela sua produção e área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social (FAO, 2010).

O arroz (*Oryza sativa*) é hoje o segundo cereal mais produzido e também o segundo alimento mais consumido no mundo, possuindo um grão rico em nutrientes, minerais (fósforo, ferro e potássio) e vitaminas (tiamina e riboflavina). No entanto, Fageria e Santos (2007), citam que este alimento destaca-se também por possuir melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína necessária a alimentação humana.

2.2 Fisiologia da cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa*), é uma monocotiledônea da família das Poaceae. Que possui caules ocos, flores reduzidas de cor verde e aquênios especializados, ou cariopses, como frutos (PINHEIRO, 1991). É uma planta de metabolismo C3, hidrófila, que possui a capacidade de adaptação a ambientes aquáticos. A presença de aerênquimas no colmo e nas raízes das plantas de arroz possibilitam a passagem do oxigênio atmosférico fixado pelas folhas até a camada da rizosfera da planta. Nesse sentido, o arroz é uma cultura versátil que possui facilidade à adaptação à diferentes condições de ambientais (VIEIRA, 1999).

Os estádios fenológicos, ou seja, os ciclos vegetativos do arroz, são divididos em duas fases distintas a plântula aonde ocorre a emergência do coleóptero/radícula e a emergência da primeira folha do coleóptero, na fase vegetativa ocorre a formação do colar do colmo da 1ª até a 13ª folha do colmo principal e na fase reprodutiva ocorre a iniciação da panícula, diferenciação e maturação fisiológica do grão. O ciclo vegetativo das cultivares de arroz irrigado variam de 80 e 140 dias. A cultura do arroz no mundo ocupa hoje uma área de mais de 150 milhões de hectares de cultivo e sua produção é de aproximadamente 660 milhões de toneladas de grãos em casca. O Brasil destaca-se como o maior produtor fora do continente asiático, sendo o nono maior produtor mundial do cereal (SOSBAI, 2010).

2.3 Produtividade da cultura do arroz

O Brasil possui uma área de mais de 2,4 milhões de hectares de cultivo (CONAB, 2015) onde alguns genótipos antigiram na última safra conforme dados mais de produtividades 12 milhões de toneladas por hectares (CONAB, 2015). A produção da cultura do arroz, está dividida em dois sistemas: várzeas em terras baixas e sequeiro em terras altas. O sistema de produção em várzea apresenta ótimas condições para o desenvolvimento da cultura quanto à disponibilidade de água, predominando a irrigação controlada (EMBRAPA, 2005). O método de cultivo de várzea corresponde a cerca de 40% da área total cultivada com arroz, contribuindo com 60% da produção nacional (GUIMARÃES, 2010).

O cultivo do arroz pode ser realizado tanto em terras altas como baixas com características muito diferenciadas. Em áreas de terras baixas, é cultivado em várzeas o sistema de cultivo empregado é o de arroz irrigado por inundação contínua controlada pela manutenção de uma lâmina de água de 10 cm até a maturação fisiológica dos grãos no estágio reprodutivo R9. Dentre estas áreas de cultivo em várzeas podem-se destacar os estados do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC) que são responsáveis pelo cultivo de 60% da produção de arroz nacional de arroz irrigado (EMBRAPA, 2005).

Os sistemas de produção presentes em áreas de terras altas são cultivados em terrenos mais drenados, solos de cerrado que depende exclusivamente das precipitações pluviais como fonte de umidade para o desenvolvimento da cultura. Atualmente o arroz de terras altas nas regiões favorecidas do cerrado, busca consolidação com sistemas de produção de grãos com adaptação para o plantio direto. Em áreas onde há períodos de estiagem, mesmo durante a estação chuvosa, alguns produtores, utilizam a irrigação por aspersão como alternativa para

solucionar o problema e garantir a estabilidade da produção, podendo aumentar a produtividade e melhorar a qualidade dos grãos (RUCATTI, 2007).

Dentre as várias formas para aumentar a produção vegetal podemos destacar a importância do N. Elemento importante na síntese de proteínas e enzimas que garantem a vida do vegetal. A decomposição da matéria orgânica do solo, a utilização de fertilizantes nitrogenados e a (FBN) da atmosfera são processos que se constituem em fontes capazes de fornecer importantes quantidades de nitrogênio as plantas (CARVALHO, 2002).

2.4 Importância do N na cultura do arroz

Com exceção da água, o N é considerado um dos mais importantes nutrientes responsáveis pelo crescimento e produtividade na cultura do arroz irrigado. É um nutriente exigido em maiores quantidades nas plantas cultivadas, é responsável por produzir de 2 a 5% de Massa Seca (MS) vegetal, isso denota a sua importância para o metabolismo das plantas, sendo constituinte de enzimas, proteínas, DNA, RNA, clorofilas e percursos de hormônios. No entanto, quando a adubação mineral de N for realizada com doses excessivas, pode ocorrer poluição ambiental causando eutrofização de lagoas e a perda de nutrientes por lixiviação (KUSS, 2006; MALAVOLTA e MORAIS, 2007).

A eficiência do uso do N pode ser aumentada com o uso de doses adequadas em épocas apropriadas, com manejo adequado de água da irrigação por inundação. Além disso, outra fonte natural de fornecimento de N para as plantas de arroz irrigado é através da FBN (FAGERIA et al., 2003; AZAMBUJA et al., 2004). O processo pelo qual o N circula mediante compartimentos terrestres como no solo, microrganismos, plantas, animais, (MOS) matéria orgânica do solo, recursos hídricos e ar é chamado de ciclo do N.

Aproximadamente 78% do ar atmosférico é composto por N, os organismos que pertencem ao grupo dos eucariotos não conseguem utilizar este elemento diretamente. Apenas uma porção dos organismos do grupo dos procariotos consegue converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera em NH_4 , a qual pode ser incorporada para o crescimento e manutenção das células. Estes organismos são denominados organismos diazotróficos que são responsáveis pela incorporação do N à biomassa, esse processo é chamado de FBN (MARIN et al., 2012).

Antes de sua absorção pelas plantas, o N retirado do ar é transformado em NH_4 e utilizado diretamente pelas plantas. O N fixado pode ser transformado no solo em nitrato (NO_3^-) e também utilizado pelas plantas. A época da aplicação e o parcelamento da adubação

nitrogenada podem melhorar a resposta da cultura ao N, especialmente em altas doses, além de aumentar a eficiência do uso deste nutriente durante o desenvolvimento da cultura, provendo as plantas de quantidades adequadas durante a maior demanda pelo nutriente (FAGERIA e BALIGAR, 1999).

A ureia é o fertilizante nitrogenado mais utilizado no Brasil devido às suas vantagens comparativas em termos de custo para o agricultor (LEMOS et al., 2013). A produtividade de grãos e seus componentes podem estar intimamente ligados entre si, de forma a apresentar correlações positivas ou negativas. Assim, o conhecimento dessas correlações pode ajudar na escolha do melhor manejo da adubação nitrogenada, o qual pode aumentar a produtividade e diminuir o custo de produção e o impacto ambiental (FREITAS et al., 2001).

O parcelamento da adubação nitrogenada em cobertura visa a aumentar a produção de grãos, uma vez que o N disponível é rapidamente absorvido pela planta e/ou perdido pelos processos de lixiviação e desnitrificação. Na cultura do arroz irrigado, ocorre a elevação dos teores de amônia (NH_4^+) no solo, sendo assim considerada a principal fonte de N para a cultura. No entanto isso ocorre devido a aplicação da uréia em solo bem drenado e a imediata inundação da área, com isso, o N desloca-se no solo em profundidades seguindo o movimento da água, podendo ficar retido nos colóides, na forma de N-NH_4^+ . A uréia aplicada na água desloca-se apenas nos primeiros centímetros do solo onde é hidrolisada a N-NH_4^+ que se difunde tanto para a água como para o solo. Na água, poderão ocorrer perdas de N por volatilização de NH_3 enquanto, no solo, o N-NH_4^+ pode ser nitrificado na camada oxidada. Caso o N-NO_3^- produzido se difunda até a camada reduzida, este poderá ser perdido por desnitrificação (MATEUS et al., 2006).

A importância do nitrogênio (N) nesta cultura é indiscutível, bem como o uso controlado da adubação nitrogenada, estes são fatores importantes que contribuem para a diminuição dos riscos de poluição ambiental e os custos na produção (EMBRAPA, 2005). Por outro lado, a associação entre inoculação de bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada pode reduzir 40 a 50% a aplicação de nitrogênio no arroz irrigado devido a fixação biológica do nitrogênio (FBN) (LADHA e REDDY, 2003). Devido ao custo atual da energia fóssil e da necessidade de fertilizantes nitrogenados para a produção de alimentos, torna-se cada vez maior o interesse pela FBN e o melhoramento da sua eficiência na cultura do arroz.

2.5 FBN na cultura do arroz

A FBN é um processo pelo qual maior parte do N atmosférico é incorporado à matéria viva, ao longo da evolução do nosso planeta. Ainda hoje, este processo constitui a principal via de incorporação de nitrogênio ao ecossistema, que constantemente é reciclado para a atmosfera principalmente pela ação de organismos decompositores MOS. Diante do custo atual da energia fóssil e da necessidade de fertilizantes nitrogenados para a produção de alimentos é grande o interesse pela FBN e o melhoramento da sua eficiência especialmente em culturas agrícolas que possuem elevada demanda de N para o seu cultivo, caso por exemplo da cultura do arroz (PIMENTEL, 1991).

Desta forma, a ação de organismos fixadores de n e desnitrificadores garante um reservatório inesgotável de N na atmosfera. Além de garantir um ecossistema em equilíbrio, a redução na aplicação de doses excessivas de compostos nitrogenados na agricultura como por exemplo o NO_3^- , que contamina as águas e os vegetais consumidos pelo homem, possibilita o desenvolvimento de uma agricultura menos agressiva ao ambiente. A FBN fornece entre 139 e 170 milhões de toneladas de N, valores superiores aos 65 milhões aplicados como fertilizantes (PEOPLES e CRASWELL, 1992).

A fixação simbiótica de N depende da capacidade de alguns diazotróficos, que apresentam uma baixa sobrevivência no solo, colonizarem principalmente o interior de raízes de gramíneas e em associação com algumas plantas, fixarem N. Posteriormente este grupo foi dividido em endofíticos facultativos, capazes de colonizarem tanto as raízes quanto o interior das raízes, porém com baixa sobrevivência no solo, enquanto os endofíticos obrigatórios, embora colonizam o interior das raízes e a parte aérea, não sobrevivem bem no solo (BALDANI et al., 1997).

As bactérias diazotróficas são responsáveis por colonizarem os tecidos internos das plantas, estimularem o crescimento vegetal, aumentando a resistência da planta à doenças melhorando assim a qualidade da planta de resistir ao stress ambiental. As principais formas de entrada dos microrganismos em vegetais, entre elas na cultura do arroz é através de feridas aonde ocorre pela abrasão com o solo durante o processo de crescimento radicular, também através da adesão de polímeros extracelulares que facilitam a adesão a superfície das raízes ou podem chegar através dos estômatos por correntes de vento ou de chuva, multiplicando-se e invadindo a câmara subestomática (REIS et al., 2000).

Nas raízes esta atração ocorre através de compostos como flavonóides, que participam da comunicação enquanto fornecem fontes de carbono para as bactérias, ocorre a ligação das

bactérias á superfície radicular através dos pontos de emergência raízes laterais, algumas penetram através de descontinuidades existentes na epiderme tais como a zona de alongamento e rachaduras laterais na raiz. No entanto, também podem-se espalhar em espaços intracelulares e câmara subestomática, colonizando a filhos e folhas novas, algumas bactérias movem-se das raízes para as partes aérea no xilema conforme MONTEIRO et al., (2012).

Devido sua capacidade de converter N atmosférico em amônia que pode ser utilizada pela planta, as bactérias diazotróficas fazem parte das bactérias denominadas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR). Os efeitos positivos destes organismos podem ocorrer por influencia direta ocasionando o aumento da solubilização e entrada de nutrientes ou produção de reguladores de crescimento vegetal, ou indireta aonde ocorre a supressão de patógenos por produção de sideróforos ou antibióticos (SABINO et al., 2007).

As bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCP) são conhecidas como bactérias responsáveis pela colonização dos tecidos das plantas, atuam tanto pelo controle biológico de doenças como pela promoção do crescimento das plantas, aumentando seu desenvolvimento e produtividade conforme Mariano et al., (2003).

As BPCP podem ter habitat endofítico ou epifítico: As bactérias epifíticas encontram-se na superfície dos órgãos vegetais, habitando locais protegidos utilizando exsudados e nutrientes de fontes externas, sem causar doenças, podendo ser isoladas tanto do filoplano quanto do rizoplano. As bactérias endofíticas encontram-se nos tecidos internos da planta, colonizando os espaços intercelulares e córtex das raízes ou colonizando sistematicamente toda a planta através dos vasos condutores sem causar nenhum sintoma de doença (AGARWAL e SHENDE, 1987).

Os principais efeitos observados na promoção de crescimento de plantas são aumento da taxa de germinação, crescimento das raízes, crescimento de colmos ou caules, aumento do número de folhas e área foliar, crescimento de tubérculos, aumento do número de flores e rendimento. As BPCP biocontroladoras atuam no crescimento, infectividade, virulência e agressividade do patógeno, bem como nos processos de infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução (HALMANN et al., 1997).

As BPCP podem aumentar o crescimento das plantas através de um ou mais mecanismos tais como produção dos fitohormônios auxinas, citocininas, giberelinas e etileno; produção de enzimas; produção de ácido cianídrico (HCN); solubilização de fosfatos e oxidação de sulfatos; eliminação e alteração da microflora deletéria; fixação de nitrogênio e produção de antibióticos extra-celulares (AMOOAGHAIE et al., 2002).

A bactéria mundialmente mais estudada é a *Azospirillum*, sua inoculação tem a capacidade de modificar a morfologia do sistema radicial, incrementando, além do número de radicelas, o diâmetro das raízes laterais e adventícias, provavelmente devido à produção, pela bactéria, de substâncias promotoras do crescimento, como auxinas, giberelinas e citocininas (CAVALLET et al., 2000). Estudos realizados com plantas da família Poaceae, mostram que de forma diferente das leguminosas a associação com bactérias diazotróficas nesta família botânica não há formação de nódulos radiculares. Para a cultura do arroz, diversas bactérias foram isoladas em associação com a planta, como espécies dos gêneros *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Pseudomonas*, *Enterobacter* e entre outras (DOBERAINER 1994; BALDANI et al., 2000).

A FBN no solo é realizada por organismos diazotróficos pertencentes ao grupo dos procariotos, como algumas espécies de bactérias actinomicetos e cianobactérias que possuem a capacidade de redução do N atmosférico em formas assimiláveis a planta. As bactérias fixadoras de N podem contribuir para o crescimento vegetal devido a produção de hormônios de crescimento, como por exemplo, as auxinas (REIS et al., 2007).

Apesar das contribuições da FBN terem sido inicialmente verificadas em plantas leguminosas, plantas da família Poaceae são utilizadas em estudos que constatarem o aumento na produção quando inoculadas com bactérias diazotróficas. A exploração agrícola da FBN nos países desenvolvidos vem sendo motivada através da conscientização ecológica, sobre o uso intensivo e abusivo de produtos agroquímicos além de representar uma diminuição no custo da produção (BALDANI et al., 2006).

A FBN ainda não é a grande preocupação em muitos países em desenvolvimento, principalmente em culturas de Poaceae, como por exemplo, o arroz irrigado. De um modo ou de outro, a exploração agrícola da FBN depende do profundo conhecimento das bactérias diazotróficas, suas relações com as plantas superiores e com os demais membros da microflora do solo e da rizosfera (PIMENTEL, 1991).

A aplicação prática da FBN em gramíneas ainda é incipiente, porém grandes avanços têm sido obtidos em termos da identificação, da contribuição da FBN e a manipulação das associações de bactérias fixadoras de nitrogênio com as gramíneas visando aumentar sua eficiência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do estudo

O experimento foi realizado no período de 29/11/2013 a 18/04/2014 na área experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM (29° 45'S, 53° 42'W; cerca de 95 metros de altitude), Rio Grande do Sul, Brasil. O clima do local é subtropical húmido (tipo Cfa2 na classificação de Köppen) com precipitação média anual de 1.686 mm e temperatura média anual de 19,3°C. O solo foi classificado como Planossolo Hidromórfico Eutrófico arênico (EMBRAPA, 2006). Anteriormente a implantação do experimento, o solo da área foi revolvido com grade de discos e depois cultivado com arroz irrigado.

3.2 Delineamento experimental e tratamentos utilizados

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições em um fatorial 2 x 4 x 3, sendo duas cultivares de arroz irrigado (BR IRGA-409 e Puitá Inta-CL), quatro condições de inoculação (sem inoculação - SI, estirpe UFSM-11, estirpe UFSM-13 e o *Azospirillum brasiliense* presente no inoculante comercial Masterfix Gramíneas, Stoller - IC) e três doses de N (0, 50% e 100% da dose recomendada para a cultura), totalizando 24 tratamentos.

As cultivares de arroz e as estirpes (UFSM) foram selecionadas a partir do estudo realizado por Nunes (2013), em casa de vegetação, com o objetivo de 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. A caracterização molecular das estirpes UFSM-11 e UFSM-13 realizada no Instituto Biológico de São Paulo, utilizando a técnica molecular em PCR, indicou que essas estirpes pertencem às espécies *Enterobacter Oryzodophyticus* e *Herbaspirillum Frigiense*, respectivamente.

3.3 Inoculação das sementes de arroz irrigado com bactérias diazotróficas e meios de cultura

As estirpes encontravam-se devidamente acondicionadas em eppendorfs na coleção do Laboratório de Biotransformações de Carbono e Nitrogênio (LABCEN) da UFSM. Estas foram crescidas em meio de cultura seletivo aonde inoculou-se 1 μL da cultura bacteriana dos isolados UFSM-11 (*Enterobacter Oryzandophyticus*) e UFSM-13 (*Herbaspirillum Frigiense*), conforme Döbereiner et al. (1994). Separadamente, em 5 mL de meio de cultura rico em nutrientes (DYGS, Anexo A), aonde permaneceram por 72 horas em incubadora sob temperatura de 24°C e agitação de 115 rpm até observar-se a formação de um véu no tubo de ensaio com o meio de cultura líquido.

Logo após foram inoculadas 15 mL deste meio de cultura com a bactéria crescida em turfa previamente esterilizada, a qual foi cedida pela EMBRAPA Agrobiologia Seropédica (RJ). Após a inoculação na turfa as estirpes foram mantidas na incubadora por 24 horas a temperatura de 24°C.

A contagem do número de células das bactérias diazotróficas presentes na turfa foi realizada através da técnica do NMP (Número Mais Provável), utilizando os meios de cultura seletivos Nfb e JNfb (Anexo B) com três repetições. A turfa com o isolado UFSM-13 apresentou $2,5 \times 10^{10}$ células g^{-1} e a turfa com o isolado UFSM-11 apresentou $7,5 \times 10^8$ células g^{-1} . O número de células viáveis presentes no IC foi de 2×10^8 células mL^{-1} .

A inoculação das bactérias (UFSM-11, UFSM-13 e *Azospirillum brasiliense*-Masterfix) nas sementes das duas cultivares foi realizada em laboratório. A turfa com as estirpes UFSM-11, UFSM-13 foi aplicada na dose de 10 g para 1 kg de semente. O IC foi inoculado nas sementes conforme as recomendações do fabricante, o qual indica a dose de 20 mL por 1 kg de semente. Após a aplicação da turfa e do inoculante as sementes foram homogeneizadas e em seguida colocadas para secar ao ar no laboratório.

3.4 Semeadura e manejo da cultura do arroz

Antecedendo a semeadura o solo da área do experimento foi preparado através do uso de gradagens. A semeadura do arroz foi realizada 29/11/2013 com auxílio de uma semeadora mecanizada e o espaçamento entre linhas utilizado foi de 0,17 m. Em cada parcela foram semeadas 9 linhas com comprimento de 1,53 m totalizando uma área de cultivo de $4,59 \text{ m}^2$ para cada unidade experimental.

Nos tratamentos com o uso de N, a adubação nitrogenada na semeadura e na cobertura foi realizada de acordo com a análise do solo e recomendação da CQFS - RS/SC (2004). A dose de N recomenda para o solo da área do experimento é de 100 kg ha⁻¹ (100%N), com isso nos tratamentos 50%N foi aplicado 50 kg ha⁻¹. O N foi aplicado na forma de ureia. A aplicação do N foi realizada em três épocas: a 1ª aplicação foi na semeadura no dia 29/11/2013, 2ª aplicação no início do perfilhamento anterior ao no início da irrigação em 22/12/2013, 3ª aplicação no início da diferenciação da panícula em 17/01/2014.

3.5 Produção de matéria seca e produtividade de grão

A produção de matéria seca (MS) pelo arroz foi avaliada em três épocas: a 1ª coleta no estágio R0, a 2ª coleta no estágio R1 na diferenciação da panícula e a 3ª coleta foi realizada na plena maturação fisiológica no estágio R9. Em cada época foi realizada a coleta das plantas presentes em dois segmentos de 0,5 m lineares por parcela. Na coleta realizada na maturação fisiológica as plantas foram separadas em grãos e palha. Após a coleta as plantas de arroz foram secas em estufa a 65°C até peso constante e em seguida pesadas para determinação da MS produzida.

A avaliação da produtividade de grãos foi realizada na maturação fisiológica da cultura coletando-se as plantas de quatro segmentos de 2 m linear de cada parcela. Após a coleta o material foi trilhado, os grãos pesados e a produção final de grãos foi corrigida para 13% de umidade.

3.6 Acúmulo de N e quantificação da FBN

A quantidade de N acumulada pela cultura do arroz nos diferentes tratamentos foi determinada nas mesmas épocas da avaliação da produção de MS. O material vegetal seco foi moído e os teores de N total determinados em analisador elementar (modelo Flash EA 1112, Thermo Finnigan, Milan, Itália).

A quantificação da FBN foi realizada através da técnica da abundância natural do isótopo ¹⁵N e apenas nos tratamentos com inoculação e sem N e naqueles sem inoculação e sem N. Esta técnica toma por base o fato de que o N do solo é normalmente um pouco enriquecido em ¹⁵N em relação ao N₂ do ar, como resultado de fracionamento isotópico entre ¹⁴N e ¹⁵N que ocorre nos processos físicos, químicos e biológicos nas transformações do N da matéria orgânica e do solo. Dessa maneira, uma planta não fixadora do N₂, crescendo

nas mesmas condições da planta fixadora, terá sua composição em ^{15}N semelhante ao do N disponível do solo. Por outro lado, a planta fixadora do N_2 apresentará uma abundância em ^{15}N menor, devido ao efeito de diluição que esse N_2 causará, uma vez que o ^{15}N em excesso da atmosfera é zero (BODDEY, et al., 2001).

No presente estudo as plantas testemunhas (controle) que se desenvolveram espontaneamente na área de cultivo do arroz foram: picão-preto (*Bidens pilosa* L.), água pé mirim (*Heteranthera reniformis*), aguapé (*Sagittaria guyanensis*), angiquinho (*Aeschynomene sensitiva*) e capim arroz (*Echinochloa crusgalli*). Após a coleta dessas plantas as mesmas foram secas a 65°C e moídas. Em seguida nas amostras secas e moídas das plantas controles e do arroz coletadas na maturação fisiológica da cultura foi determinado o excesso isotópico em ^{15}N utilizando um analisador elementar (modelo Flash 2000 IRMS) acoplado em linha a um espectrômetro de massas (modelo Delta Advantage marca Thermo Electron) instalado no Laboratório Biotransformações de Carbono e Nitrogênio, no Departamento de Solos da UFSM. Na tabela 1 são apresentados os valores de abundância natural em ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) determinados nas plantas testemunhas. Para o cálculo da FBN foi utilizado o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ de 10,07.

A percentagem de N derivada da FBN na planta (%FBN) foi calculada pela fórmula abaixo:

$$\%FBN = [(\delta^{15}\text{N}_t - \delta^{15}\text{N}_s) / (\delta^{15}\text{N}_t - B)] \times 100$$

Sendo que $\delta^{15}\text{N}_t$ e $\delta^{15}\text{N}_s$ correspondem aos valores de abundância natural de ^{15}N das plantas testemunhas e do arroz, respectivamente e B é uma constante relacionada ao processo de discriminação isotópica de ^{15}N pelo processo da FBN.

Tabela 1 – Valores de abundância natural de ^{15}N das plantas testemunhas.

Espécies de plantas testemunhas	$\delta^{15}\text{N}$
Picão-preto (<i>Bidens pilosa</i> L.)	9,06
Água pé mirim (<i>Heteranthera reniformis</i>)	8,96
Aguapé (<i>Sagittaria guyanensis</i>)	10,75
Angiquinho (<i>Aeschynomene sensitiva</i>)	10,85
Capim arroz (<i>Echinochloa crusgalli</i>)	10,58
Média	10,07

3.7 Análise dos resultados

Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sisvar 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de MS

A reposta das cultivares de arroz a inoculação foi variável durante o ciclo da cultura e não houve interação apenas para os fatores cultivar x inoculação no estágio R9. No estágio R0 a inoculação das estirpes UFSM-11 e UFSM-13 na cultivar IRGA-409 promoveu um incremento de 16% e 13% na MS, respectivamente, em relação ao tratamento SI (Tabela 2). Neste mesmo estágio a inoculação na cultivar Puitá apresentou efeito positivo apenas quando utilizada a estirpe UFSM-13, a qual resultou em incremento de 13% na MS produzida comparado ao tratamento SI (Tabela 2). Já no estágio R4, observa-se ausência de efeito da inoculação sobre a produção de MS na cultivar 409 (Tabela 2). Na cultivar Puitá efeito significativo da inoculação foi observado apenas com o IC, o qual promoveu um incremento de 21% na MS da parte aérea da cultivar em relação ao tratamento SI.

Tabela 2 – Produção de matéria seca (Mg ha^{-1}) da parte aérea em duas cultivares de arroz em dois estádios de desenvolvimento (R0 e R4) sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas.

Cultivar	Inoculação			
	UFSM-11	UFSM-13	IC	SI
	R0			
409	3,7aA	3,6bA	3,2Bb	3,2bB
Puitá	4,2aC	5,1aA	3,9aC	4,5aB
	R4			
409	8,7aAB	8,8aAB	8,2bB	9,4aA
Puitá	8,4aB	9,0aB	10,1aA	8,3bB

Médias seguidas de mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. IC, inoculante comercial; SI, sem inoculação.

No estágio R9 houve apenas efeito isolado da inoculação sobre a produção de MS. Observa-se que todas as estirpes testadas apresentaram efeito positivo sobre a produção de MS nesse estágio (Tabela 3). No entanto, os maiores incrementos foram observados com a inoculação da estirpe UFSM-13 e do IC que resultaram em um incremento médio em relação ao tratamento SI de $1,8 \text{ Mg de MS ha}^{-1}$.

O efeito positivo da inoculação de bactérias diazotróficas sobre a produção de MS é relatada em diversos estudos realizados na cultura do arroz (GUIMARÃES, 2003; JHA et al., 2009; Ferreira et al., 2014), do milho (MAZZUCHELLI et al., 2014; NETO et al., 2013) e

trigo (LEMOS et al., 2013). No estudo de Guimarães (2003) a inoculação da estirpe ZAE94 (*Herbaspirillum seropedicae*) em cultivares de arroz, proporcionou um aumento em até 43% na MS da parte aérea da cultura. Ferreira et al. (2014) testando a inoculação em cultivares de arroz observou efeito positivo da inoculação sobre a altura de planta e massa fresca da parte aérea, apresentando em média para a altura de planta valores 9,3% superiores em relação ao controle e de massa fresca da parte aérea com valores médios 8,8% superiores ao controle. Em trabalho realizado por Jha et al. (2009) com duas cultivares indianas de arroz também foram observados efeitos positivos da inoculação de bactérias sobre o crescimento da parte aérea das plantas inoculadas.

Tabela 3 – de matéria seca (Mg ha⁻¹) da parte aérea em duas cultivares de arroz em três estádios de desenvolvimento (R0, R4 e R9) e sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas.

Estádio	Cultivar		Inoculação			
	409	Puitá	UFSM-11	UFSM-13	IC	SI
R0	3,5b	4,4 ^a	3,9b	4,4a	3,6c	3,9b
R4	8,7a	8,9 ^a	8,5b	8,9ab	9,1 ^a	8,8ab
R9	21,6a	21,4 ^a	21,3b	22,2a	22,2 ^a	20,4c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. IC, inoculante comercial; SI, sem inoculação.

O resultado da análise de variância indicou interação significativa entre os fatores cultivar x dose nitrogenada para a produção de MS em todos os estádios avaliados (Tabela 4). De maneira geral a cultivar 409 apresentou maior resposta à adubação nitrogenada comparada a cultivar Puitá. Por exemplo, no estádio R9 na cultivar 409 a produção de MS aumentou em 1,6 e 2,6 Mg ha⁻¹ em relação ao tratamento sem N quando utilizada 50 e 100% da dose de N, respectivamente (Tabela 4). Já para a cultivar Puitá não houve diferença na MS produzida pela testemunha e o tratamento com 50% de N e com a aplicação de 100% da dose de N o incremento de MS foi de apenas 1,6 Mg ha⁻¹.

Tabela 4 – Produção de matéria seca (Mg ha^{-1}) da parte aérea de duas cultivares de arroz em três estádios de desenvolvimento (R0, R4 e R9) e três doses de N.

Cultivares	Doses de Adubação Nitrogenada (%)		
	0	50	100
		R0	
409	3,0bC	3,5bB	3,9bA
Puitá	4,2aB	4,4aB	4,7aA
		R4	
409	8,6bAB	8,5bB	9,1bA
Puitá	9,2aA	9,0aA	8,6aA
		R9	
409	20,2aC	21,8aB	22,8aA
Puitá	20,8aB	21,1aB	22,4aA

Médias seguidas de mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A interação entre os fatores inoculação x dose de adubação para a produção de MS também foi significativa em todos os estádios de avaliação (Tabela 5). No estádio de maturação fisiológica (R9) observa-se que até 50% da dose de N houve maior produção de MS com a inoculação do isolado UFSM-13 e do IC do que sem o uso da inoculação. É importante ressaltar que com o uso do isolado UFSM-13 e do IC não houve diferença na produção de MS entre as doses de N utilizadas indicando que a inoculação teve efeito similar ao da adubação nitrogenada sobre a produção de MS das cultivares testadas.

Tabela 5 – Produção de matéria seca (Mg ha^{-1}) da parte aérea de arroz em três estádios de desenvolvimento (R0, R4 e R9) e sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas e três doses de N.

Tratamentos	Doses de adubação nitrogenada (%)		
	0	50	100
		R0	
UFSM-11	3,7bB	3,8bB	4,2bA
UFSM-13	4,2aB	4,2aB	4,9aA
IC	3,1cB	3,9abA	3,8cA
SI	3,5bC	3,8 bB	4,3bA
		R4	
UFSM-11	7,7bB	7,8bB	10,0aA
UFSM-13	8,3bB	9,5aA	8,9bAB
IC	10,0aA	9,2aAB	8,3bB
SI	9,7aA	8,5abB	8,3bB
		R9	
UFSM-11	19,5bC	21,4abB	23,1aA
UFSM-13	22,0aA	21,8aA	22,9abA
IC	21,6aA	22,3aA	22,7abA
SI	18,9bC	20,3bB	21,7bA

Médias seguidas de mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. IC, inoculante comercial; SI, sem inoculação.

Diversos estudos indicam que o uso isolado da inoculação de bactérias diazotróficas não é capaz de sustentar elevadas taxas de crescimento das culturas gramíneas (Ferreira et al., 2010; Ramos et al., 2010). Isso em função da FBN em gramíneas não proporcionar elevadas quantidades de N como observado em leguminosas como a soja. No presente estudo observa-se que principalmente para a estirpe UFSM-13 e o IC o uso combinado à adubação nitrogenada promoveu aumento na produção MS em relação ao tratamento SI. Ferreira et al. (2010) observaram que a inoculação de *Azospirillum brasilense*, estirpe Sp245, em variedade de trigo BRS 296, acrescidos com dose de 40 kg N ha⁻¹ obtiveram aumento médio de 23,2% de N-total da parte aérea em relação ao controle sem inoculação. No estudo de Ramos et al (2010) quando as sementes de milho foram inoculadas com *Azospirillum spp.* e 30 kg ha⁻¹ de N em cobertura obtiveram resultados de maior altura de planta de milho em relação à testemunha com inoculação sem N. Já em estudo de Freitas et al. (2011) com *Azospirillum brasilense* observaram que o uso do inoculante não proporcionou aumento significativo em na área folia, sendo a mesma influenciada apenas pelas doses de N.

4.2 Acúmulo de N

A análise de variância dos dados de N acumulado na MS das cultivares de arroz indicou a ocorrência de interação entre fatores apenas em R0 (Tabela 6). Observou-se incremento no acúmulo de N na cultivar 409 de 22% e 17% quando inoculada com as estirpes UFSM-11 e UFSM-13, respectivamente. O uso do IC não promoveu aumento significativo no acúmulo de N em R0. Na cultivar Puitá nesse mesmo estágio verificou-se aumento significativo no acúmulo de N apenas com o uso do isolado UFSM-13, o qual promoveu um incremento de 15% em relação ao tratamento SI (Tabela 6).

Tabela 6 – Acúmulo de N (kg ha⁻¹) na parte aérea de duas cultivares de arroz sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas.

Cultivares	Inoculação			
	UFSM-11	UFSM-13	IC	SI
409	63,3bA	59,6bA	47,5bB	49,2bB
Puitá	70,8aB	88,2aA	69,2aB	75,7aB

Médias seguidas de mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. IC, inoculante comercial; SI, sem inoculação.

Analisando a interação entre inoculação x adubação no estágio R0, verifica-se efeito positivo da inoculação das estirpes UFSM-11 e 13 combinada a 50% da dose de N sobre o

acúmulo de N na MS das cultivares de arroz (Tabela 7). A quantidade média de N acumulada pelo arroz nesses dois tratamentos (70 kg ha^{-1}) superou em 32% aquela do tratamento SI e com 50% da dose de N.

Tabela 7 – Acúmulo de N (kg ha^{-1}) na parte aérea da cultura do arroz sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas e três doses de N.

Inoculação	N		
	0	50	100
UFSM-11	61,0abA	68,8aA	71,4aA
UFSM-13	70,8aA	71,7aA	79,2aA
IC	46,0cB	60,4abA	68,7aA
SI	55,5bcB	53,0bB	78,8aA

Médias seguidas de mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. IC, inoculante comercial; SI, sem inoculação.

Nos estádios R4 e R9 houve apenas efeito isolado dos fatores cultivar e inoculação (Tabela 8) e adubação nitrogenada (Tabela 9). Em R4 a cultivar Puitá apresentou maior acúmulo de N do que a cultivar 409. No entanto na maturação fisiológica (R9) a quantidade de N entre essas duas cultivares não diferiu. A adubação nitrogenada promoveu um acréscimo na quantidade de N acumulado em relação ao tratamento sem o uso de N (Tabela 9). Por exemplo, em R9 a quantidade de N acumulada no tratamento sem N foi de $203,8 \text{ kg ha}^{-1}$ e aumentou em 12 e 24% quando aplicado 50 e 100% da dose de N, respectivamente.

Tabela 8 – Acúmulo de N (kg ha^{-1}) na parte aérea de duas cultivares de arroz em três estádios de desenvolvimento (R0, R4 e R9) sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas.

Parâmetro	Cultivar		Inoculação			
	409	Puitá	UFSM-11	UFSM-13	IC	SI
R0	54,9b	76a	67,1b	73,9a	58,3c	62,4bc
R4	85,8b	107,9a	103,2 ^a	96,8ab	99,0a	88,5b
R9	225,3a	232,0a	200,8b	249,2a	256,8 ^a	207,9b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. IC, inoculante comercial; SI, sem inoculação.

Tabela 9 – Acúmulo de N (kg ha^{-1}) na parte aérea de duas cultivares de arroz em três estádios de desenvolvimento (R0, R4 e R9) e três doses de N.

Estádio	Doses de adubação nitrogenada (%)		
	0	50	100
R0	58,3b	63,5b	74,5a
R4	90,7b	96,1ab	103,8a
R9	203,8c	228,4b	253,8a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A produção de arroz depende, sobretudo, da disponibilidade de N para as plantas, pois este é um dos principais nutrientes responsáveis pelo aumento do valor dos componentes de produção e a sua ausência torna-se um fator limitante ao crescimento vegetal (FAGERIA; STONE, 2003). Além da adubação nitrogenada, a inoculação de bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado pode ser importante estratégia para promover o aumento no acúmulo de N pela planta. No presente estudo, no estágio R9 da cultura do arroz, o acúmulo de N nos tratamentos com o uso da estirpe UFSM-13 e IC superou em média 45 kg ha⁻¹ a quantidade de N acumulada no tratamento controle (Tabela 8).

Esses resultados indicam efeito positivo da inoculação sobre o acúmulo de N. GUIMARÃES (2010) em estudo semelhante realizou a inoculação da estirpe ZAE 92 - *Herbaspirillum seropedicae*, em cultivares de arroz irrigado e verificaram que o acúmulo de N foi 34% maior que no tratamento controle. Malik et al. (2002) avaliando a inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* sp. observaram aumento de 30% do N total nas cultivares testadas. Em experimentos realizados por Baldani et al. (2000) em condições de casa de vegetação, demonstraram que as estirpes M130 (*Burkholderia* sp.), ZAE94 (*H. seropedicae*) e M209 (*Burkholderia* sp.) contribuíram com 20%, 17% e 11%, respectivamente, do nitrogênio acumulado na MS das plantas de arroz. Alguns estudos com a bactéria *Azospirillum* apontam que sua inoculação apresenta efeitos além da contribuição pela FBN. Essa bactéria possui a capacidade de modificar a morfologia do sistema radicular, incrementando, além do número de radículas, o diâmetro das raízes laterais e adventícias, provavelmente devido à produção, pela bactéria, de substâncias promotoras do crescimento, como auxinas, giberelinas e citocininas (CAVALLET et al., 2000). Tais modificações melhoram a absorção de água e nutrientes do solo resultando em melhor crescimento e desenvolvimento das plantas.

4.3 Fixação biológica de N (FBN)

A análise estatística dos dados de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) e FBN (% e kg ha⁻¹) indicou não haver interação entre variedades de arroz e inoculação para essas variáveis (Tabela 10). Houve apenas efeito da inoculação, independente da variedade de arroz utilizada (409 e Puitá). Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) medidos na parte aérea do arroz na maturação fisiológica em todos os tratamentos são inferiores a média de 10,1 observada para as plantas invasoras utilizadas como testemunha, indicando a ocorrência de FBN nas duas variedades de arroz nas quatro condições de inoculação. Os menores valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) foram observados com a estirpe UFSM-13 (5,1), sendo que nos demais tratamentos os valores de $\delta^{15}\text{N}$ não diferiram entre si e atingiram valor médio de 5,9.

Tabela 10 – Valores de $\delta^{15}\text{N}$ e porcentagem e quantidade de N proveniente da FBN em duas cultivares de arroz em quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas e sem o uso de adubação nitrogenada.

Cultivares/inoculação ¹	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	FBN (%)	FBN (kg ha ⁻¹)
409	5,3	47,8	91,2
409-UFSM-11	6,2	38,9	67,1
409-UFSM-13	3,9	60,9	126,9
409-IC	5,9	41,9	93,4
Puitá	5,6	44,1	84,9
Puitá-UFSM-11	5,6	44,6	82,7
Puitá-UFSM-13	4,3	57,3	133,4
Puitá-IC	6,0	40,0	89,3
		Variedades ²	
409	5,8 a	42,6 a	85,6 a
Puitá	5,6 a	44,0 a	91,9 a
		Inoculação	
SI	6,2 b	38,7 c	74,0 c
UFSM-11	6,0 b	40,7 c	73,2 c
UFSM-13	5,1 a	49,5 a	109,3 a
IC	5,6 b	44,2 b	98,2 b

¹ 409, BR IRGA-409; Puitá, Puitá Inta-CL; IC, inoculante comercial; SI, sem inoculação² Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott.

Com base nos valores de abundância natural de ^{15}N foi possível estimar a contribuição da FBN para o fornecimento de N às variedades de arroz nas quatro condições de inoculação. Em média, 43,3% do N acumulado nas variedades de arroz sem adubação nitrogenada foi oriunda da FBN. Considerando a inoculação, os valores de porcentagem de FBN observados decresceram na seguinte ordem: UFSM-13 (49,5) > inoculante (44,2) > UFSM 11 (38,7) = sem inoculação (40,7). Verifica-se que a inoculação da estirpe UFSM-13 resultou em um aumento de 10,8 pontos percentuais em relação aos tratamentos sem inoculação. Já o inoculante promoveu incremento na FBN de apenas 5,5 pontos percentuais em relação ao controle sem inoculação.

A quantidade de N proveniente da FBN foi obtida a partir da multiplicação dos valores de FBN (%) pelos valores de N total acumulado em R9 (maturação fisiológica). A quantidade de N proveniente da FBN não diferiu entre as duas variedades testadas, atingindo valor médio de 88,9 kg de N ha⁻¹. Entre os tratamentos com e sem inoculação a quantidade de N

proveniente da FBN seguiu comportamento semelhante ao observado para a percentagem do N proveniente da FBN em que os maiores valores foram observados com a estirpe UFISM-13. Nesse tratamento a quantidade de N proveniente da FBN atingiu 109,3 kg há⁻¹ e superou o tratamento controle sem inoculação em 35 kg há⁻¹. Com o uso do inoculante comercial esse aumento foi de 24 kg de N há⁻¹. A FBN, em cultivares de arroz irrigado pode resultar em até 50 kg há⁻¹ por cultivo, sendo considerado que provavelmente a FBN realizada nessas plantas seja o resultado da atividade de várias espécies de microrganismos diazotróficos que encontram-se associados. São inúmeros os efeitos positivos da inoculação de bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado (ROGER e LADHA, 1992).

4.4 Produtividades de grãos

Para a produtividade de grãos foi observada interação significativa apenas entre os fatores inoculação x nitrogênio. Ainda, não foi observada diferença na produtividade de grãos das duas cultivares, sendo o valor médio obtido de 11,1 Mg há⁻¹. Em relação ao fator inoculação, observou-se incremento na produtividade de grãos apenas com o uso da estirpe UFISM-13. Na tabela 11 observa-se que na ausência de adubação o tratamento com a estirpe UFISM-13 superou em 1,5 Mg há⁻¹ o tratamento sem inoculação. Estudo realizado por Kuss (2006) avaliando o uso da bactéria da espécie *Azospirillum brasiliense* quando inoculada a cultivar IRGA 420 sem adição de N, verificou que a inoculação promoveu um aumento na produtividade de grãos de 12% comparado ao controle sem inoculação. Aumentos na produção de grãos e no conteúdo de N dos grãos na cultivar IAC4440 também foram observados em experimentos realizados por Ferreira (2003), onde foi verificados aumentos de 13% a 19% em plantas que foram inoculadas com a estirpe *H. seropedicae*. Resultados similares foram obtidos em experimentos de inoculação com *Azospirillum spp.* na cultura do milho, com aumentos de 17% na produção de grãos (CAVALLET et al., 2000). Em estudo realizado por NUNES (2015) na cultura do trigo a inoculação de *A. brasilense* aumentou 10% a produtividade de cultivares de trigo comparado ao tratamento SI.

Tabela 11 – Produtividade de grãos (Mg ha^{-1}) da cultura do arroz sob quatro condições de inoculação de bactérias diazotróficas e três doses de N.

Inoculação	Adubação Nitrogenada		
	0	50	100
UFSM-11	9,9bB**	10,9aAB	11,8aA
UFSM-13	11,9aA	11,3aA	11,3aA
IC	10,9abA	11,5aA	11,5aA
SI	10,4bA	11,0aA	11,3aA

Médias na coluna e na linha com letras minúsculas, respectivamente, diferem entre si pelo teste de teste Tukey, a 5% de probabilidade. IC, inoculante comercial; SI, sem inoculação.

Os resultados de produtividade de grãos indicam baixa resposta das variedades a adubação nitrogenada. Apenas para o tratamento com a estirpe UFSM-11 foi observado efeito da aplicação de N sobre a produtividade de grãos. Nesse tratamento a resposta ocorreu somente com o uso de 50% da dose de N recomendada. Nos demais tratamentos a produtividade de grãos não respondeu a adubação nitrogenada de 50% e 100% da dose recomendada para a cultura nas condições do experimento do presente estudo. Além disso, ao contrário do observado para a produção de MS e acúmulo de N, não foi observado efeito positivo do uso combinado da inoculação e doses de N sobre a produtividade de grãos.

Os valores de produtividade de grãos alcançados no presente estudo podem ser considerados elevados, principalmente na condição de ausência de adubação nitrogenada. Tais resultados podem estar relacionados em parte a significativa contribuição da FBN ao suprimento de N à cultura que mesmo sem inoculação na média das duas variedades, a FBN contribuiu com 43,3% do N acumulado ($88,9 \text{ kg ha}^{-1}$) na maturação fisiológica (Tabela 10). A ocorrência natural da FBN em arroz, ou seja, sem o uso da inoculação, já é relatada em diversos estudos (ARAÚJO et al., 2015; DIDONET et al., 1993; FAGERIA et al., 1997; MACHADO et al. 1998; LANA et al. 2010). O ambiente alagado gera uma condição de baixa disponibilidade de O_2 o que favorece a atividade da enzima nitrogenase nas bactérias diazotróficas de vida livre e em endofíticas facultativas e obrigatórias. Estudos realizados pela Embrapa Seropédica - RJ, mostram que a inoculação de bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado é responsável por reduzir até 30% dos gastos com fertilizantes nitrogenados aplicados na lavoura (BALDANI et al. 2006).

5 CONCLUSÕES

A inoculação de bactérias diazotróficas aumentou a produção de MS e acúmulo de N na maturação fisiológica do arroz com destaque para a estirpe UFSM-13 e o inoculante comercial.

O uso combinado da inoculação e adubação nitrogenada promoveu aumento na produção de MS e acúmulo de N, no entanto isso não resultou em maior produtividade de grãos.

A FBN ocorreu naturalmente nas variedades de arroz BR IRGA-409 e Puitá Inta-CL e foi aumentada nessas variedades com a inoculação da estirpe UFSM-13 e do inoculante comercial.

A produtividade de grãos aumentou apenas com o uso da estirpe UFSM-13.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S.; SHENDE, S. T. Tetrazolium reducing microorganisms inside the roots of Brassica species. **Current Sciences**, Bangalore, v. 56, p. 187-188, 1987.
- AMOOAGHAIE, R.; MOSTAJERAN, A.; EMTIAZI, G. The effect of compatible and incompatible *Azospirillum brasilense* strains on proton efflux of intact wheat roots. **Plant and Soil**, v. 243, p. 155-160, 2002.
- ARF, M.V., SILVA D. C., CALCANHO R. S., BATISTA, M.S., FONTOURA, V.M.F. Produtividade do Milho Cultivado no Verão em Função de Doses de Nitrogênio e Inoculação ou Não com *Azospirillum Brasilense*. In: XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2012, Águas de Lindóia. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2012. p. 1575-1580.
- AZAMBUJA, I. H. V.; VERNETTI JR. F. J; MAGALHÃES J. R., A. M. Aspectos socioeconômicos da produção de arroz. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. DE (Ed), **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Embrapa, Brasília, DF, p. 23-44,
- BALDANI, J. I.; REIS, V. R. S.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.) **Biociência: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS, Caxias do Sul, 433p, 2002.
- 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**, v. 77, p. 549-579, 2005.
- 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**. v. 29, n. 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**, v. 30, p. 485-491, 2000.
- 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.
- BARBOSA, J. N. T. Contribuição à sócio economia da lavoura de arroz irrigado. **Planeta Arroz**, Rio Grande do Sul, mar. 2012. Disponível em: <http://www.planetaarroz.com.br/site/artigos_detalhe.php?idArtigo=105> Acesso em: 17 mai. de 2013.
- BERG, G.; EGAMBERDIEVA, D.; LUGTENBERG, B.; HAGEMANN, M. Symbiotic Plant – Microbe Interactions: Stress Protection, Plant Growth Promotion, and Biocontrol by *Stenotrophomonas*. **Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology**, v. 18, p. 445-460, 2010.

- BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S., ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of the ^{15}N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N_2 fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 889-895, 2001
- BULL, L. T. Nutrição mineral do milho. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. (Ed.). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 63-131.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.
- DE CAMPOS, D. V. B. et al. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura de arroz sob inundação. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 41-46, 2003.
- CARVALHO, E. A. **Avaliação agrônômica 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.
- CAVALLET, L. E. et al. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum sp.* **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000.
- 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 junho 2015
- DOBBELAERE, S.; OKON, Y. **The plant growth-promoting effect and plant responses. In “Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations”** (Elmerich, C.; Newton, W.E. - Eds.), p. 145-170. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2007.
- 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, 1994.
- 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/ArrozIrigadoBrasil/referecias.htm>>. Acesso em: 20 maio 2013.
- EPAGRI. **Sistema de produção de arroz irrigado em Santa Catarina (pré-germinado)**. 3 ed. rev. e atual. Florianópolis, 2010.
- FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Response of lowland rice and common bean grown in rotation to soil fertility levels on an area soil. **Fertilizer Research**, v. 45, p. 13-20, 1996.
- FAGERIA, N. K.; SANTOS, A. B. Resposta do arroz irrigado à adubação verde e química no Estado de Tocantins. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 4, p. 387-392, 2007.

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. **Agricultural production**: Primary crops. Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em: 22 de maio de 2013.

FERREIRA, J. S et al. Seleção de veículos para p reparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Revista Agronomia**. Seropédica. v. 37, n. 2, p. 6-12, 2003.

FERREIRA, J. S; BALDANI, J. I; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes á base de turfa contend bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá. v. 32. n. 1. p. 179-189, 2010.

FREITAS, J. G.; AZZINI, L. E.; CANTARELLA, H.; BASTOS, C. R.; CASTRO, L.H. S. M.; GALLO, P. B.; FELÍCIO, J. C. Resposta de cultivares de arroz irrigado ao nitrogênio. **Scientia Agrícola, Piracicaba**, v. 58, n. 3, p. 573-579, 2001.

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.; SABINO, D. C. C.; FERREIRA, J. S. et al. Efeito da inoculação de estirpes de *Burkholderiaspp* em 3 cultivares de arroz inundado crescidas em condições gnobióticas. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, Reunião Brasileira sobre Micorrizas, **Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 2000**. Santa Maria: UFSM, p. 146., 2000.

GUIMARÃES, V. F., JUNIOR, A. S. P, OFFEMANN, L. C., RODRIGUES, F. O. S., KLEIN, J., INAGAKI, A. M., POZZEBOM, W., DIAMANTES, M. S., BULEGON, L. G., BELLÉ, R. F., COSTA, A. C. P. R. Componentes de Produção e Produtividade do Híbrido de Milho 30F53H Inoculado com as Estirpes Ab-V5 e Ab-V6 da Bactéria *Azospirillum brasilense*. In: XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2012, Águas de Lindóia. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2012. p. 1542-1547.

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

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

HOLZSCHUH, M. J. et al. Resposta do arroz irrigado ao suprimento de amônio e nitrato. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. 2009, v. 33, n. 5, p. 1323-1331.

HUMPHREYS, E.; MUIRHEAD, W. A.; MELHUIISH, F. M. Effects of time of urea application on combine-sown Calrose rice in South-east Australia. II. Mineral nitrogen transformations in the soil-water system. **Australian Journal of Agriculture Research, Melbourne**, v. 38, n. 1, p. 113-127, 1987.

HUNGRIA, M.; CAMPOS, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1 e 2, p. 413-425, 2010.

JHA, B.; THAKUR, M. C.; GONTIA, I.; ALBRECHT, V.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 45, n. 1, p. 62-72, 2009.

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. **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.

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

LANA, M. do C.; DARTORA, J.; Marini, D.; Hann, J. E. H. Inoculation with Azospirillum, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, p. 399-405, 2012.

LEMOS, J. M et al. Inoculação de Azospirillum brasiliense em cultivares de trigo. **Revista Jabotical**, v. 41, n. 2, p. 189-198, 2013.

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

LOPES, R. A. et al. Doses, fontes e épocas de aplicação de nitrogênio em arroz de terras altas cultivado em sistema de semeadura direta. **Revista Caatinga**, Mossoró. v. 26, n. 4, p. 79-87, out./dez. 2013.

MALIK, K. A.; MIRZA, M. S.; HASSAN, U.; MEHNAZ, S.; RASUL, G.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P. The role of plant-associated beneficial bacteria in rice-wheat cropping system. In: KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A.T. M. A. (Eds.). **Biofertilisers in Action**. Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra, 2002, p. 73-83.

MARIN, V. A. et al. Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. **Obtido via base de dados da Embrapa Agrobiologia**, Seropédica, RJ. 1999. Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes>>. Acesso em: 25 de maio 2013.

MONTEIRO, R. A.; SCHMIDT, M. A.; BAURA, V. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; YATES, M. G.; RANDI, M. A. F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum* 142 seropedicae (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genet. Mol. Biol.** v. 31, n. 4, p. 932-937, 2008.

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.

NETO, F. J. D; YOSHIMI, F. K.; GARCIA, R. D.; MIYAMOTO, Y. R.; DOMINGUES, M. C. S. Desenvolvimento e produtividade do milho verde safrinha em resposta à aplicação foliar com *Azospirillum* brasiliense. **Enciclopédia Biosfera**, v. 34, n. 17; p. 1030, 2013.

NUNES, R. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento vegetal em arroz irrigado**. 2013. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia, área de concentração em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.

OLIVEIRA, O. C. **Quantificação da Fixação Biológica de Nitrogênio em Arroz (*Oryza sativa*, L.) Inundado**. 1994. 154 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ, 1994.

PEDRINHO, E. A. N. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**. 2010, v. 69, n. 4, p. 905-911. ISSN 0006-8705.

PENG, G.; ZHANG, W.; LUO, H.; XIE, H.; LAI, W.; TAN, Z. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild Rice species *Oryza latifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, p. 1650-1655, 2009.

PEOPLES, M. B; CRASWELL, E. T; Biological nitrogen fixation: Investments, expectations end actual contrubitions to agriculture. **Plant and Soil**. v. 141, p. 13-39.

PEREIRA, J. A. R.; BALDANI, J. I. Selection of *Azospirillum* spp.. and *Herbaspirillum seropedicae* strains to inoculate rice and maize plants. In: **International symposium on sustainable agriculture for the tropics: the role biological nitrogen fixation**. Angra dos reis, RJ, Brazil, 1995. p. 220-221.

PERIN, L.; SILVA, M. F.; FERREIRA, J. S.; CANUTO, E. L.; MEDEIROS, A. F. A.; OLIVARES, F. L.; REIS, V. M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia (UFRRJ)**, Seropédica, v. 37, n. 2, p. 47-53, 2003.

PIFFERO, G. P. **A cultura do arroz: sistemas de plantio**. Disponível em: <<http://www.webrural.com.br/webrural/artigos/lavouras/arroz/arroz2.htm>>. Acesso em: 11 de maio de 2013.

PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F. L.; PITARD, R. M.; URQUIAGA, S. C.; AKIBA, F.; DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grasses leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**. Dordrecht, v. 137, n. 1, p. 61-65, 1991.

RAMOS, A. S.; SANTOS, T. M. C.; SANTANA, T. M.; GUEDES, E. L. F.; MONTALDO, Y. C. Ação do *Azospirillum lipoferum* no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Verde**. v. 5, n. 4, p. 113-117, 2010.

RAO, A. C. S.; SMITH, J. L.; PARR, J. F.; PAPENDICK, R. I. Considerations in estimating nitrogen recovery efficiency by the difference and isotopic dilution methods. **Fertilizer Research**, v. 33, p. 209-217, 1992.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, p. 985-994, 2000.

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**, v. 41, n. 2, p. 275-284, 2006.

ROGER, P.; LADHA, J. K. Biological N₂ fixation in wetland rice fields: Estimation and contribution to nitrogen balance. **Plant and Soil**, v. 141, p. 41-55, 1992.

RUCATTI, E. G. **Sabores e saberes do Arroz**. 2007. Disponível em: <http://www.sindarrozsc.com.br/default.php?pg=conteudo_2010&area=Cultivo>. Acesso em: 11 de maio de 2013.

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.

SANGOI, L. et al. Desempenho agrônômico do milho em razão do tratamento de sementes com *Azospirillum* SP. e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. 2015, v. 39, n. 4, p. 1141-1150.

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**, v. 64, n. 10, p. 3860-3868, 1998.

SILVA, D. M. et al. Bactérias Diazotróficas em Solo Cultivado com Arroz Irrigado (*Oryza sativa* L.). **Revista Brasileira Agrociência**, v. 10, n. 4, p. 467-474, out/dez. 2004.

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.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 719p.

TERRES, A. L. S.; FAGUNDES, P. R. R.; MACHADO, M. O.; MAGALHÃES J. R., A. M.; NUNE, D. D. M. **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.

TRAN VAN, V. et al. Repeated beneficial effects of rice inoculation with strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acids soils of Vietnam. **Plant and Soil**, v. 218, n. 2, p. 273-284, 2000.

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

VIEIRA, N. R. A. A cultura de arroz no Brasil. **Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão**, 1999.

VOHARA, A.; SATYANARAYANA, T. Pitases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 23, n. 1, p. 29-60, 2003.

XXIX REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Sociedade Sul Brasileira de Arroz Irrigado. Itajaí, SC: SOSBAI, 2012. 179 p.

XXVIII REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Sociedade Sul Brasileira de Arroz Irrigado. Bento Gonçalves, RS: SOSBAI, 2010. 188 p.

ANEXOS

Anexo A – Meios de Cultivo utilizados

Meio de cultura NFb

Ácido málico	5 g
K ₂ HPO ₄sol. 10%	5 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O ...sol. 10%	2 mL
NaClsol. 10%	1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ Osol. 1%	2 mL
FeEDTAsol. 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 semi-sólido e sólido respectivamente.

- **Meio de cultura JNFb**

Ácido Málico	5 g
K ₂ HPO ₄ sol.10%.....	6 mL
KH ₂ PO ₄sol. 10%	18 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O....sol. 10%	2 mL
NaCl..... sol. 10%	1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O..... sol. 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.....sol. 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 semi-sólido e sólido respectivamente. Ao meio sólido adicionar 20mg de extrato de levedura.

- **Meio de cultura DYGS**

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**

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 1.000 mL com água destilada e colocar o Agar por último, antes da esterilização.

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
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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 sol. 10% 1,0 mL
 MgSO_4 sol. 10% 0,5 mL
 NaCl sol. 10%0,2 mL
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sol. 1% 0,5 mL
 FeEDTA sol. 1,64% 1,0 mL
 Sol. de micronutrientes para meio de cultura0,5 mL

Ajustar o pH para 6,5 com sol. de ácido sulfúrico 5%.
 Completar com água destilada para 1000 mL.