

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM
CULTIVARES DE ARROZ IRRIGADO**

TESE DE DOUTORADO

Anelise Vicentini Kuss

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO POR BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS EM CULTIVARES DE ARROZ IRRIGADO**

por

Anelise Vicentini Kuss

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência do Solo

Orientador: Prof. Dr. Thomé Lovato

Santa Maria, RS, Brasil

2006

Kuss, Anelise Vicentini, 1963-

K97f

Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado / por Anelise Vicentini Kuss ; orientador Thomé Lovato. - Santa Maria, 2006.

109 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, RS, 2006.

1. Ciência do solo 2. Arroz irrigado 3. Auxinas
4. Diazotróficos 5. Endofíticos 6. Fixação biológica de nitrogênio 7. Inoculante I. Lovato, Thomé, orient. II. Título

CDU: 631.46

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

© 2006

Todos os direitos autorais reservados a Anelise Vicentini Kuss. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua João Atílio Zampieri, 748, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, 97105-490 Fone (0xx) 55 8402 6897; Endereço eletrônico: anevk@mail.ufsm.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM
CULTIVARES DE ARROZ IRRIGADO**

elaborada por
Anelise Vicentini Kuss

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência do Solo

COMISSÃO EXAMINADORA:

Thomé Lovato, Dr.
(Presidente/Orientador)

Flávio Anastácio de Oliveira Camargo, Dr. (UFGRS)

Afrânio Almir Righes (UNIFRA)

Maristela Lovato Flôres, Dra. (UFSM)

Zaida Inês Antonioli, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 15 de dezembro de 2006

O temor do Senhor é o princípio da sabedoria,
mas os loucos desprezam a sabedoria e o ensino.

Provérbios 1:7

À minha família, que me
incentivou a andar no caminho da ciência,
que investiu a cada dia em auxiliar-me e
que, apesar das dificuldades, se mantém
unida e feliz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Senhor, em quem confio integralmente, pela orientação nas decisões, pelo sustento na dificuldade e por atender minhas orações na hora exata.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thomé Lovato, por mostrar os caminhos, propiciar soluções e mostrar a importância da pesquisa para a sociedade.

Ao Prof. Dr. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo, por sua importante colaboração na definição da pesquisa realizada e por disponibilizar o Laboratório de Análise de Solos da UFRGS e sua bolsistas Patrícia Dörr de Quadros e Clarissa Bergamaschi para treinamento das técnicas de avaliação *in vitro* de bactérias diazotróficas.

Ao Prof. Dr. Flávio L. F. Eltz pela disponibilidade para tirar dúvidas e auxiliar a resolver problemas relacionados ao experimento de campo.

À Prof^a Dr^a Maristela Lovato Flôres, pelo incentivo e auxílio na resolução de problemas e por ter acreditado no meu trabalho e potencial, disponibilizando o Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA) para realização dos experimentos e análises.

A Prof^a Dr^a Zaida Inês Antonioli, por iniciar-me nesta desafiante área de trabalho, e que, apesar das dificuldades, abriu-me uma nova etapa em minha vida profissional, e ensinou-me a ver sob diferentes formas a realidade.

Aos integrantes do LCDPA pela paciência em dividir o espaço do laboratório.

Aos integrantes do Laboratório de Manejo e Conservação de Água e Solos pela disponibilidade em auxiliar e sanar dúvidas durante as atividades de análise de nitrogênio das amostras, em especial ao Ricardo Dellamea e Gustavo Bellé.

A Prof^a Dr^a Vera Lúcia Divan Baldani, da EMBRAPA – Agrobiologia, Seropédica, RJ, pelo impulso inicial ao trabalho realizado e a agradável acolhida quando estive em sua casa.

Ao Prof. Dr. Enio Marchezan por ter cedido a área para o experimento de campo, bem como os equipamentos necessários para preparo do solo e semeadura.

Ao Gabriel Adolfo Garcia, pelo auxílio durante o acompanhamento do experimento de campo. Aos trabalhadores desconhecidos, que no dia da colheita do arroz, nos forneceram água gelada no momento mais crítico de trabalho.

A Rosângela Eltz, funcionária do Laboratório de Patologias Aviárias, pelo valioso auxílio nos trabalhos de laboratório e pelos momentos de descontração.

À Vivian Vicentini Kuss, bolsista FAPERGS, pelo trabalho incansável, pelas horas de troca de idéias e pela disposição de trabalho a qualquer hora.

À Elikeli Krevin Holz, estagiária voluntária, pela disposição para o trabalho e pelas conversas divertidas nos momentos de folga.

A Andréa Hentz de Mello e Jaqueline Golombieski, colegas de Pós-Graduação, que se tornaram grandes amigas, com quem dividi muitas vezes as alegrias e tristezas tanto da formação profissional quanto da vida pessoal.

Ao meu esposo Valdir Egon Kuss e filho Christian Vicentini Kuss, pelo trabalho de cuidar da lavoura de arroz, muitas vezes sob um sol escaldante.

Ao Lázaro N. Magalhães e Bruno da Volta, amigos da família, pelo auxílio nas coletas e colheita do arroz.

À Daiana Landemberger pelo auxílio nas horas de excesso de trabalho.

Ao secretário do PPGCS, Tarcísio Uberti por estar sempre disposto a resolver os entraves burocráticos .

À minha mãe Irinea Margarida Roth e minha tia Noemia Ruzena Roth pelo suporte financeiro e emocional durante o período de estudos, e minha irmã Mariana Vicentini Pavan, pelo incentivo e conversas científicas.

A minha família, Valdir, Vivian e Christian, que acima de tudo, acreditaram, tiveram paciência e investiram na minha formação como profissional.

À CAPES, pela bolsa de estudos, que permitiu-me o privilégio de dedicar-me integralmente à pesquisa que agora concluo e marca o início de nova etapa em minha vida.

À FAPERGS, pela bolsa de iniciação científica concedida ao longo do trabalho, que tanto auxiliou nas atividades.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM CULTIVARES DE ARROZ IRRIGADO

AUTORA: ANELISE VICENTINI KUSS

ORIENTADOR: PROF. DR. THOMÉ LOVATO

Santa Maria, 15 de dezembro de 2006.

O arroz é uma cultura importante no sul do Brasil, com produtividade de 6 t.ha⁻¹, demandando grandes quantidades de nitrogênio. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) já está estabelecida entre leguminosas, e entre as gramíneas, microrganismos dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia* apresentam potencial para FBN e produção de substâncias promotoras de crescimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da inoculação de bactérias diazotróficas sobre o desempenho do arroz em campo. Foram quantificadas e isoladas bactérias diazotróficas de nove cultivares de arroz irrigado do Estado do Rio Grande do Sul. Utilizando os meios NFb (*Azospirillum brasilense/lipoferum*), JNFb (*Herbaspirillum*), JMV (*Burkholderia*), LGI (*Azospirillum amazonense*) e LGI-P (*Gluconacetobacter*), foram obtidos 58 isolados. Destes, 10 isolados obtidos em meio NFb (I-02, I-08, I-14, I-20, I-26, I-31, I-36, I-42, I-48 e I-54) e *A. brasilense* e *A. lipoferum* foram avaliados “*in vitro*” quanto à sua capacidade de FBN e produção de ácido indolacético. Quanto a FBN, *A. brasilense* e *A. lipoferum* apresentaram maiores valores (41,08 e 46,82 µg N mL⁻¹, respectivamente) em relação a todos os isolados avaliados. Para produção de ácido indolacético, o isolado I-31 foi o maior produtor (13,47 µg mL⁻¹). No experimento em câmara de crescimento utilizaram-se *A. brasilense* e *A. lipoferum*, os isolados I-14, I-31 e I-54 e as cultivares de arroz IRGA-417, IRGA-419 e BR-IRGA-420. Em solução nutritiva *A. lipoferum* e o isolado I-54 associados ao arroz BR-IRGA-420 foram os maiores produtores de massa seca (13,11 e 13,22 mg planta⁻¹, respectivamente) e em solo os maiores valores foram para *A. brasilense* (20,40 mg planta⁻¹) e o isolado I-31 (16,00 mg planta⁻¹). No campo foram avaliadas as populações de bactérias diazotróficas e os indicadores de crescimento do arroz, como altura, massa fresca e seca, comprimento e peso radiculares, N-total da parte aérea e rendimento em grãos. As coletas realizaram-se aos 40, 90 e 120 dias após a semeadura (DAS). Foram utilizadas doses de N de 0, 60 e 120 kg ha⁻¹ e inoculantes contendo *Azospirillum brasilense* ou isolado I-31. Aos 135 DAS procedeu-se à colheita. A população de bactérias diazotróficas endofíticas nos diferentes estágios do arroz foi obtida em meios de cultivos específicos, revelando grande número nas raízes. Verificou-se um incremento no rendimento em grãos do arroz de 26,91% quando inoculado com *A. brasilense* e 17,78% quando inoculado com I-31, ambos sem utilização de adubo nitrogenado. Na dose de N recomendada para o arroz, de 120 kg ha⁻¹, o rendimento do arroz inoculado com *A. brasilense* aumentou 12,84% e o isolado I-31 aumentou 31,85% sobre o tratamento sem inoculação e sem adubação nitrogenada. Os dados obtidos permitem concluir que existem possibilidades de se utilizar bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de cultivares da região e avaliadas *in vitro* como microrganismos para inoculantes, permitindo a redução dos custos de adubação nitrogenada e a manutenção da produção de arroz.

Palavras-chave: arroz, auxinas, diazotróficos, endofíticos, fixação biológica de nitrogênio, inoculante.

ABSTRACT

Thesis of Doctor

Post-Graduate Course in Soil Science
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

INITROGEN FIXATION BY DIAZOTROPHIC BACTERIA IN FLOODED RICE CULTIVARS

AUTHOR: ANELISE VICENTINI KUSS

ADVISER: PROF. DR. THOMÉ LOVATO

Santa Maria, December 15th, 2006.

Rice is a very important culture in the South of Brazil, with productivity mean of 6 t ha⁻¹, requiring large amounts of nitrogen. The biological nitrogen fixation (BNF) has already been established for legumes and in gramineous plants, microorganisms of the genus *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* and *Burkholderia* have potential to BNF and growth-promoting substances production. The aim of this work was to evaluate the influence of inoculation with diazotrophic bacteria above the performance of rice in the field. Diazotrophic bacteria were measured and isolated of nine rice cultivars in Rio Grande do Sul State. Using the Nfb medium (*Azospirillum brasilense/lipoferum*), JNFb (*Herbaspirillum*), JMV (*Burkholderia*), LGI (*Azospirillum amazonense*) and LGI-P (*Gluconacetobacter*), 58 isolates were obtained. From these, 10 isolates obtained in Nfb medium (I-02, I-08, I-14, I-20, I-26, I-31, I-36, I-42, I-48 e I-54) and *A. brasilense* and *A. lipoferum* were evaluated *in vitro* the N₂-fixing ability and indolacetic acid production. All for BNF, *A. brasilense* and *A. lipoferum* showed greater values (41,08 e 46,82 µg N mL⁻¹, respectively) in relation to all the isolates evaluated (7,20 a 12,99 µg N mL⁻¹). For indolacetic acid production, the I-31 isolate was the greatest producer (13,47 µg mL⁻¹). In experiment of greenhouse *A. brasilense* e *A. lipoferum* were used I-14, I-31, I-54 isolates, and the rice cultivars IRGA-417, IRGA-419 e IRGA-420. In nutritive solution, *A. lipoferum* and I-54 isolate associated with IRGA-420 rice were the major producers of dry mass (13,11 e 13,22 mg plant⁻¹, respectively) and in soil the greater values were for *A. brasilense* (20,40 mg plant⁻¹) and the I-31 isolate (16,00 mg planta⁻¹). In the fields, the populations of diazotrophic bacteria were evaluated and the parameters of rice growth as length, fresh and dry mass, length and weight of roots, total N-content of aerial parts and productivity of grains. The collections were performed on the 40, 90 e 120 day after seedling (DAS). Doses of 0, 60 and 120 kg N ha⁻¹ and inoculant with *Azospirillum brasilense* or I-31 isolate inoculant were used. At the 135 DAS the harvest was proceeded. The population of endophytic bacteria in the different rice-growing stages was obtained in culture medium, revealing great numbers present in the roots. Verified an increase at the yield of rice grains of 26,91% was verified when inoculated with *A. brasilense* and 17,78% when inoculated with I-31, both without the use of the N-fertilizer. In the recommended dose for rice at 120 kg N ha⁻¹, the yield of inoculated rice with *A. brasilense* increased 31,85% over uninoculated control and unfertilizer-N. The data obtained allow to conclude that there is a possibility to use endophytic diazotrophics bacteria isolated from regional cultivars evaluated "in vitro" as microorganisms towards inoculants, permitting the reducing of costs from N-fertilizer and the maintenance of rice productivity.

Key-words: auxin, biological nitrogen fixation, diazotrophic, endophytic, inoculant.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 HIPÓTESES	14
3 OBJETIVOS	15
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM ARROZ IRRIGADO: CARACTERÍSTICAS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	16
4.1 Resumo	16
4.2 Abstract	16
4.3 Introdução	17
4.3.1 Bactérias promotoras de crescimento vegetal.....	18
4.3.2 Mecanismos de ação direta das bactérias promotoras de crescimento vegetal.....	19
4.3.3 Diazotróficos na orizicultura	23
4.3.4 Fisiologia da fixação assimbiótica de nitrogênio atmosférico em gramíneas	26
4.4 Considerações finais	27
4.5 Referências	28
5 FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO <i>in vitro</i> POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS	34
5.1 Resumo	34
5.2 Abstract	35
5.3 Introdução	36
5.4 Material e Métodos	37
5.4.1 Isolamento e contagem de bactérias diazotróficas endofíticas de raiz de arroz..	37
5.4.2 Avaliação da produção de auxinas (ácido indolacético) <i>in vitro</i>	38
5.4.3 Avaliação da FBN <i>in vitro</i>	40
5.4.4 Análise estatística	41

5.5 Resultados e Discussão	41
5.5.1 Bactérias diazotróficas no solo de origem e no interior das raízes de arroz	41
5.5.2 Isolados obtidos a partir das raízes das cultivares	44
5.5.3 Produção de auxinas pelos isolados obtidos em meio NFb (<i>A. brasilense/ A. lipoferum</i>).....	45
5.5.4 Fixação de nitrogênio pelos isolados obtidos em meio NFb	47
5.6 Conclusões	48
5.7 Referências	48
6 INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E DESENVOLVIMENTO DE ARROZ IRRIGADO EM CÂMARA DE CRESCIMENTO	54
6.1 Resumo	54
6.2 Abstract	54
6.3 Introdução	55
6.4 Material e Métodos	56
6.4.1 Experimento em solução nutritiva	58
6.4.2 Experimento em solo	59
6.4.3 Análise estatística	60
6.5 Resultados e Discussão	60
6.5.1 Crescimento de plântulas em solução nutritiva	60
6.5.2 Crescimento de plântulas em solo	64
6.6 Conclusões	71
6.7 Referências	71
7 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM ARROZ IRRIGADO SOB DIFERENTES DOSES DE ADUBO NITROGENADO E INOCULAÇÃO	76
7.1 Resumo	76
7.2 Abstract	77
7.3 Introdução	78
7.4 Material e Métodos	81
7.4.1 Inoculação, preparo das sementes e cuidados culturais	81
7.4.2 Coleta e análise das amostras	82
7.4.3 Delineamento experimental	83

7.5 Resultados e Discussão	83
7.5.1 Número de bactérias presentes nas raízes do arroz irrigado IRGA-420	83
7.5.2 Parâmetros de desenvolvimento e produtividade do arroz irrigado IRGA-420	91
7.6 Conclusões	101
7.7 Referências	101
8 CONCLUSÕES	108
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	109

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento extensamente consumido no planeta, suprimindo mais de 50% da alimentação mundial (GYANESHWAR et al., 2001). Aproximadamente 150 milhões de hectares são utilizados para seu cultivo, e destes, 75% crescem em condições de solos alagados (LIESACK et al., 2000). A demanda de consumo gerada pelo aumento populacional tem levado os pesquisadores a conduzir seus experimentos na busca de contribuições que reduzam o custo de produção do arroz e aumentem a produtividade. No Rio Grande do Sul, segundo estimativas da CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, em uma área de 1.018,10 mil hectares cultivados na safra de 2005/2006, foram colhidas 6.431.300 toneladas de arroz, com produtividade média de 6.317 kg ha⁻¹. No entanto, há potencial para produção de até 10 t ha⁻¹, sendo a pesquisa fator fundamental para o aumento de produtividade e da redução de custos de produção (LOPES, 2005).

Dentre as várias formas de aumentar a produção vegetal, destaca-se a importância do suprimento de nitrogênio, elemento importante na síntese de proteínas e enzimas que garantem a vida do vegetal. Os processos que se constituem fontes capazes de fornecer grandes quantidades de nitrogênio às plantas são a decomposição da matéria orgânica do solo, a utilização de fertilizantes nitrogenados e a fixação biológica de N₂ da atmosfera (CARVALHO, 2002). Paralelamente ao aumento da produção gerado pela larga aplicação de adubos nitrogenados de origem fóssil, verificam-se problemas de contaminação ambiental, pois a lixiviação contamina severamente solos e águas superficiais (SMIL, 1997). Essa contaminação causa eutrofização de lagoas e a acidificação de solos cultiváveis, que por sua vez, provoca aumento das perdas de oligonutrientes e a liberação de metais pesados do solo para os sistemas aquíferos. Nesse contexto, a utilização de organismos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico se apresenta como uma alternativa natural para fornecer o nitrogênio requerido pelos vegetais. Entre os organismos fixadores de nitrogênio atmosférico, denominados diazotróficos, encontram-se cianobactérias, arqueobactérias, bactérias Gram-positivas, enterobactérias e proteobactérias (ROMERO et al., 1998).

A interação de bactérias diazotróficas com diversas culturas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao seu potencial biotecnológico, evidenciado no aumento da produtividade das culturas, possibilidade de redução dos custos de produção ao diminuir o volume de adubos nitrogenados que são aplicados e, conseqüentemente, melhor conservação dos recursos ambientais. As contribuições na fixação biológica de nitrogênio foram

verificadas inicialmente em leguminosas, mas plantas da família *Graminae* utilizadas em diversos experimentos têm apresentado potencial significativo, respondendo com aumento na produção quando inoculadas com bactérias diazotróficas (BALDANI et al., 2002, PENG et al., 2002, ELBELTAGY et al., 2001).

Este trabalho foi dividido em três capítulos. O primeiro se refere ao processo de quantificação e isolamento de bactérias diazotróficas presentes em raízes de diversas cultivares de arroz e posterior avaliação da capacidade de FBN e produção de ácido indolacético, com seleção dos isolados mais promissores para aplicação como inoculante em experimentos. O segundo capítulo se refere ao crescimento de cultivares de arroz inoculadas com os isolados mais promissores obtidos “*in vitro*”, cultivadas em câmara de crescimento, dispostas em dois experimentos: plântulas de arroz cultivadas em solução nutritiva e plântulas de arroz cultivadas em solo. O terceiro capítulo se refere ao experimento em campo, observando-se o comportamento populacional das bactérias diazotróficas e o desempenho agrônômico do arroz irrigado frente aos tratamentos de inoculação e diferentes doses de nitrogênio aplicadas, avaliando-se o efeito benéfico ou não da inoculação por com bactérias diazotróficas na produtividade do arroz irrigado.

2 HIPÓTESES

- A inoculação de bactérias diazotróficas em arroz inundado produz aumento do conteúdo de nitrogênio da planta em decorrência de maior fixação biológica de nitrogênio realizada.
- A inoculação de bactérias diazotróficas em arroz inundado permite manter alta produtividade vegetal, reduzindo a dose de adubo nitrogenado a ser aplicada.
- Bactérias do gênero *Azospirillum* podem favorecer o crescimento de plantas de arroz inundado através da fixação biológica de nitrogênio e produção de substâncias promotoras de crescimento (auxinas).
- Bactérias isoladas de plantas de arroz, que, quando avaliadas “*in vitro*” quanto à sua capacidade de produção de substâncias promotoras de crescimento e fixação biológica de nitrogênio, apresentarem bom desempenho, também o farão em condições de campo.

3 OBJETIVOS

Geral

Verificar o potencial de aplicação biotecnológica de bactérias diazotróficas sobre o rendimento do arroz irrigado, selecionadas *in vitro* quanto a sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e síntese de substâncias promotoras de crescimento vegetal e posteriormente aplicadas como inoculante para sementes cultivadas em campo.

Específicos

- Avaliar *in vitro* a capacidade de fixação biológica de nitrogênio e produção de auxinas por bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de cultivares utilizadas de arroz irrigado no Estado do Rio Grande do Sul.

- Testar a eficiência na fixação de N₂ de bactérias do gênero *Azospirillum* em variedades de arroz irrigado utilizadas no Estado do Rio Grande do Sul.

- Quantificar as bactérias diazotróficas presentes na raiz das plantas inoculadas e crescidas sob diferentes concentrações de nitrogênio.

- Avaliar a influência dos microrganismos diazotróficos inoculados sobre o desenvolvimento e produtividade de plantas de arroz.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM ARROZ IRRIGADO: CARACTERÍSTICAS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

DIAZOTROPHIC BACTERIA IN FLOODED RICE: CHARACTERISTIC AND BIOTECHNOLOGIC POTENTIAL

4.1 RESUMO

Nesta revisão são abordadas características das bactérias diazotróficas (fixadoras de nitrogênio) e sua forma de atuação como microrganismos rizosféricos ou endofíticos. A capacidade de transformar N_2 atmosférico em amônia, que inicialmente impulsionou a pesquisa, converteu-se em apenas uma das potencialidades verificadas nestes organismos. As bactérias diazotróficas produzem diversas substâncias promotoras de crescimento vegetal, como fitormônios, enzimas solubilizadoras de minerais e antibióticos. Algumas espécies são capazes de associar-se às raízes de arroz irrigado, apresentando efeitos benéficos sobre o crescimento vegetal. Devido a grande quantidade de dados obtidos até o presente, as bactérias apresentam potencial para uso como biofertilizantes e podem gerar bioprodutos que favoreçam uma agricultura sustentável e um ambiente mais limpo quanto a redução do uso de fertilizantes nitrogenados.

Palavras chave: arroz, biofertilizantes, diazotróficas, fitormônios, nitrogênio.

4.2 ABSTRACT

This review summarizes and discusses the diazotrophs bacteria (nitrogen fixing) and their modes of action as rhizospheric and endophytic microorganisms. Their ability to transform atmospheric N_2 into ammonia, first motivated research and was converted into only one of these organisms potentialities. The diazotrophic bacteria produced variety of compounds that stimulated plant growth, as phytohormones, minerals solubilizing enzymes and antibiotics.

Some species may grown in, on, or, arounds root rice, showing positive effects on plant growth. Due to the great amount data obtained to far, the potential of selected diazotrophs can be promising as biofertilizers and can generate bioproducts to make a significant impact on sustainable and cleaner agriculture environment concerning the reduction of the use of nitrogen fertilizers.

Key words: Biofertilization; diazotrophic; endophytic; nitrogen; phytohormones; rice.

4.3 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento extensamente consumido no planeta, representando mais de 50% da alimentação mundial (GYANESHWAR et al., 2001). Aproximadamente 150 milhões de hectares são utilizados para seu cultivo, e destes, 75% crescem em condições de solos alagados (LIESACK et al., 2000). A demanda de consumo gerada pelo aumento populacional tem levado os pesquisadores a conduzir seus experimentos na busca de contribuições que produzam menor impacto ambiental e aumento no rendimento do arroz irrigado, de forma a reduzir seu custo de produção e aumentar a produtividade. No Rio Grande do Sul, segundo dados da CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, em uma área de 1.018.100 hectares cultivados na safra de 2005/2006, foram produzidas 6.729.600 toneladas de arroz, com uma produtividade média de 6.610 kg ha⁻¹. No entanto, há potencial para produção de até 10 t ha⁻¹, sendo a pesquisa um fator fundamental para o aumento de produtividade e da redução dos custos de produção (LOPES, 2005).

Dentre as várias formas de incrementar a produção vegetal, destaca-se a importância do suprimento de nitrogênio, elemento importante na síntese de proteínas e enzimas que garantem a vida do vegetal. 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 N₂ da atmosfera (CARVALHO, 2002). Paralelamente ao aumento da produção gerado pela larga aplicação de adubos nitrogenados de origem fóssil, verificam-se problemas de contaminação ambiental, pois a lixiviação contamina severamente solos e águas superficiais. Essa contaminação por nitrogênio causa eutrofização de lagoas e a acidificação de solos cultiváveis, que por sua vez, ocasiona aumento das perdas de oligonutrientes e a liberação de metais pesados do solo para

os sistemas aquíferos (SMIL, 1997). Nesse contexto, a utilização de organismos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico se apresenta como uma alternativa natural para fornecer o nitrogênio requerido pelos vegetais. Entre os organismos fixadores de nitrogênio atmosférico, denominados diazotróficos, encontram-se cianobactérias, arqueobactérias, bactérias Gram-positivas, enterobactérias e proteobactérias (ROMERO et al., 1998).

A interação de bactérias diazotróficas com diversas culturas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao potencial biotecnológico evidenciado no aumento da produtividade das culturas, possibilidade de redução dos custos de produção ao diminuir o volume de adubos nitrogenados, e conseqüentemente, melhor conservação dos recursos ambientais. A atuação das bactérias diazotróficas quanto a fixação biológica de nitrogênio verificou-se inicialmente entre as plantas leguminosas, mas experimentos recentes têm demonstrado que plantas da família *Graminae* apresentam potencial significativo, respondendo com aumento na produção quando inoculadas com bactérias diazotróficas (BALDANI et al., 2002; PENG et al., 2002; ELBELTAGY et al., 2001).

4.3.1 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

Rizosfera é a zona do solo ao redor da raiz que se encontra sob influência imediata do sistema radicular. Essa zona é rica em nutrientes, devido ao acúmulo de uma variedade de compostos orgânicos liberados pelas raízes por exsudação, secreção e deposição. O crescimento e atividade microbianos são intensos na rizosfera, porque os compostos orgânicos liberados pelas raízes podem ser utilizados como fonte de energia e carbono. Bactérias que se associam às plantas, colonizando suas raízes, são denominadas rizobactérias, e podem ser classificadas de acordo com seus efeitos sobre o crescimento vegetal: benéficas, deletérias ou neutras (DOBBELAERE et al., 2003). Quando benéficas, as bactérias colonizam o sistema radicular e promovem o crescimento vegetal, sendo denominadas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal – plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). Bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* spp. são consideradas PGPR, devido à sua capacidade de estimular o crescimento das plantas pela produção de fitormônios, redução do potencial de membrana das raízes, síntese de enzimas, solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico. Indiretamente, promovem o crescimento vegetal reduzindo ou prevenindo a ação de microrganismos patogênicos, devido à produção de antibióticos ou sideróforos (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999).

Entre as rizobactérias existe um gradiente de proximidade e intimidade com a raiz: bactérias vivendo no solo ao redor das raízes (utilizando metabólitos liberados pelas raízes como fontes de C e N), bactérias colonizando o rizoplane (superfície da raiz), bactérias residindo no tecido radicular e bactérias vivendo no interior das células em estruturas radiculares especializadas (nódulos, como é o caso da interação rizóbio-leguminosas). Rizobactérias que se instalam no interior das raízes das plantas, formando associações, são endofíticas. Mas o conceito se estende ainda para bactérias que podem ser isoladas de plantas cujos tecidos foram desinfectados superficialmente ou extraídas do interior das plantas, e que não causam prejuízo visível nas plantas (GRAY & SMITH, 2005).

4.3.2 Mecanismos de ação direta das bactérias promotoras de crescimento vegetal

As PGPR podem afetar o crescimento das plantas de forma direta ou indireta. Promoção direta envolve a produção de compostos para nutrir as plantas ou facilitar a entrada de certos nutrientes do ambiente para as plantas. Os mecanismos de ação direta incluem:

a) Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

É o processo de conversão de N_2 , um gás inerte presente em grande quantidade na atmosfera, praticamente inesgotável, em NH_3 , o qual é mediado principalmente por bactérias. Esse processo fornece compostos nitrogenados diretamente para as plantas por meio de associações, ou quando os organismos morrem e os liberam no ambiente, fornecendo o nitrogênio necessário para o desenvolvimento vegetal (LINDERMANN & GLOVER, 2003).

A revolução verde dos anos sessenta trouxe um notável incremento na produção agrícola devido ao emprego generalizado de adubos químicos e sementes melhoradas. Quanto aos adubos nitrogenados, seu uso indiscriminado tem ocasionado vários problemas de contaminação, pois uma parte alcança depósitos e cursos d'água (ROMERO et al., 1998). A FBN é uma opção alternativa e natural de adubação nitrogenada. Microrganismos presentes nos oceanos e nas plantas leguminosas são responsáveis pelo processo de fixação biológica de nitrogênio. No entanto, algumas plantas da família *Graminae* têm apresentado capacidade de FBN significativa. A cultura de arroz, por exemplo, consome atualmente 10 milhões de toneladas de adubos nitrogenados para produzir 500 milhões de toneladas de grãos no planeta. A substituição de 25% da demanda de N_2 pela fixação biológica geraria uma economia de, aproximadamente, 380 milhões de dólares/ano (custo médio da tonelada de uréia US\$ 150,00) (BALDANI et al., 2002).

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico poderá ser de grande importância em solos alagados para cultivo de arroz. Em áreas onde não são utilizados fertilizantes químicos, há dependência da fixação biológica de N_2 , que parece prover um importante suprimento de nitrogênio a cada ano (REDDY & PATRICK, 1979). Em sistemas de cultivo intensivo, como na Ásia, que produzem 70% do arroz consumido no planeta, considera-se a disponibilidade de N como o principal fator limitante para atingir o potencial de rendimento das culturas. Conseqüentemente, grandes quantidades de N mineral são utilizadas como adubos, e destes, 50% são perdidos por volatilização em forma de amônia e desnitrificação (KRONZUCKER et al., 1998). O N aplicado na cultura de arroz irrigado se difunde na área inundada, sendo rapidamente absorvido pelas plantas. No entanto, o que não é absorvido rapidamente é perdido pela emissão de gases em forma de óxido nitroso, gerado pela ação de bactérias sobre os nitratos disponíveis (SMIL, 1997; KIRK, 2001).

b) Síntese de sideróforos

Ferro é um nutriente essencial para as plantas, mas relativamente insolúvel na solução solo. As plantas preferem para absorção formas de ferro reduzidas, como íon Fe^{2+} , mas íons Fe^{3+} são mais comuns no solo. Os sideróforos são moléculas secretadas por microrganismos que sequestram ferro de baixo peso molecular e o disponibilizam para as plantas em forma de complexo sideróforo- Fe^{3+} (WANG et al., 1993). Os sideróforos são sintetizados em resposta à baixa disponibilidade de Fe^{3+} em solução e atuam como promotores de crescimento vegetal porque disponibilizam o ferro absorvido para o crescimento vegetal, além de imobilizar o ferro que estaria disponível para a proliferação de fitopatógenos (VESSEY, 2003).

c) Produção de fitormônios

Recentemente, tem aumentado a evidência de que bactérias diazotróficas apresentam papel importante no desenvolvimento vegetal através da síntese e exportação de fitormônios ou reguladores de crescimento vegetal (Plant Growth Regulators – PGRs). PGRs são substâncias orgânicas que, sob concentrações muito baixas, influenciam processos fisiológicos nas plantas e podem ser:

- Auxinas – a capacidade de sintetizar auxinas é largamente observada em microrganismo do solo e associados a plantas. Estimativas apontam para 80% das bactérias isoladas da rizosfera com capacidade de produzir auxinas reguladoras de crescimento vegetal. A presença de auxinas determina aumento do comprimento da raiz e do número de pêlos e raízes laterais – alterações morfológicas da raiz, sendo conhecido por estimular tanto respostas rápidas (aumento da elongação celular) como respostas lentas (divisão e

diferenciação celular) nas plantas. O mais importante fitormônio produzido por *Azospirillum* é a auxina ácido 3-indolacético (AIA) (DOBBELAERE et al., 2003).

As alterações radiculares detectadas em plantas inoculadas com *Azospirillum* podem explicar a melhor absorção de minerais pela planta. Apesar da grande produção de AIA em culturas puras, não se conhece ainda como ocorre o processo no interior das plantas ou na região rizosférica (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Muitas cepas de *Azospirillum* são encontradas no interior das raízes de *Graminae* e o crescimento verificado nestas pode ser devido à produção e excreção de auxinas (LODEWYCKX et al., 2002).

Experimentos de isolamento de bactérias endofíticas têm revelado grande variabilidade de microrganismos capazes de produzir grandes quantidades de auxinas “*in vitro*” que, quando inoculados em plantas, promovem o aumento do crescimento vegetal em relação aos tratamentos controle (ASGHAR et al., 2002; KHALIQ et al., 2004).

- Citocininas – o isolamento e a quantificação de citocininas em bactérias diazotróficas tem recebido pouca atenção, pois compreendem um grupo de compostos presentes em pequenas quantidades em amostras biológicas, dificultando sua identificação e quantificação. A aplicação exógena de citocinina sobre as plantas apresenta inúmeros efeitos, mas o mais notável é que induz a divisão celular, embora a formação de pêlos radiculares e desenvolvimento da raiz também são citados. Tem se verificado em plantas e microrganismos associados a plantas mais de 30 compostos promotores de crescimento do grupo das citocininas. Mais de 90% dos microrganismos encontrados na rizosfera são capazes de liberar citocinina quando cultivadas “*in vitro*”. As citocininas se movem das raízes para os caules e raízes expostas a citocininas podem afetar o crescimento e desenvolvimento vegetal (DOBBELAERE et al., 2003).

- Giberelinas – têm surgido várias publicações sobre a produção de giberelinas por bactérias diazotróficas. Mais de 89 giberelinas (GA – ácido giberélico) são conhecidas e numeradas de GA₁ até GA₈₉, na ordem em que foram descobertas (ARSHAD & FRANKENBERGER, 1998). A giberelina mais conhecida é a GA₃ e a mais ativa em plantas é a GA₁, que é responsável pelo alongamento do caule. Muitas observações sugerem que as giberelinas podem ser produzidas por microrganismos, induzindo ou promovendo o crescimento de plantas hospedeiras. *Azospirillum* spp. apresentam um importante papel nos primeiros estágios de crescimento em gramíneas devido às giberelinas que produzem. A habilidade de *Azospirillum* em reduzir os efeitos de déficit de água em sementes de cereais sob estresse osmótico ou salino também são atribuídos à sua capacidade de produzir giberelinas (CREUS et al., 2004).

- Etileno – a resposta das plantas a diferentes formas de estresse, inclusive infecções fitopatogênicas, envolve a produção endógena de etileno. Quando as células vegetais percebem as moléculas de etileno, desencadeiam processos de resposta ao estresse, levando à senescência as células próximas ao sítio de produção de etileno, pois embora seja considerada molécula mensageira secundária, estimula a senescência, a abscisão de frutos ou folhas, o desenvolvimento de doenças, a inibição do crescimento, a síntese de enzimas (quitinase) e antibióticos. Muitas bactérias promotoras de crescimento produzem a enzima 1 – aminociclopropano-1-ácido carboxílico desaminase (ACC desaminase). Supõe-se que essa enzima, sem função conhecida na bactéria, pode ser parte de um mecanismo para estimular o crescimento vegetal, garantindo que o aumento dos níveis de etileno sejam menores em plantas em desenvolvimento ou estressadas (LODEWYCHX et al., 2002; LUGTENBERG et al., 2002).

d) Solubilização de fósforo

Depois do nitrogênio, o fósforo é o segundo mineral limitante do crescimento vegetal. No solo há grandes reservas de P em formas insolúveis, que não podem ser utilizadas pelas plantas. Entre as bactérias presentes na rizosfera, algumas são capazes de secretar ácidos orgânicos e fosfatases que facilitam a conversão das formas insolúveis de P em formas disponíveis para as mesmas, disponibilizando o nutriente para as plantas hospedeiras (KIM et al., 1998).

Diferentes espécies de bactérias foram identificadas como capazes de solubilizar compostos fosfatados inorgânicos, como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*. Existem populações consideráveis deste grupo de bactérias nos solos e na rizosfera vegetal. A solubilização de fósforo está relacionada a fatores ambientais, como níveis nutricionais e interação com outros microrganismos do ambiente (VESSEY, 2003).

O mecanismo mais comum de solubilização de fosfatos minerais consiste na ação dos ácidos orgânicos sintetizados pelas bactérias. A produção de ácidos orgânicos resulta em acidificação da célula microbiana e seu microambiente. Em consequência, o P_i é liberado do mineral pela substituição por Ca^{2+} . O ácido mais frequentemente observado entre os solubilizadores de fosfatos é o ácido glucônico, mas foram observados também ácidos cetoglucônico, láctico, isovalérico, isobutírico, acético, glicólico, malônico e succínico em diferentes espécies de bactérias (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999).

A solubilização de fosfatos orgânicos, também denominada mineralização de fósforo orgânico, ocorre em solos com alto conteúdo de matéria orgânica, que contém compostos com fósforo orgânico. A decomposição da matéria orgânica é realizada por bactérias saprófitas,

que liberam o radical ortofosfato da estrutura de carbono das moléculas. A biodegradação dos fosfatos orgânicos por microrganismos pode ser influenciada por parâmetros ambientais: alcalinidade moderada, por exemplo, favorece a mineralização de fósforo orgânico. A degradabilidade dos compostos orgânicos depende principalmente das propriedades físico-químicas das moléculas. Ácidos nucleicos, fosfolipídios e fosfoglicídios são facilmente degradados, mas ácido fítico, polifosfatos e fosfonatos são decompostos mais lentamente. A mineralização desses compostos é realizada por várias fosfatases (também denominadas fosfohidrolases), que podem ser específicas ou não quanto ao substrato (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999).

4.3.3 Diazotróficos na orizicultura

O interesse por microrganismos do solo tem aumentado devido à sua contribuição na manutenção da fertilidade do solo e, portanto, pelo favorecimento à agricultura sustentável (BALDANI et al., 1997; COCKING, 2003). A procura por bactérias diazotróficas, capazes de converter nitrogênio gasoso da atmosfera em amônia disponível para a planta levou ao isolamento de diferentes bactérias, inclusive simbiotes, como a noduladora de raízes *Rhizobium* spp. (DOBBELAERE et al., 2003). Diferentes bactérias de vida livre que habitam a rizosfera de gramíneas têm sido descritas recentemente, como *Azospirillum* spp., *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* spp. Quando utilizadas como inoculante, apresentam efeitos benéficos ao crescimento vegetal (SELDIN et al., 1998; CURÁ et al., 2005). Outras bactérias, por sua capacidade de colonizar os tecidos internos das plantas e estabelecer estreitas 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). Muitos organismos fixadores de N₂ têm sido isolados do solo da rizosfera, rizoplano e do interior dos tecidos vegetais de *Graminae* e outras famílias com o objetivo de inoculação para redução de custos (DÖBEREINER et al., 1995).

A cultura do arroz irrigado apresenta uma ecologia microbiana especial, como diversidade, estrutura e dinâmica de comunidades. O solo cultivado com arroz irrigado pode ser considerado um sistema com três compartimentos, caracterizados por diferentes condições físico-químicas (LIESACK et al., 2000). Quando o solo é alagado, altera-se a estrutura do solo, e a lâmina d'água reduz as trocas gasosas com a atmosfera. Forma-se, então, uma camada superficial, de poucos milímetros, oxidada (com O₂ dissolvido e compostos oxidados)

e outra abaixo, com concentração de O₂ próxima de zero, caracterizada pela redução. Porém, na rizosfera, embora localizada no interior da camada reduzida, forma-se uma zona oxidada, consequência da liberação de O₂ pela raiz. Portanto, rizosfera e camada superficial da lâmina de água apresentam características de solo oxidado, criando condições de vida para microrganismos aeróbios obrigatórios e facultativos (SOUZA et al., 2000).

As recentes pesquisas com bactérias diazotróficas apontam para o fato de que o arroz forma associações com variadas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio, e que alguns destes microrganismos podem ser responsáveis por suprir as plantas com o nitrogênio necessário ou substâncias promotoras de crescimento para garantir a produção (BODDEY et al., 1995; WATANABE et al., 1979; GYANESHWAR et al., 2001; VERMA et al., 2001; DOBBELAERE et al., 2003).

Estudos com bactérias diazotróficas têm apresentado uma grande variedade de microrganismos, nos mais diversos ecossistemas. Quanto ao metabolismo do carbono, encontram-se heterotróficos, quimioautotróficos, fotoautotróficos e fotoheterotróficos. Também há representantes aeróbios, microaerófilos, anaeróbios facultativos e anaeróbios obrigatórios. Amplamente distribuídos na natureza, podem ser de vida livre ou se encontrar associados com diferentes espécies vegetais. As bactérias diazotróficas dos gêneros *Paenibacillus*, *Beijerinckia*, *Azotobacter* e *Klebsiella* são consideradas rizosféricas, porque são freqüentemente encontradas em solos próximos à raiz, a qual se associam sob determinadas condições, por processos ainda não esclarecidos e que variam conforme a espécie vegetal. Várias espécies de bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de colonizar a raiz dos vegetais. São, por isso, chamadas associativas, como é o caso de *A. brasiliense* (TARRAND et al., 1978), *A. lipoferum* (TARRAND et al., 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983) e *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1991). Outras bactérias diazotróficas, capazes de colonizar o interior da raiz e partes aéreas das plantas, permitem a sobrevivência da planta em solos pobres e promovem benefícios à mesma. São as endofíticas, pertencentes aos gêneros *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Azoarcus* (BALDANI et al., 2002).

As bactérias endofíticas colonizam de diversas formas as plantas, formando relações não-patogênicas com seus hospedeiros. Quando as relações estabelecidas são benéficas, estimulam o crescimento da planta, aumentam a resistência a doenças, melhoram a habilidade da planta de resistir ao estresse ambiental e/ou aumentam a fixação de nitrogênio atmosférico (STURZ & NOWAK, 2000).

Trabalhos conduzidos na última década têm se preocupado em identificar bactérias endofíticas entre as abundantes e variadas populações de muitas plantas, como batata, milho, trigo, sorgo, cana-de-açúcar e arroz, utilizando métodos experimentais, como microscopia eletrônica e biologia molecular (BENT & CHANWAY, 2002).

Estudos publicados reportam a ação das rizobactérias como microrganismos promotores de crescimento, levando a um incremento no rendimento em grãos de 8 a 12%, sob diferentes condições de adubação nitrogenada. Alguns estudos indicam que a promoção do crescimento em plantas de arroz não está diretamente associada à fixação biológica de nitrogênio, mas a outros mecanismos (PENG et al., 2002), como indução de resistência a patógenos, solubilização de nutrientes minerais precipitados, e/ou produção de reguladores vegetais que induzem a formação de pêlos radiculares adicionais ou raízes laterais (BISWAS et al., 2000).

ELBELTAGY et al. (2001), ao isolarem bactérias fixadoras de nitrogênio de espécies de arroz selvagem e modernas, verificaram que as bactérias endofíticas se apresentaram em maior quantidade em caules do que raízes. *Azoarcus* spp. foram encontradas em tecidos aéreos da planta e *Herbaspirillum* spp. colonizaram principalmente os espaços intercelulares de tecidos embrionários da planta.

Quanto aos sistemas de produção agrícola, o sucesso na utilização de bactéria diazotróficas está relacionado à habilidade de selecionar, incorporar e manter populações benéficas no campo. A rotação de culturas e a forma de manejo da lavoura podem influenciar as populações microbianas do solo (SILVA et al., 2004), sendo que se busca o desenvolvimento de sistemas de produção que beneficiem as populações de diazotróficos. Aplicações de protetores vegetais químicos, por sua vez, reduzem a quantidade e a qualidade de populações microbianas específicas (STURZ & NOWAK, 2000).

4.3.4 Fisiologia da fixação assimbiótica de N atmosférico em gramíneas

Nos mais variados habitats, livres ou associados, todos os microrganismos diazotróficos utilizam um sistema básico de fixação de nitrogênio, baseado na redução do nitrogênio atmosférico a amônia pela ação da enzima nitrogenase. Em muitos organismos ocorre apenas uma forma de nitrogenase, a Mo nitrogenase, ou nitrogenase dependente do molibdênio, ou ainda nitrogenase 1. Duas outras formas foram identificadas inicialmente em

Azotobacter: nitrogenase 2 ou dependente de vanádio (Va- nitrogenase) e nitrogenase 3 ou dependente de ferro (Fe – nitrogenase) (BISHOP & PREMAKUMAR, 1992).

A fixação de nitrogênio pode ser inibida pelo suprimento do mesmo quando combinado, em todos os sistemas. Em diazotróficos de vida livre, isto ocorre pela inibição da síntese de nitrogenase ou inativação temporária da nitrogenase através de modificação covalente da enzima. Como processo complexo que é, a fixação biológica de nitrogênio requer a expressão de um conjunto de genes denominados *nif* (*nitrogen fixation*), que codificam para proteínas envolvidas diretamente no processo. Além dos genes *nif*, diversos autores têm descrito em bactérias diazotróficas outros genes, como *ntrA*, *ntrB*, *fix*, *fdx*, *rnf* e *nod* codificando para proteínas com funções como regulação em nível de metabolismo geral de compostos nitrogenados, sensoreamento e sinalização do nível de N-celular, transporte de elétrons para a nitrogenase e até o estabelecimento de interação planta-bactéria. O atual quadro de caracterização genética das bactérias diazotróficas demonstra que a complexidade do processo de fixação biológica de nitrogênio perpassa a bioquímica do processo e supõe a existência de mais genes que elucidariam processos ainda não compreendidos (BALDANI et al., 2002).

A fixação assimbiótica de nitrogênio depende da capacidade do microrganismo estabelecer-se endofiticamente no interior da planta, e para que isso ocorra, o microrganismo deve ser capaz de invadir e proliferar nos tecidos da planta hospedeira, ultrapassando as barreiras físicas e químicas que a planta estabelece, instituindo vias de infecção e sítios de colonização. Mas não devem induzir uma resposta drástica da planta à infecção, o que impediria a colonização dos tecidos. O estabelecimento desta relação depende de uma seqüência de etapas e de uma relação específica entre planta e bactéria.

A riqueza de compostos orgânicos na rizosfera produz intensas atividades e interações microbianas. A movimentação dos microrganismos em direção às raízes ocorre quando existe um reconhecimento químico, denominado quimiotaxia. Estudos indicam que a quimiotaxia aos exudatos da rizosfera são responsáveis pela chegada dos microrganismos. Em *Azospirillum lipoferum* (TARRAND et al., 1978) e *A. brasilense* (TARRAND et al., 1978) verificou-se grande atividade quimiostática a diversos açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos aromáticos e exudatos radiculares. Observam-se também respostas aerotáticas a diferentes fontes de carbono e concentração de oxigênio, que variam conforme as espécies de *Azospirillum*, (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000).

Zonas de baixa concentração de oxigênio são colonizadas preferencialmente para crescimento e multiplicação bacteriana. A colonização radicular ocorre em duas etapas.

Inicialmente ocorre uma adsorção reversível, e em seguida uma ancoramento irreversível, controlado por proteínas extracelulares de origem bacteriana. Esta etapa é comandada por sinais moleculares emitidos pelas raízes da planta hospedeira, e a sobrevivência do microrganismo depende de fatores bióticos e abióticos (DOBBELAERE et al., 2003).

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas, um volume considerável de informações foram publicadas a respeito das bactérias diazotróficas, indicando a possibilidade de utiliza-las como insumo biológico, capaz de disponibilizar para as plantas os minerais do solo e reduzir a aplicação de insumos químicos. A substituição de insumos químicos por insumos biológicos favorece o estabelecimento de uma agricultura sustentável, com menor custo de produção e conservação dos recursos naturais, como o solo e a água. Como o comportamento dos microrganismos aplicados a campo é influenciado pela competição com outros microrganismos do solo ou características do próprio solo, são necessárias pesquisas que avaliem as condições próprias de cada região agrícola, bem como a interação planta-microrganismos presentes no solo. A partir dos estudos que esclareçam as formas de interação planta-microrganismos, será possível o estabelecimento de produtos biotecnológicos, como biofertilizantes e/ou inoculantes que valorizem o potencial de microrganismos presentes no solo da região.

4.5 REFERÊNCIAS

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Plant growth- regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, n. 62, p. 45 – 151, 1998.

ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea*L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 231 – 237, 2002.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S.; DÖBEREINER, J. Recent advance in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 911 – 922, 1997.

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) **Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS, Caxias do Sul, 2002, 433p.

BENT, E.; CHANWAY, C. P. Potencial for misidentification of a spore – forming *Paenibacillus polymyxa* isolate as an endophyte by using culture – based methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4650 – 4652, 2002.

BISHOP, P. E.; PREMAKUMAR, R. **Alternative nitrogen fixation systems**. In: Biological nitrogen fixation, p. 736 – 762. Stacey, G.; Burris, D. R.; Evans, H. J., editors. Chapman and Hall, New York, 943 p.

BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B. *et al...* Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, v. 92, p. 880 – 886, 2000.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIAS, V. .M; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, n. 14, p. 195 – 209, 1995.

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

COCKING, E. C. Trends in rice researchs: Novel use of biotechnology. **Cathiers Options Méditerranéennes**, v. 24, n. 2, 2003.

CREUS, C. M., SUELDO, R. J., BARASSI, C. A. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, n. 2, p. 273 – 281, 2004.

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.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107 – 149, 2003.

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, 1995, 60 p.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5285 – 5293, 2001.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R.M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 39, p. 361 – 364, 1989.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology & Biochemistry**, n. 37, p. 395 – 412, 2005.

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.

KHAMMAS, K.M., AGERON, E., GRIMONT, P.A.D., KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research Microbiology**, n. 140, p. 679-693, 1989.

KHALIQ, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, n. 96, p. 473 – 480, 2004.

KIM, K. Y., JORDAN, D., McDONALD, G. A. Effects of phosphate solubilizing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, n. 26, p. 79 – 87, 1998.

KRONZUCKER, H. J.; KIRK, G. J. D.; SIDDIQI, M. Y. *et al...* Effects of hypoxia on $^{13}\text{NH}_4^+$ fluxes in rice roots. **Plant Physiology**, n. 116, p. 581 – 587, 1998.

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

LINDERMANN, W. C.; GLOVER, C. R. Nitrogen fixation by legumes. **Cooperative Extension Service – College of Agriculture and home Economics**. Guide A-129, may 2003, 4p.

LODEWYCKX, C.; VANGRONVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 6, p. 583 – 606, 2002.

LOPES, S.I.G. Arroz irrigado: situação atual e perspectivas de uso de cultivares híbridas, transgênicas e mutadas. In:IV Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado e XXVI Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. 9 a 12 de agosto de 2005, Santa Maria, Anais volume II, p. 594 – 605.

LUGTENBERG, B. J. J.; CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, n. 81, p. 373 – 383, 2002.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 55, p. 417-430, 1983.

PENG, S.; BISWAS, J. C.; LADHA, J. K. *et al...* Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. **Agronomy Journal**, n. 94, p. 925 – 929, 2002.

REDDY, K. R.; PATRICK, W. H. Nitrogen fixation in flooded soil. **Soil Science**, v. 128, n.2, p. 80 – 85, 1979.

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

ROMERO, E. M.; PALACIOS, R.; MORA, J. Cepas mejoradas de *Rhizobium*. **Investigación y Ciencia**, n. 8, p. 14 – 19, 1998.

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.; FRIES, M. R., ANTONIOLLI, Z. I., AITA, C., VOSS, M. JACQUES, R. J. S., SEMINOTTI, J., CARVALHO, C. A. Bactérias diazotróficas em solo cultivado com arroz irrigado (*Oryza sativa* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 4, p. 467 – 474, 2004.

SMIL, V. Abonos nitrogenados. **Investigación y Ciencia**, n. 09, p. 64 – 70, 1997.

SOUSA, R. O.; CAMARGO, F. A. O.; VAHL, L. C. Solos alagados. In: MEURER, E. J. (org). **Fundamentos de química do solo**. GENESIS, Porto Alegre, 2000, 174p.

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

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied soil Ecology**, v. 15, p. 183 – 190, 2000.

TARRAND, J. J., KRIEG, N. R., DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 24, p. 967-980, 1978.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, n. 91, 127 – 141, 2001.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, n. 255, p. 571 – 586, 2003.

WANG, C., BROWN, H. N. CROWLEY, D. E., SZANIZLO, P. J. Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B in axenically grown cucumber. **Plant Cell Environmental**, n. 16, p. 579-585, 1993.

WATANABE, I.; BARRAQUIO, W. L.; GUZMAN, M. R. *et al.* Nitrogen-fixing (acetilene reduction) activity and population of aeróbic heterotrophic nitrogen-fixing bacteria associated with wetland rice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 813 – 817, 1979.

5 FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO *in vitro* POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

NITROGEN FIXATION AND PRODUCTION INDOLACETIC ACID *in vitro* BY ENDOPHYTIC DIAZOTROPHIC BACTERIA

5.1 RESUMO

O objetivo deste experimento foi isolar bactérias diazotróficas associadas a raízes de arroz, quantificá-las e avaliar o potencial de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e produção de ácido indolacético, a fim de selecionar isolados promissores para inoculação em plantas. Bactérias fixadoras de nitrogênio, habitantes do interior das raízes de cultivares de arroz do Rio Grande do Sul, foram isoladas e quantificadas em nove cultivares. O isolamento foi realizado a partir de raízes de arroz superficialmente esterilizadas, que foram maceradas e inoculadas em meios de crescimento elaborados sem fonte de nitrogênio e em condições semi-sólidas, criando ambiente com baixo nível de oxigênio. Dentre os 58 isolados obtidos pela inoculação dos meios NFb (*Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*), JNFb (*Herbaspirillum* spp.), JMV (*Burkholderia* spp.), LGI (*A. amazonense*) e LGI-P (*Gluconacetobacter diazotrophicus*), foram escolhidos os isolados UFSM-BD-02-06, UFSM-BD-08-06, UFSM-BD-14-06, UFSM-BD-20-06, UFSM-BD-26-06, UFSM-BD-31-06, UFSM-BD-36-06, UFSM-BD-42-06, UFSM-BD-48-06, UFSM-BD-54-06, desenvolvidos em meio NFb. Avaliou-se a capacidade de FBN *in vitro* e a produção de ácido indolacético *in vitro* pelos métodos Kjeldahl e colorimétrico, respectivamente. Observou-se grande quantidade e diversidade de bactérias diazotróficas no interior das raízes de arroz. Quanto a FBN, *A. brasilense* e *A. lipoferum* apresentaram maiores valores para N-total (41,08 e 46,82 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) em relação a todos os isolados avaliados. Em relação à produção de ácido indolacético, *A. brasilense* (41,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e UFSM-BD-31-06 (13,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram os maiores produtores. Quando o desempenho dos isolados foi avaliado em $\mu\text{g g}^{-1}$ de

proteína, os isolados UFSM-BD-02-06, UFSM-BD-26-06 e UFSM-BD-31-06 apresentaram maior FBN e UFSM-BD-31-06 foi o maior produtor de ácido indolacético.

Palavras-chave: auxinas; diazotróficas; fixação biológica de nitrogênio; isolamento, raízes de arroz.

5.2 ABSTRACT

The aim of the present work was to isolate diazotrophic bacteria associated with rice root, quantify and evaluate their potential of biological nitrogen fixation (BNF) and acid indolacetic production, with the purpose of selection promising isolates for plant inoculation. N-fixing bacteria, settlers the root interior of rice cultivars used in Rio Grande do Sul, were isolated and quantified in nine cultivars. The isolation was performed from rice root, superficially sterilized, which were macerated and inoculated in specific growth medium. Among the 58 isolates obtained in the NFB medium (*Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*), JNFB medium (*Herbaspirillum* spp.), JMV medium (*Burkholderia* spp.), LGI medium (*A. amazonense*) and LGI-P medium (*Gluconacetobacter diazotrophicus*), were selected the UFSM-BD-02-06, UFSM-BD-08-06, UFSM-BD-14-06, UFSM-BD-20-06, UFSM-BD-26-06, UFSM-BD-31-06, UFSM-BD-36-06, UFSM-BD-42-06, UFSM-BD-48-06, UFSM-BD-54-06 isolates were selected, growing in NFB medium. The ability of BNF *in vitro* was determined by the Kjeldahl method, and indolacetic acid production by colorimetry. A great quantify and diversity of diazotrophic bacteria in root interior was observed. *A. brasilense* e *A. lipoferum* presented greater values (41,08 e 46,82 $\mu\text{g N mL}^{-1}$, respectively) of total N-content in relation to all isolates evaluated. As to indolacetic acid production, *A. brasilense* (41,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and UFSM-BD-31-06 (13,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were the greatest producers. When the performance of the isolates in $\mu\text{gN g}^{-1}$ protein was evaluated, the UFSM-BD-02-06, UFSM-BD-26-06 and UFSM-BD-31-06 isolates exhibit greater BNF and UFSM-BD-31-06 was the greatest producer of indolacetic acid.

Key-words: auxin, biological nitrogen fixation, diazotrophic, isolation, rice root.

5.3 INTRODUÇÃO

Bactérias que habitam as raízes de plantas e exercem efeitos positivos sobre as mesmas, são denominadas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (plant growth-promoting rhizobacteria – PGPR). Os efeitos positivos destes organismos podem ocorrer por influência direta (aumento da solubilização e entrada de nutrientes ou produção de reguladores de crescimento vegetal) ou indireta (supressão de patógenos por produção de sideróforos ou antibióticos) (ASGHAR et al., 2002). Pela sua habilidade em converter nitrogênio atmosférico em amônia, que pode ser utilizada pela planta, as bactérias diazotróficas também são consideradas PGPR. Devido à sua capacidade de sobreviver em ambientes deficientes em nitrogênio, podem enriquecer seletivamente a rizosfera, local em que habitam como organismos de vida livre ou associadas assimbioticamente a plantas (DOBBELAERE et al., 2003).

Avanços significativos ocorreram na área da FBN em gramíneas com a descoberta do meio semi-sólido NFb, pelo grupo da Dra. Johanna Döbereiner na década de 70 (OLIVEIRA et al., 2002). Elaborado sem fonte nitrogenada, a condição de semi-sólido cria um ambiente com baixo nível de oxigênio, semelhante ao que ocorre em nichos no solo ou na planta, onde estão localizadas bactérias diazotróficas microaerofílicas associadas a raízes de plantas. A formulação desse meio facilitou o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum*, levando à descoberta de duas novas espécies: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (TARRANT et al., 1978). Após essa descoberta, muitas espécies de diazotróficas foram isoladas no Brasil, como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986), *H. rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996), *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983) e espécies de *Burkholderia* (GILLIS et al., 1995). Estas bactérias têm sido detectadas em altos números – entre 10^4 e 10^7 células g^{-1} de peso fresco e muitos estudos têm sido conduzidos para avaliar o suprimento de N fornecido às plantas hospedeiras (BALDANI & BALDANI, 2005; OLIVEIRA et al., 2002).

No caso de *Azospirillum*, respostas positivas à inoculação têm sido observadas em plantas, inclusive quando cultivadas com altos níveis de nitrogênio, indicando que as respostas da planta não são apenas devido ao N_2 fixado, mas pela produção de outras substâncias (DOBBELAERE et al., 2003). As auxinas estão entre as substâncias de crescimento vegetal produzidas por *Azospirillum* e outros gêneros, das quais o ácido indolacético (AIA) é a mais ativa e melhor caracterizada (CROZIER et al., 1988). O AIA é

conhecido por produzir tanto respostas rápidas (aumento da alongação celular) como lentas (divisão e diferenciação celular) (DOBBELAERE et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que microrganismos rizosféricos são capazes de sintetizar reguladores de crescimento vegetal *in vitro* (ARSHAD & FRANKENBERGER, 1998). SARWAR & KREMER (1995) avaliaram 16 isolados da rizosfera de diferentes plantas e verificaram que os isolados associados a plantas eram mais eficientes na produção de auxinas do que os não associados à raiz das plantas.

O objetivo deste experimento foi isolar bactérias diazotróficas associadas a raízes de diferentes cultivares de arroz irrigado, e dentre estas, quantificar e avaliar o potencial de FBN e produção de ácido indol-acético das isoladas através de meio seletivo para *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* (meio NFb), a fim de selecionar isolados promissores para posterior inoculação em plantas.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Isolamento e contagem de bactérias diazotróficas endofíticas de raiz de arroz

O processo de isolamento de bactérias diazotróficas endofíticas consiste em desinfetar superficialmente as raízes, eliminando os microrganismos do solo e da parte externa da raiz. Foram utilizadas raízes de arroz das variedades Qualitá, Avaxi, Tio Taka, Epagri-108, Epagri-109, BR-IRGA- 410, IRGA-417, IRGA-419 e IRGA-420. As cultivares foram semeadas em solo Planossolo Hidromórfico Eutrófico arênico, em área de várzea sistematizada do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (RS), em 23/10/2004, em sistema pré- germinado e densidade de 120 kg de sementes/ha. Aos 30 dias após a semeadura (DAS), na fase de perfilhamento, foram aplicados 300 kg de adubo 2-20-30 e 45 kg ha⁻¹ N em forma de uréia comercial. A segunda aplicação de N foi de 45 kg ha⁻¹ aos 55-60 DAS, na fase de diferenciação do primórdio floral. Foram aplicados os inseticidas Diafuran e Carbofuran. Não foi aplicado fungicida. As plantas utilizadas para contagem e isolamento de bactérias diazotróficas foram coletadas em fim de ciclo de desenvolvimento da planta, pouco antes da colheita.

Para a desinfecção das raízes, utilizou-se o método descrito por DÖBEREINER et al. (1995), que consiste em lavar as raízes de arroz em água corrente, retirar 15 g, secar e

desinfetar superficialmente, com as seguintes etapas: imersão das raízes por 10 minutos em cloramina-T ($C_7H_7ClNNaO_2S_3H_2O$) a 1%, 10 minutos em água destilada estéril, 10 minutos em tampão fosfato e 10 minutos em água destilada estéril. Após, porções de 10 g de raízes foram trituradas com 90 mL de solução salina ($8,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$) e então realizaram-se diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-7} , transferindo sucessivamente 10 mL da suspensão de cada diluição para frascos contendo 90 mL de solução salina. De cada uma das diluições, alíquotas de 100 μL foram inoculadas em triplicata, em frascos de vidro de 15 mL contendo 5 mL dos meios semi-sólidos livres de N, NFb para *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*, JNFb para *Herbaspirillum* spp., JMV para *Burkholderia*, LGI para *A. amazonense* e LGI-P para *Gluconacetobacter* spp. Os frascos foram incubados a 30°C por sete dias, sendo considerados positivos para contagem aqueles que apresentaram uma película aerotóxica típica próxima da superfície do meio. A contagem da população de bactérias diazotróficas foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady para três repetições por diluição (DÖBEREINER et al., 1995).

A partir dos tubos de maior diluição que apresentaram película característica, em cada um dos meios utilizados, foram inoculados novos tubos contendo meio semi-sólido específico, em três repetições. Após incubação por cinco dias, nova repicagem foi realizada e os frascos incubados por três dias. Um dos tubos de cada meio então foi utilizado para repicagem em placas contendo meio sólido específico acrescido de 20 mg L^{-1} de extrato de levedura. As placas foram incubadas por sete dias a 30°C e as colônias com características das espécies de interesse foram selecionadas e novamente repicadas para meio semi-sólido. Após quatro dias, foram então repicadas para frascos inclinados contendo 5 mL de meio batata sólido e incubadas por mais três dias, quando foram acrescentados a cada frasco 15 mL de glicerol 50% (crioproteção e isolamento de oxigênio) e armazenadas em congelador a - 14°C.

5.4.2 Avaliação da produção de ácido indolacético *in vitro*

Os isolados UFSM-BD-02-06, UFSM-BD-08-06, UFSM-BD-14-06, UFSM-BD-20-06, UFSM-BD-26-06, UFSM-BD-31-06, UFSM-BD-36-06, UFSM-BD-42-06, UFSM-BD-48-06, UFSM-BD-54-06 e os padrões *A. brasilense* e *A. lipoferum* foram inoculados em frascos de vidro de 100 mL contendo 10 mL de meio Digs. Os frascos foram

incubados por dois dias, até que o meio turvasse. Após este período, os meios com células foram centrifugados, o sobrenadante foi vertido fora e o pelete de células foi dissolvido em 5 mL de solução salina ($8,5 \text{ g L}^{-1}$). Utilizando espectrofotômetro a 600 nm foi determinada a densidade ótica (DO) de cada isolado, acrescentando solução salina até obter uma $DO = 0,5$.

Para quantificar as auxinas produzidas pelos isolados em meio de cultura, alíquotas de 500 μL de solução de cada um dos isolados bacterianos ajustadas para $DO 0,5$ foram inoculadas para crescimento em 20 mL de meio Digs por 72 horas a 30°C . Após este período, 15 mL de cada uma das culturas homogeneizadas foram transferidas para tubos e centrifugadas. Do sobrenadante obtido, 3 mL foram vertidos em frascos, aos quais foram adicionados 2 mL de Reagente de Salkowski (SARWAR & KREMER, 1995). O sobrenadante restante foi vertido fora. À massa celular depositada no fundo do tubo foram adicionados 10 mL de água destilada estéril e agitados para homogeneização e uso posterior na avaliação do conteúdo de proteínas dos isolados. Os frascos contendo o sobrenadante e o Reagente de Salkowski foram então reservados por 30 minutos em ambiente escuro para desenvolvimento de cor, que se manifesta em cor rósea, mais intensa quando há maior quantidade de ácido indolacético. A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm segundo ASGHAR et al., (2002). A concentração dos compostos indólicos foi estimada utilizando uma curva padrão previamente preparada com meio de cultura esterilizado não inoculado e quantidades conhecidas de ácido indolacético de 0, 25, 50, 100, 150, 200 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de acordo com a equação $y = 0,0514x - 0,0546$ ($R^2 = 0,9706$).

A massa de bactérias aderidas ao fundo dos tubos devido à centrifugação foi homogeneizada em água destilada estéril e centrifugada duas vezes, a fim de lavar completamente as células. Após, os tubos foram armazenados em congelador a -14°C até sua utilização. Para avaliar o conteúdo de proteínas produzidas pelos isolados bacterianos foi aplicado o método descrito por BRADFORD (1976), utilizando alíquotas de 500 μL de solução obtidas após descongelamento e aquecimento em microondas (um minuto para cada tubo, para ruptura das células dos isolados) e adição de 4,5 mL de solução de Comassie Blue G-250. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 600 nm e os valores resultantes foram então comparados com concentrações conhecidas de soro-albumina bovina (BSA). A curva padrão foi previamente preparada com concentrações de 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 μg de BSA segundo equação $y = 18,916x - 30,455$ ($R^2 = 0,995$).

5.4.3 Avaliação da FBN *in vitro*

Para avaliação da FBN, 600 μL de uma solução de bactérias previamente ajustada para uma DO de 0,5 em espectrofotômetro a 600 nm (aproximadamente 10^8 UFC mL^{-1}), foram inoculados em frascos contendo 10 mL de meio NFb semi-sólido em triplicatas e incubados a 30°C por cinco dias. Após o crescimento bacteriano, foram armazenados em congelador a -14°C , até que fossem analisados. Procedeu-se à ruptura das células para liberação do conteúdo celular retirando os tubos do congelador e aquecendo-os em microondas por 1 minuto por frasco. Da solução resultante (meio + conteúdo celular) foram vertidos 9,5 mL em tubos para digestão pelo método semi-micro Kjeldhal (TEDESCO et al., 1995), previamente identificados e 500 μL foram reservados em frascos para avaliação do conteúdo de proteínas.

Para digestão, adicionaram-se a cada tubo contendo as células lisadas 0,7 g de mistura de digestão (100 g Na_2SO_4 + 10 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1 g selênio em pó), 1 mL de H_2O_2 e 2 mL de H_2SO_4 , nesta ordem. Os tubos foram aquecidos em bloco digestor por 2 horas a 180°C , sendo a temperatura então elevada para 360°C e mantida até que a mistura apresentasse a cor verde palha. Ao atingir a cor, marcou-se mais 1 hora, esperou esfriar por alguns minutos e completou-se o volume com água destilada para 10 mL. Como controle, utilizou-se meio de cultura não inoculado. Procedeu-se a destilação com NaOH e titulação das soluções para quantificação do nitrogênio total (N_t), conforme descrito por TEDESCO et al., 1995. O cálculo de N_t fixado foi apresentado em μg por g de proteína.

Porções de 500 μL de cada amostra de meio NFb com bactérias crescidas e lisadas, foram adicionadas a 4,5 mL da solução de Comassie Blue G-250 e sua DO lida em espectrofotômetro para avaliação da concentração de proteínas em meio NFb, observando os mesmos procedimentos realizados para avaliação de conteúdo de proteínas produzidas pelas bactérias em meio Digs. Foi utilizada a mesma curva padrão para os dois procedimentos.

5.4.4 Análise estatística

Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey em nível de 5%, utilizando os procedimentos disponíveis no programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Bactérias diazotróficas no solo de origem e no interior das raízes de arroz

O solo de origem das cultivares, de acordo com análise, apresentou pH 5,0 e teor de matéria orgânica de 2,2 m/v. Entre as populações de bactérias diazotróficas presentes no solo (Tabela 1) verificou-se que a maior população foi detectada em meio LGI (para *Azospirillum amazonense*) e a menor em meio JNFb (para *Herbaspirillum*). NFB (*A. brasilense* e *A. lipoferum*), JMV (*Burkholderia*) e LGI-P (*Gluconacetobacter*) apresentaram valores populacionais intermediários. O solo é uma importante fonte de bactérias diazotróficas endofíticas ou rizosféricas, que utilizam os exsudatos radiculares, liberam substâncias promotoras de crescimento e/ou participam da FBN (DOBBELAERE et al., 2003).

Tabela 1 – Número de bactérias diazotróficas no solo da área de coleta das cultivares de arroz irrigado. Safra 2004/2005, Santa Maria.

Meio seletivo / Bactéria	Bactérias (g solo seco ⁻¹)
NFB (<i>Azospirillum brasilense</i> e <i>A. lipoferum</i>)	4,0 X 10 ³
JNFb (<i>Herbaspirillum</i>)	1,1 X 10 ³
JMV (<i>Burkholderia</i>)	2,5 X 10 ³
LGI (<i>A. amazonense</i>)	9,5 X 10 ³
LGI-P (<i>Gluconacetobacter</i>)	2,5 X 10 ³

Assim como no solo, as bactérias relacionadas ao gênero *Burkholderia* foram detectadas em várias cultivares de arroz, exceto Qualitá e Avaxi. Quanto as relacionadas a *A. amazonense*, foram detectadas no solo e em todas as cultivares de arroz utilizadas (Tabela 2).

Bactérias relacionadas ao gênero *Gluconacetobacter*, embora tenham sido detectadas no solo, não foram detectadas na cultivar IRGA-417. A detecção de bactérias somente após a

introdução das plantas foi verificada por ROSZAK & COLWELL (1987), que elaboraram o conceito de células viáveis, mas não culturáveis presentes no solo. Em 1988, SUNDARAM & KLUCAS relataram a ocorrência de *Azospirillum* spp. em sementes de gramíneas. Utilizando microscopia eletrônica e imunoenaios, BALDANI et al., (1992) localizaram bactérias *Herbaspirillum* spp. na faixa interna do tegumento de sementes de arroz. REIS et al. (1994) sugeriram a disseminação de *Gluconacetobacter* por duas formas, sendo uma delas a disseminação pelas sementes das gramíneas, inclusive arroz. Apesar de bactérias diazotróficas do gênero *Gluconacetobacter* apresentarem habitat basicamente endofítico, na ausência de plantas têm sido encontradas em esporos de fungos micorrízicos arbusculares presentes no solo (MUTHUKUMARASAMY et al., 2002). Porém, JIMENEZ-SALGADO et al. (1997) sugerem que a presença destas bactérias possa ocorrer quando há alto teor de matéria orgânica no solo, a qual protegeria a bactéria da ação dos fatores fisiológicos do solo.

Entre a população de bactérias presentes no interior das raízes das cultivares de arroz (Tabela 2) verificou-se que ocorreram grandes populações de bactérias diazotróficas endofíticas. Quanto ao meio NFb, as populações de bactérias relacionadas a *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* diferiram estatisticamente entre si apenas nas cultivares Qualitá e Avaxi, as quais apresentaram valores estatisticamente inferiores às outras cultivares.

Tabela 2 – Número bactérias diazotróficas endofíticas (\log_{10}) (e respectivo percentual) associadas às raízes das cultivares de arroz irrigado. Santa Maria, 2004/2005.

Cultivares	NFb	JNFb	JMV	LGI	LGI-P
Qualitá	6,42b*(38,69)	4,69d (0,50)	ND(0)	6,40cd (44,22)	6,44ab (15,580)
Avaxi	4,56c (1,18)	3,81d (0,25)	ND (0)	6,42cd (92,00)	5,34b (6,57)
Epagri-109	7,86a (32,86)	7,74ab (32,86)	6,55b (0,71)	6,56cd (0,71)	7,86a (32,86)
IRGA-420	7,86a (20,89)	7,95a (20,90)	7,86a (20,89)	7,95a (20,90)	7,86a (16,42)
BR-IRGA-410	7,49a (19,50)	7,42abc (15,32)	6,45b (2,09)	7,40ab (62,67)	5,34b (0,42)
IRGA- 419	8,11a (93,74)	6,35bc (2,68)	5,33cd (0,23)	6,56cd (2,01)	6,45ab (1,34)
Tio Taka	7,40a (64,31)	6,26c (9,65)	6,32bc (2,36)	7,12b (23,58)	6,64ab (0,10)
IRGA- 417	6,34a (28,50)	6,17c (29,79)	5,24d (2,85)	6,45cd (35,86)	ND(0)
Epagri-108	8,11a (88,53)	6,40bc (6,04)	4,07e (0,92)	6,37d (3,22)	6,46ab (1,29)
CV%	4,71	8,01	7,59	3,75	11,10

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Quanto às populações relacionadas a *A. amazonense*, a cultivar IRGA-420 apresentou maior população, diferindo estatisticamente em relação às outras cultivares (Tabela 2). Observação semelhante é descrita por BRASIL et al. (2005), ao verificar que maiores populações de *A. amazonense* estavam presentes em braquiária e capim carona, enquanto *A. brasilense* foram localizadas em maior número em capim mimoso.

Entre as populações relacionadas a *Herbaspirillum*, maiores populações foram encontradas em IRGA-420, Epagri-109 e BR-IRGA-410, e para as do gênero *Burkholderia* IRGA-420 apresentou maior população. Na cultivar Avaxi observaram-se as menores populações para bactérias crescidas em meio NFb (*Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*), JNFb (*Herbaspirillum*) e LGI-P (*Gluconacetobacter*), sendo que em meio JMV (*Burkholderia*), não foi detectada pelo método. A diferença significativa verificada entre as diferentes cultivares pode estar relacionada a fotoassimilados que forneçam fontes de carbono específicas e favoreçam sua permanência no interior das raízes ou a exsudatos radiculares que podem atrair os microrganismos para a região rizosférica (VALÉ et al., 2005). BACILIO – JIMÉNEZ et al. (2003), conduziram estudos de caracterização de exsudatos radiculares em arroz e verificaram que bactérias endofíticas respondem à composição e concentração de aminoácidos presentes. Na cultivar Epagri-109 foi também localizada a maior população relacionada a *Gluconacetobacter*, mas não foi detectada em BR-IRGA-417.

As diferenças verificadas nas populações das diferentes cultivares foram semelhantes às verificadas por KNAUTH et al. (2005), que observaram diferenças consideráveis entre as comunidades de diazotróficos associadas às raízes de cultivares de arroz e na expressão do gene responsável pela enzima chave, a nitrogenase. As diferenças entre as cultivares também têm sido detectadas quanto à fixação biológica de nitrogênio.

Quanto à percentagem de isolados obtidos, observa-se que diferentes cultivares revelam afinidade por grupos específicos de bactérias diazotróficas. Isolados em meio NFb (*A. brasilense* e *A. lipoferum*) representam valores percentuais próximos de 90% do total das bactérias diazotróficas presentes em BR-IRGA-419 e Epagri-108, de 20 a 65% em Qualitá, Epagri-109, IRGA-420, BR-IRGA-410, Tio Taka e BR-IRGA-417 e apenas 1% em Avaxi.

Para JNFb (*Herbaspirillum*) verificou-se que correspondem a até 10% do total de bactérias diazotróficas em Qualitá, Avaxi, IRGA-419, Tio Taka e Epagri-108 e de 15 a 30% em Epagri-109, IRGA-420, BR-IRGA-410 e IRGA-417. O meio JMV (*Burkholderia*) apresentou maior população em IRGA-420 (20,89%), ficando abaixo de 3% de representação para todas as outras cultivares avaliadas.

Quanto ao meio LGI (*A. amazonense*), destacou-se em Avaxi (92%) e BR-IRGA-410 (63%), ficando entre 20 e 45% nas cultivares Qualitá, IRGA-420, Tio Taka e IRGA-417. Nas demais cultivares, foram encontradas em valores menores de 3,5% do total.

Os percentuais observados para meio LGI-P (*Gluconacetobacter*) variaram entre 15 e 33% nas cultivares Qualitá, Epagri-109 e IRGA-420, nas outras cultivares verificaram-se valores abaixo de 7%.

ZAMUDIO & BASTARRACHEA (1994) inocularam uma mistura de espécies bacterianas em *Triticum aestivum* L. e observaram aderência preferencial de *Azospirillum* spp. às raízes, embora se verificasse que todas as espécies foram competentes quando aplicadas individualmente. NEHL et al. (1996) considera, após citar vários trabalhos, que a qualidade dos exsudatos radiculares é a responsável pela preferência das bactérias pela cultivar e/ou espécie vegetal a ser colonizada.

5.5.2 Isolados obtidos a partir das raízes das cultivares

Após a quantificação das populações nas diferentes cultivares, foram selecionadas dois isolados de cada meio para cada cultivar utilizada, de acordo com as características morfológicas das colônias de cada meio específico. Os isolados obtidos nos meios NFB, JNFb, JMV, LGI e LGI-P estão listados e identificados na Tabela 3.

Tabela 3 – Isolados de bactérias diazotróficas endofíticas obtidos de nove cultivares de arroz em seus respectivos meios de isolamento e cultivares de origem. Safra 2004/2005. Santa Maria.

Identificação/Meio de isolamento/Arroz			Identificação/Meio de isolamento/Arroz		
UFSM-BD-01-06	NFB	Qualitá	UFSM-BD-30-06	LGI-P	IRGA-420
UFSM-BD-02-06	NFB	Qualitá	UFSM-BD-31-06	NFB	BR-IRGA-410
UFSM-BD-03-06	LGI	Qualitá	UFSM-BD-32-06	NFB	BR-IRGA-410
UFSM-BD-04-06	LGI	Qualitá	UFSM-BD-33-06	LGI	BR-IRGA-410
UFSM-BD-05-06	LGI-P	Qualitá	UFSM-BD-34-06	LGI	BR-IRGA-410
UFSM-BD-06-06	LGI-P	Qualitá	UFSM-BD-35-06	NFB	BR-IRGA-419
UFSM-BD-07-06	NFB	Avaxi	UFSM-BD-36-06	NFB	BR-IRGA-419
UFSM-BD-08-06	NFB	Avaxi	UFSM-BD-37-06	LGI	BR-IRGA-419
UFSM-BD-09-06	LGI	Avaxi	UFSM-BD-38-06	LGI	BR-IRGA-419
UFSM-BD-10-06	LGI	Avaxi	UFSM-BD-39-06	LGI-P	BR-IRGA-419
UFSM-BD-11-06	LGI-P	Avaxi	UFSM-BD-40-06	LGI-P	BR-IRGA-419
UFSM-BD-12-06	LGI-P	Avaxi	UFSM-BD-41-06	NFB	Tio Taka
UFSM-BD-13-06	NFB	Tio Taka	UFSM-BD-42-06	NFB	Tio Taka
UFSM-BD-14-06	NFB	Tio Taka	UFSM-BD-43-06	LGI	Tio Taka
UFSM-BD-15-06	LGI	Tio Taka	UFSM-BD-44-06	LGI	Tio Taka
UFSM-BD-16-06	LGI	Tio Taka	UFSM-BD-45-06	LGI-P	Tio Taka
UFSM-BD-17-06	LGI-P	Tio Taka	UFSM-BD-46-06	LGI-P	Tio Taka

UFSM-BD-18-06	LGI-P	Tio Taka	UFSM-BD-47-06	NFB	BR-IRGA-417
UFSM-BD-19-06	NFB	Epagri-109	UFSM-BD-48-06	NFB	BR-IRGA-417
UFSM-BD-20-06	NFB	Epagri-109	UFSM-BD-49-06	LGI	BR-IRGA-417
UFSM-BD-21-06	LGI	Epagri-109	UFSM-BD-50-06	LGI	BR-IRGA-417
UFSM-BD-22-06	LGI	Epagri-109	UFSM-BD-51-06	LGI-P	BR-IRGA-417
UFSM-BD-23-06	LGI-P	Epagri-109	UFSM-BD-52-06	LGI-P	BR-IRGA-417
UFSM-BD-24-06	LGI-P	Epagri-109	UFSM-BD-53-06	NFB	Epagri-108
UFSM-BD-25-06	NFB	IRGA-420	UFSM-BD-54-06	NFB	Epagri-108
UFSM-BD-26-06	NFB	IRGA-420	UFSM-BD-55-06	LGI	Epagri-108
UFSM-BD-27-06	LGI	IRGA-420	UFSM-BD-56-06	LGI	Epagri-108
UFSM-BD-28-06	LGI	IRGA-420	UFSM-BD-57-06	LGI-P	Epagri-108
UFSM-BD-29-06	LGI-P	IRGA-420	UFSM-BD-58-06	LGI-P	Epagri-108

5.5.3 Produção de ácido indolacético pelos isolados obtidos em meio NFB

A habilidade de sintetizar fitormônios é amplamente distribuída entre bactérias associadas a plantas. A produção de ácido indolacético (AIA) pelas bactérias faz parte da sua atuação quando associadas com as plantas, estimulando tanto a alongação celular como a divisão e diferenciação celular nas plantas (DOBBELAERE et al., 2003). As bactérias produzem AIA por várias vias de síntese. Triptofano é um precursor de AIA, pois sua adição em meios de cultura promove aumento da síntese, mas há vias independentes de triptofano. Bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* são estudadas devido a sua interação com gramíneas e sintetizam AIA por diversas vias dependentes de triptofano. No entanto, alguns autores sugerem que 90% do AIA sintetizado por este gênero é derivado de uma via independente de triptofano (ZAKHAROVA et al., 1999). Devido a essa constatação, o meio de cultivo para quantificação de auxinas no presente experimento não recebeu adição de triptofano. HALDA-ALIJA (2003) em seus experimentos também verificou que houve produção de AIA pelos isolados de diazotróficos, mesmo quando não houve adição de triptofano ao meio de cultura. Mas ONA et al. (2005), conduzindo experimentos em fermentadores, cujas condições foram controladas para propiciar o máximo crescimento de *A. brasilense* e máxima produção de AIA, concluíram que sem triptofano a produção do hormônio e a expressão do gene *ipdC* (responsável pela ativação da enzima chave de biossíntese de AIA) são menores e ocorrem apenas na fase estacionária de crescimento da bactéria.

Verificou-se que todos os isolados produziram AIA em meio de cultura (Tabela 4), variando entre 2,79 e 13,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ quando quantificados em meio de cultura e de 4,86 a 64,16 $\mu\text{g mg}^{-1}$ quando relacionados a massa de proteínas produzida. Destacou-se o isolado

UFSM-BD-31-06, obtido de raiz desinfetada de arroz BR-IRGA-410, com o mais alto valor, inclusive em relação aos padrões utilizados de *A. lipoferum* e *A. brasilense*. O menor valor foi verificado no isolado UFSM-BD-02-06, proveniente de arroz cultivar Avaxi. Valores semelhantes foram reportados por CROZIER et al. (1988), que estudaram a produção de AIA por isolados de *A. brasilense* e obtiveram valores entre 1,4 e 26,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em culturas incubadas por 24 horas a 32°C. MASCARUA-ESPARZA et al., (1988), obtiveram valores de 36,5 a 77 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *A. brasilense* e 6,5 a 17,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *A. lipoferum*, ambas espécies isoladas de raízes de cactáceas crescidas em condições áridas.

Verificaram-se diferenças estatísticas pronunciadas quanto a produção de AIA, quando medida em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de meio, mas quando foi considerada a quantidade de proteínas produzidas pelos isolados para cálculo, observou-se redução na diferença entre os isolados. Entre os valores de proteína, não houve diferença estatística, mas o isolado UFSM-BD-31-06, apresentando menor produção de proteína (255,23 $\mu\text{g mL}^{-1}$), embora não significativo, obteve o mais alto valor significativo de AIA (13,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ meio de cultura semi-sólido e 64,16 $\mu\text{g mg}^{-1}$ proteína). Todos os outros isolados apresentaram valores estatisticamente semelhantes quanto a produção de AIA em relação à proteína produzida em meio de cultura (Tabela 4).

Tabela 4 – Produção de auxinas por bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de cultivares de arroz irrigado após 72 h de crescimento em meio Digs.

Cultivar de origem	Isolado	Auxinas $\mu\text{g mL}^{-1}$	Proteína $\mu\text{g mL}^{-1}$	Auxinas $\mu\text{g g}^{-1}$ proteína
**	<i>A. lipoferum</i>	4,63cd*	419,52a	11,08b
**	<i>A. brasilense</i>	5,04c	550,47a	9,17b
Qualitá	UFSM-BD-02-06	2,79d	593,33a	4,86b
Avaxi	UFSM-BD-08-06	2,99d	348,09a	8,69b
Tio Taka	UFSM-BD-14-06	3,31cd	433,81a	7,83b
Epagri-109	UFSM-BD-20-06	5,25c	495,71a	10,61b
IRGA-420	UFSM-BD-26-06	3,82cd	588,57a	7,26b
BR-IRGA-410	UFSM-BD-31-06	13,47a	255,23a	64,16a
BR-IRGA-419	UFSM-BD-36-06	3,57cd	526,66a	7,11b
Tio Taka	UFSM-BD-42-06	7,94b	302,85a	30,38b
BR-IRGA-417	UFSM-BD-48-06	3,83cd	524,28a	7,65b
Epagri-108	UFSM-BD-54-06	4,34cd	562,38a	7,54b
CV%	-	13,63	27,26	64,37

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

** Espécies pertencentes à Coleção de Culturas da EMBRAPA – Agrobiologia, Seropédica, RJ.

PEDRAZA et al. (2004) testaram vários isolados de *Azospirillum* spp e verificaram que todos produziram AIA, variando de 0,475 a 1,833 $\mu\text{g mg}^{-1}$ proteína em meio de cultura

sem triptofano e 1,032 a 38,286 $\mu\text{g mg}^{-1}$ proteína quando adicionado triptofano ao meio de cultura.

5.5.4 Fixação de nitrogênio pelos isolados obtidos em meio NFb (*A. brasilense*/ *A. lipoferum*)

Bactérias do gênero *Azospirillum* spp. convertem nitrogênio atmosférico em amônia sob condições microaerófilas e baixos níveis de nitrogênio, pela ação do complexo nitrogenase (STEENHOUDT et al., 2000).

Os valores de N-total foram utilizados para avaliar o potencial de fixação biológica de nitrogênio pelas bactérias (FERNANDES et al., 2001), pois foram incubadas em meio de cultura sem fonte nitrogenada, e, portanto, o nitrogênio medido nestas culturas provém de sua fixação do ar. A condição microaerófila é condicionada pelo uso de meio semi-sólido para incubação dos isolados. Os valores de N-total (Tabela 5) em meio de cultura apresentaram grande faixa de variação: de 5,56 a 46,82 $\mu\text{g mL}^{-1}$. *A. lipoferum* e *A. brasilense* apresentaram-se como os melhores fixadores de nitrogênio, com valores significativamente maiores em relação aos outros isolados.

Tabela 5 – Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de cultivares de arroz após 72 h de crescimento em meio NFb.

Isolado	N-total ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>A. lipoferum</i>	46,82a	166,71b
<i>A. brasilense</i>	41,09a	213,85a
UFSM-BD-02-06	12,99b	4,90c
UFSM-BD-08-06	9,17b	22,56c
UFSM-BD-14-06	7,20b	16,62c
UFSM-BD-20-06	12,12b	19,82c
UFSM-BD-26-06	12,11b	5,99c
UFSM-BD-31-06	11,62b	13,14c
UFSM-BD-36-06	7,53b	13,85c
UFSM-BD-42-06	5,56b	12,57c
UFSM-BD-48-06	8,63b	22,19c
UFSM-BD-54-06	9,35b	24,09c
CV%	28,78	25,17

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (p= 0,05; teste Tukey).

Quando a fixação de N foi relacionada com a produção de proteínas pelos isolados, obteve-se um alto coeficiente de variação (100,73%), o que impossibilitou o uso dos dados

obtidos. HAN & NEW (1998) testaram 258 isolados de *Azospirillum* quanto a FBN pela técnica de redução de acetileno, e obtiveram, tal como neste experimento, isolados com altos, médios e baixos valores de fixação, variando de 0 a 154,9 nmolC₂H₄ mg proteína⁻¹ h⁻¹.

KNAUTH et al. (2005) detectaram muitas diferenças quanto a fixação de nitrogênio entre cultivares de arroz ao avaliar a expressão da enzima chave da FBN, a nitrogenase. Esta constatação pode ser uma explicação para as variações verificadas, já que os isolados foram obtidos de diversas cultivares de arroz. Por outro lado, MANTELIN & TOURAINÉ (2004) consideram que a fixação ativa de nitrogênio pelas bactérias não implica em transferência do N fixado para a planta, e HAN & NEW (1998) verificaram em seus experimentos que a FBN em meio de cultura não se relacionou com alta fixação de nitrogênio em campo.

5.6 CONCLUSÕES

A cultivar de arroz irrigado IRGA-420 apresentou populações de bactérias diazotróficas maiores nos meios NFb, JNFb, JMV, LGI e LGI-P, apresentando potencial para FBN.

A. lipoferum e *A. brasilense* apresentaram alta fixação biológica de nitrogênio e baixa produção de ácido indolacético *in vitro* em relação aos demais isolados. Dentre os isolados, UFSM-BD-31-06 foi quem apresentou maior produção de ácido indolacético, e os outros isolados apresentaram valores semelhantes para fixação biológica de nitrogênio em meio de cultura.

5.7 REFERÊNCIAS

ARSHAD, M., FRANKENBERGER, W. T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, n. 62, p. 45 – 151, 1998.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils** v. 35, p. 231 – 237, 2002.

BACILIO – JIMÉNEZ, M.; AGUILAR – FLORES, S.; VENTURA – ZAPATA, E.; PÉREZ – CAMPOS, E.; BOUQUELET, S.; ZENTENO, E. Chemical characterizations of root exudates from rice (*Oriza sativa*) and their effects on the chemotatic response of endophytic bacteria. **Plant and Soil**, n. 249, p. 271 – 277, 2003.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* ge. Nov., sp., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 36, p. 86 – 93, 1986.

BALDANI, V. L. D. *et al.*. Localization of the N₂-fixing bacterium *Herbaspirillum seropedicae* within root cells of rice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 64, p. 431- 439, 1992.

BALDANI, J. I. Emended description of *Herbaspirillum*; a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 46, p. 802 – 810, 1996.

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, n. 3, p. 549 – 579, 2005.

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**, 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**, n. 29, p. 179 – 190, 2005.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, n. 108, p. 23 – 31, 1988.

CROZIER, A., ARRUDA, P., JASMIM, J.M., MONTEIRO, A.M.; SANDEBERG, G. Analysis of indole-3-acetic and related indoles in culture media from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 2833 – 2837, 1988.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107 – 149, 2003.

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, 1995, 60 p.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; RODRIGUES, L. S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região da baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1509 – 1517, 2001.

FERREIRA, D.F. Manual do Sistema SISVAR para análises estatísticas. Universidade Federal de Lavras, 2000. 66 p.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R.M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 39, p. 361 – 364, 1989.

HALDA-ALIJA, L. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus*L. **Cambridge Journal of Microbiology**, v. 49, n. 12, p. 781 – 787, 2003.

HAN, S.O.; NEW, P.B. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. **Microbial Ecology** n. 36, p. 193 – 201, 1998.

JIMENEZ-SALGADO, T., FUENTEZ-RAMIREZ, L.E., TAPIA-HERNANDEZ, A., MASCARUA-ESPARZA, M.A., MARTINEZ-ROMERO, E., CABALLERO-MELLADO, J.

Coffea Arabica L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3676 – 3683, 1997.

KNAUTH, S.; HUREK, T.; BRAR, D.; REINHOLD-HUREK, B. Influence of different *Oryza* cultivars on expression of *nifH* gene pools in roots of rice. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1725 – 1733, 2005.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 55, p. 417-430, 1983.

MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 394, p. 27 – 34, 2004.

MASCARUA-ESPARZA, M.A., VILLA-GONZALEZ, R., CABALLERO-MELADO, J. Acetylene reduction and indolacetic production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. **Plant and Soil**, n. 106, p. 91 – 95, 1988.

MUTHUKUMARASAMY, R., REVATHI, G., SESHADRI, S., LAKSHMINARASIMHAN, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, v. 83, n. 2, p. 137 – 145, 2002.

NEHL, D. B.; ALLEM, S. J.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, n. 5, p. 1 – 20, 1996.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J., BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, n. 242, p. 205 – 215, 2002.

ONA, O.; IMPE, J. V.; PRINSEN, E.; VANDERLEYDEN, J. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiology Letters**, n. 246, p. 125 – 132, 2005.

PEDRAZA, R. O.; RAMÍREZ-MATA, A.; XIQUI, M. L.; BACA, B. E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, n. 233, p. 15 – 21, 2004.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Applied microbiology and Biotechnology** , n. 10, p. 401 – 405, 1994.

ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiology Reviews**, n. 51, p. 365 – 379, 1987.

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

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

SUNDARAM, S.; KLUCAS, R.V. Characterization of azospirilla isolated from seeds and roots of turf grass. **Cambridge Journal of Microbiology**, n. 34, p. 212 – 217, 1988.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 24, p. 967-980, 1978.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análises de solo, plantas e outros materiais. Boletim Técnico nº 5, Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS. Porto Alegre, 1995. 174 p.

VALÉ, M., NGUYEN, C., DAMBRINE, E., DUPOUEY, J.L. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 37, p. 2329 – 2333, 2005.

ZAKHAROVA, E. A.; SHCHERBAKOV, A. A.; BRUDNIK, V. V.; SKRIPKO, N. G.; BULKHIN, N. S.; IGNATOV, V. V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*- Insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, n. 259, p. 572 – 576. 1999.

ZAMUDIO, M.; BASTARRACHEA, F. Adhesiveness and root hair deformation capacity of *Azospirillum* strains for wheat seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 6 p. 791 – 797, 1994.

6 INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E DESENVOLVIMENTO DE ARROZ IRRIGADO EM CÂMARA DE CRESCIMENTO

INOCULATION OF DIAZOTROPHIC BACTERIA AND DEVELOPMENT OF FLOODED RICE IN GREENHOUSE

6.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum* e três isolados de bactérias diazotróficas (UFSM-BD-14-06, UFSM-BD-31-06 e UFSM-BD-54-06) sobre três cultivares de arroz irrigado mais utilizadas no Estado do Rio Grande do Sul (IRGA – 417, IRGA – 419 e IRGA – 420). Dois experimentos foram realizados em câmara de crescimento: o primeiro em solução nutritiva com sementes desinfetadas superficialmente, e o segundo em solo e sementes não desinfetadas, utilizando-se delineamento experimental inteiramente casualizado. Avaliou-se altura de planta, massa fresca de planta inteira e parte aérea, massa seca de parte aérea e comprimento da raiz. No experimento conduzido em solução nutritiva observou-se que *A. lipoferum* e o isolado UFSM-BD-54-06 apresentaram melhores resultados quando inoculados em IRGA – 420. No experimento conduzido com solo, *A. brasilense* e o isolado UFSM-BD-31-06 foram determinantes de melhores incrementos em IRGA – 420. As diferenças observadas quanto ao efeito das diferentes bactérias entre plantas cultivadas em solução nutritiva e solo, podem ser devidas à competição estabelecida com outros microrganismos do solo, que podem favorecer ou limitar o crescimento das bactérias diazotróficas introduzidas pela inoculação.

Palavras-chave: arroz, *Azospirillum*, diazotróficas, inoculação, solução nutritiva, solo.

6.2 ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of inoculation of *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum* and three diazotrophic bacteria isolates (UFSM-BD-14-06, UFSM-BD-31-06 e UFSM-BD-54-06) upon three flooded rice cultivar used in Rio Grande do Sul

State (IRGA – 417, IRGA – 419 e IRGA – 420). Two experiments were performed in greenhouse: the first one in nutritive solution with surface disinfected seeds and the second one in soil with non disinfected seeds. The experiment was conducted in a randomized complete design. Height of plants, fresh mass of plant and the aerial part, dry mass of the aerial part and length of the rice root were evaluated. In the experiment with nutritive solution it was observed that *A. lipoferum* and the UFSM-BD-54-06 isolate showed greater results when inoculated in IRGA – 420 rice. In the experiment with soil, *A. brasilense* and the UFSM-BD-31-06 isolate were determining of greater increases in IRGA – 420 rice. The differences observed as to the effect of the bacteria among plants growth in nutritive solution and soil, can be because of the competition with soil microorganisms, that can favour or limit the growth of diazotrophic bacteria introduced by inoculation.

Key-words: *Azospirillum*; diazotrophic; inoculation; nutritive solution; rice, soil.

6.3 INTRODUÇÃO

Variedades de arroz de alto rendimento são desenvolvidas a cada ano, resultando em aumento substancial da produção, mas requerendo grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados, que, por sua vez, contribuem para a contaminação do solo e dos mananciais de água por nitratos (CHAINTREUIL et al., 2000). Por outro lado, a busca de métodos para uma agricultura sustentável tem incentivado os estudos com bactérias fixadoras de nitrogênio (ELBELTAGY et al., 2001).

A necessidade de adubação nitrogenada, a perda de nitrogênio para o ambiente, o alto custo de produção baseado em consumo de energia fóssil e os riscos de aplicação de nitrogênio são fatores que justificam a condução de pesquisas no sentido de utilizar bactérias capazes de fixar nitrogênio diretamente da atmosfera, reduzindo assim perdas para o ambiente, a poluição de águas, solos e o custo de produção (LADHA & REDDY, 2003).

Muitas bactérias, como *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Alcaligenes* e *Azospirillum* têm sido isoladas da rizosfera de arroz irrigado. O interesse tem se voltado para bactérias diazotróficas com habitat endofítico em gramíneas, devido a sua presença no interior dos tecidos vegetais e evidência significativa de fixação de nitrogênio (JAMES & OLIVARES, 1994; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998).

Bactérias do gênero *Azospirillum* colonizam a rizosfera de gramíneas, apresentando propriedades como quimiotaxia, aerotaxia, acumulação de substâncias de reserva (como polihidroxitirato), produção de promotores de crescimento vegetal, fixação de nitrogênio atmosférico e formação de cistos (FALLIK & OKON, 1996).

Estudos têm demonstrado que a inoculação com *Azospirillum* spp. aumentou o rendimento de muitos cereais no campo em mais de 30%, e maiores rendimentos foram obtidos em condições de câmara de crescimento (SUMNER, 1990; OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994). Mas, apesar dos resultados positivos, tem se verificado variações nos resultados, atribuídas a fatores ecológicos e ambientais, como condições químicas e físicas do solo, genótipo das bactérias e plantas hospedeiras, habilidade de estabelecimento e competição com a microflora nativa. Uma melhor compreensão da interação *Azospirillum*-planta poderia melhorar a eficácia de inoculantes que utilizam este microrganismo e permitir sua aplicação em larga escala no campo (DOBBELAERE et al., 2003).

A fixação biológica de nitrogênio por bactérias diazotróficas em leguminosas é evidenciada pela formação de nódulos. No entanto, nas gramíneas, como é o caso do arroz, não há nodulação, e, nesse caso, a averiguação da eficiência de FBN tem sido feita através da observação de parâmetros que indicam a capacidade das plantas de crescer e acumular nitrogênio (CAMPOS et al., 2003).

Os objetivo deste experimento foram avaliar por meio de parâmetros de crescimento das plantas, o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas sobre plantas de arroz em condições gnotobióticas (crescimento em solução nutritiva) e determinar a melhor associação microrganismo X cultivar para aplicar posteriormente a campo.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados em setembro e outubro de 2005, ao mesmo tempo, dois experimentos em câmara de crescimento, com as cultivares mais plantadas no RS (IRGA-417, IRGA-419 e IRGA-420). Os microrganismos *Azospirillum brasilense* (BR-11001) e *Azospirillum lipoferum* (BR 11080), cedidos pela EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica, RJ, e os isolados homólogos a estas espécies (isolados em meio NF): UFSM-BD-14-06 (3,31 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AIA, 7,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ N-total), UFSM-BD-31-06 (14,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AIA, 11,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$ N-total) e UFSM-BD-54-06 (4,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AIA, 9,53 $\mu\text{g mL}^{-1}$ N-total) foram utilizados na forma de

inoculante para as sementes. O experimento em solução nutritiva foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado, com nove repetições, em arranjo fatorial 6 X 3, com seis inoculações (sem bactérias, estirpes BR-11001 e BR-11080 e isolados UFSM-BD-14-06, UFSM-BD-31-06 e UFSM-BD-54-06) e três cultivares (IRGA-417, IRGA-419 e IRGA-420). O experimento em solo foi conduzido com o mesmo delineamento, com dez repetições, sendo que os tratamentos utilizados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Cultivares e microrganismos utilizados para avaliação do efeito da inoculação de bactérias diazotróficas sobre o desenvolvimento de cultivares de arroz irrigado sob condições de câmara de crescimento em solução nutritiva e solo. Santa Maria, 2005.

Tratamento	Cultivar	Microrganismo
1	IRGA-417	Sem inoculação
2	IRGA-419	Sem inoculação
3	IRGA-420	Sem inoculação
4	IRGA-417	<i>A. brasilense</i>
5	IRGA-419	<i>A. brasilense</i>
6	IRGA-420	<i>A. brasilense</i>
7	IRGA-417	<i>A. lipoferum</i>
8	IRGA-419	<i>A. lipoferum</i>
9	IRGA-420	<i>A. lipoferum</i>
10	IRGA-417	UFSM-BD-54-06
11	IRGA-419	UFSM-BD-54-06
12	IRGA-420	UFSM-BD-54-06
13	IRGA-417	UFSM-BD-31-06
14	IRGA-419	UFSM-BD-31-06
15	IRGA-420	UFSM-BD-31-06
16	IRGA-417	UFSM-BD-14-06
17	IRGA-419	UFSM-BD-14-06
18	IRGA-420	UFSM-BD-14-06

O primeiro experimento consistiu de sementes descascadas, desinfectadas, pré-germinadas, inoculadas e crescidas em solução nutritiva, para avaliar unicamente o efeito das bactérias, sem interferência de fatores ambientais, sobre o desenvolvimento das plântulas de arroz. No segundo experimento, foram utilizados os mesmos tratamentos, mas utilizando sementes com casca, não desinfectadas, crescidas em solo não esterilizado, para avaliar o efeito das bactérias inoculadas sobre as plântulas de arroz nas condições físicas e químicas normais do solo, bem como em competição com outros microrganismos presentes na própria semente e no solo.

6.4.1 Experimento em solução nutritiva

Após descascadas, as sementes foram desinfectadas superficialmente com hipoclorito acidificado, seguindo as etapas descritas por PINHEIRO (1992). As sementes foram então transferidas para placas de Petri contendo ágar-água a 1% previamente preparadas para solidificação e incubadas a 30° C no escuro por 72 horas para germinação.

Os microrganismos utilizados no experimento foram inoculados para crescimento por 96 horas em meio Digs conforme DÖBEREINER et al. (1995). Após, os meios contendo as células, foram centrifugados, e o sobrenadante foi vertido fora. Adicionaram-se então 20 mL de solução salina ($\text{NaCl } 8,5 \text{ g L}^{-1}$) para homogeneizar as células depositadas no fundo do tubo. Procedeu-se a leitura de densidade ótica (DO) das soluções, ajustando-as pela adição de solução salina até que se atingissem DO próxima de 1,0 a 535 nm, indicando a presença de 10^8 microrganismos mL^{-1} de solução, que foi utilizada como inoculante para as sementes. O inoculante assim elaborado foi armazenado em geladeira por 48 horas até sua utilização.

Para o preparo das unidades experimentais, frascos de vidro de 150 mL, contendo 30 mL de solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) modificada (sem nitrogênio), tampados com algodão e papel alumínio foram previamente esterilizados a 120° C por 20 minutos.

Após 72 horas de crescimento, com auxílio de uma pinça, as plântulas saudáveis foram cuidadosamente transferidas para as unidades experimentais. Procedeu-se à inoculação das plântulas com 1 mL da suspensão de células de bactérias diazotróficas (concentração de 10^8 células mL^{-1}). Os frascos permaneceram tapados com algodão, permitindo a troca de gases da atmosfera e atuando como barreira mecânica contra microrganismos externos. Permaneceram em câmara de crescimento com controle de temperatura a 28°C e fotoperíodo de 12 h. A coleta ocorreu aos 25 dias, quando surgiram os primeiros sinais de deficiência de nutrientes.

A solução de Hoagland modificada (sem nitrogênio) utilizada apresentava a seguinte composição: $0,136 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0,174 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $0,172 \text{ g L}^{-1} \text{ CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mL L^{-1} solução de micronutrientes ($2,86 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$, $1,81 \text{ mg L}^{-1} \text{ MnSO}_4$, $0,08 \text{ mg L}^{-1} \text{ CuSO}_4$, $0,02 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4$, $0,22 \text{ mg L}^{-1} \text{ ZnSO}_4$), 1 mL L^{-1} de solução de ferro ($1,21 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ e $0,60 \text{ g L}^{-1} \text{ FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água destilada).

Após a coleta, foram determinados a altura, a massa fresca da parte aérea, o comprimento de raiz e a massa fresca da planta inteira. Posteriormente foram secas em estufa a 60°C por 3 dias e determinada a massa seca.

6.4.2 Experimento em solo

As sementes utilizadas neste experimento não foram descascadas nem desinfectadas. Foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-água a 1% previamente preparadas para solidificação e incubadas a 30° C no escuro por 72 horas para germinação. O mesmo inoculante preparado para o experimento em solução nutritiva foi utilizado neste experimento, Copos de poliestireno com capacidade para 80 mL e contendo 30 g de solo seco e homogeneizado foram utilizados como unidades experimentais. A fim de manter condições próximas da realidade, foi utilizado solo Planossolo Hidromórfico Eutrófico arênico, não-esterilizado, proveniente de área de várzea sistematizada cultivada com arroz irrigado. A análise de solo apresentou 4,9 de pH em água (1:1), 1,1% de matéria orgânica (m/v) e 19% de argila (m/v). Sobre o solo foram cuidadosamente depositadas as plântulas saudáveis (crescidas por 72 horas como no experimento em solução nutritiva) com auxílio de uma pinça. Procedeu-se à inoculação das plântulas com 1 mL da suspensão de células de bactérias diazotróficas (concentração de 10^8 células mL⁻¹).

Os copos foram levados para câmara de crescimento com controle de temperatura a 28°C e fotoperíodo de 12 h. Diariamente, o nível de água na superfície do solo das unidades experimentais era restabelecido. A coleta ocorreu aos 26 dias, quando surgiram os primeiros sintomas de deficiência de nutrientes.

Após a coleta, foram determinados altura de plântulas, massa fresca da parte aérea, comprimento de raiz e massa fresca da planta inteira. Posteriormente, as plântulas foram secas em estufa a 60°C por 3 dias e determinada a massa seca.

6.4.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5%, utilizando-se os procedimentos disponíveis no programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.5.1 Crescimento de plântulas em solução nutritiva

Não foram observadas diferenças estatísticas para altura de plântulas, massa fresca de planta inteira e comprimento de raiz entre as diferentes cultivares utilizadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Altura, massa fresca de planta inteira e comprimento de raiz das plântulas de arroz irrigado inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas em solução nutritiva, aos 25 dias após transplântio (média de nove repetições). Santa Maria, 2005.

Cultivar	Altura de planta (cm)	Massa fresca planta inteira (mg)	Comprimento de raiz (cm)
IRGA-417	11,57 a*	99,02 a	7,17 a
IRGA-419	11,28 a	98,98 a	8,29 a
IRGA-420	12,00 a	106,26 a	7,75 a
CV (%) =	16,28	29,84	45,48

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

No entanto, entre os valores de massa fresca e de massa seca se observaram algumas diferenças estatísticas, com IRGA-417 apresentando menores valores em relação às demais cultivares (Tabela 3).

Tabela 3 – Massa fresca de parte aérea e massa seca de parte aérea das plântulas de arroz irrigado inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas em solução nutritiva aos 25 dias após transplântio (média de nove repetições). Santa Maria, 2005.

Cultivar	Massa fresca parte aérea planta (mg)	Massa seca da parte aérea planta (mg)
IRGA-417	44,48b*	9,18b
IRGA-419	48,95ab	11,05a
IRGA-420	55,07a	11,07a
CV (%) =	30,86	30,52

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Em todos os parâmetros avaliados, exceto comprimento da raiz principal, a cultivar IRGA-420 apresentou melhor desempenho, embora em alguns casos não houvesse diferença significativa em relação aos demais parâmetros.

Apesar da importância da fixação biológica de nitrogênio pelas bactérias diazotróficas, estudos têm demonstrado que a resposta dos cereais à inoculação é resultante da interação de cepas de bactérias diazotróficas com o genótipo das plantas (SALOMONE et al., 1996)

Quando avaliada a altura das plântulas nos diferentes tratamentos de inoculação (Tabela 4) verificou-se que a inoculação com *A. lipoferum* e UFSM-BD-54-06 determinaram valores estatisticamente superiores em todas as cultivares, além de UFSM-BD-14-06 determinar maior altura também em IRGA-420 em relação ao tratamento sem inoculação. Em todas as cultivares, UFSM-BD-31-06 determinou altura semelhante ao tratamento sem inoculação, mas a inoculação com os outros isolados e *A. brasilense* produziu aumento significativo da altura das plântulas.

Tabela 4 – Altura das plântulas de arroz irrigado inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas em solução nutritiva aos 25 dias após transplântio de acordo com o tratamento em cada cultivar (média de nove repetições). Santa Maria, 2005.

Tratamento	BR-IRGA-417	BR-IRGA-419	IRGA-420
Sem inoculação	9,11c*	10,00b	8,90c
<i>A. brasilense</i>	12,44ab	11,07ab	12,41ab
<i>A. lipoferum</i>	13,87a	12,88a	13,44a
UFSM-BD-14-06	10,95bc	11,52ab	13,94a
UFSM-BD-31-06	9,31c	9,51b	10,32bc
UFSM-BD-54-06	13,73a	12,71a	13,01a
CV (%)=16,28			

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

ITZIGSOHN et al. (1995) verificaram efeitos semelhantes, avaliando plântulas de girassol (*Helianthus annuus*) cultivadas por 21 dias em solução nutritiva, pois a inoculação com *A. brasilense* e *A. lipoferum* determinou altura de plântulas significativamente superiores ao tratamento controle. PAZOS & HERNANDEZ (2001) avaliaram a interação de cepas nativas do gênero *Azospirillum brasilense* com o cultivo de arroz e verificaram que a altura das plântulas foi estimulada em todos os tratamentos com inoculação em relação ao controle, atribuindo o estímulo à produção de hormônios promotores de crescimento vegetal e a excreção de nitrato por estes microrganismos.

Quando avaliado o comprimento da raiz, não houve resposta à inoculação na cultivar IRGA-417. No entanto, na cultivar IRGA-419 o comprimento de raiz foi superior quando inoculada com *A. lipoferum* e na cultivar IRGA-420 os isolados UFSM-BD-14-06 e UFSM-BD-54-06 determinaram respostas significativamente maiores, embora semelhantes aos tratamentos sem inoculação (Tabela 5). DIDONET et al (2003) avaliaram dez linhagens de arroz sob inoculação com *Azospirillum sp.* e verificaram que houve incremento no comprimento das raízes em relação ao tratamento controle, sendo que *A. brasilense* induziu maiores respostas no desenvolvimento das plântulas que *A. lipoferum*.

Tabela 5 – Comprimento de raiz das plântulas de arroz irrigado inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas em solução nutritiva aos 25 dias após transplântio de acordo com o tratamento em cada cultivar (média de nove repetições). Santa Maria, 2005.

Tratamento	IRGA-417 (cm)	IRGA-419 (cm)	IRGA-420 (cm)
Sem inoculação	8,53a*	7,41ab	6,82ab
<i>A. brasilense</i>	7,53a	8,63ab	8,35ab
<i>A. lipoferum</i>	7,34a	11,00a	8,03ab
UFSM-BD-14-06	6,40a	7,42ab	9,58a
UFSM-BD-31-06	4,40a	5,83b	4,34b
UFSM-BD-54-06	8,80a	9,42ab	9,40a
CV (%)= 45,48			

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Quanto à massa fresca das plântulas inteiras (parte aérea + raiz), não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tratamentos sobre as cultivares IRGA-417 e IRGA-419. Na cultivar IRGA-420, no entanto, a inoculação com *A. lipoferum* e os isolados UFSM-BD-14-06 e UFSM-BD-54-06 produziu valores estatisticamente superiores em relação ao tratamento sem inoculação, mas a inoculação com *A. brasilense* apresentou valor intermediário o tratamento sem inoculação e os maiores valores (Tabela 6).

Tabela 6 – Massa fresca das plântulas de arroz irrigado inteiras cultivadas em solução nutritiva e inoculadas com bactérias diazotróficas aos 25 dias após transplântio de acordo com o tratamento em cada cultivar (média de nove repetições). Santa Maria, 2005.

Tratamento	IRGA-417 (mg)	IRGA-419 (mg)	IRGA-420 (mg)
Sem inoculação	90,67a*	87,11a	76,22b
<i>A. brasilense</i>	95,00a	95,55a	108,22ab
<i>A. lipoferum</i>	121,22a	121,0a	133,22a
UFSM-BD-14-06	89,55a	99,78a	125,44a
UFSM-BD-14-06	88,11a	81,44a	74,00b
UFSM-BD-54-06	109,55a	109,00a	120,44a
CV (%)=29,84			

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

O incremento verificado na massa fresca das plântulas inteiras na cultivar IRGA-420 pode ser creditado a uma eficiente interação planta – bactéria na região da raiz, pois a inoculação com rizobactérias provoca um estímulo ao desenvolvimento do sistema radicular, com aumento do número de pelos radiculares, que por sua vez produz uma maior absorção de água e nutrientes (PAZOS & HERNÁNDEZ, 2001).

Os diferentes tratamentos de inoculação aplicados em IRGA-417 não apresentaram efeito sobre a massa fresca da parte aérea da cultivar, pois os valores não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 7).

Tabela 7. Massa fresca da parte aérea das plântulas de arroz irrigado cultivadas em solução nutritiva e inoculadas com bactérias diazotróficas aos 25 dias após transplântio de acordo com o tratamento em cada cultivar.

Tratamento	IRGA-417 (mg)	IRGA-419 (mg)	IRGA-420 (mg)
Sem inoculação	36,55a*	36,29b	34,33c
<i>A. brasilense</i>	39,55a	49,67ab	57,44ab
<i>A. lipoferum</i>	53,67a	58,89a	66,22a
UFSM-BD-14-06	38,67a	48,00ab	64,00ab
UFSM-BD-14-06	44,00a	43,11ab	44,11bc
UFSM-BD-54-06	54,44a	57,78a	64,33ab
CV (%) = 30,86			

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

No caso de IRGA-419, no entanto, verificou-se que a inoculação com *A. lipoferum* e com o isolado UFSM-BD-54-06 provocaram aumentos significativos da massa fresca da parte aérea, e em IRGA-420 apenas a inoculação com o isolado UFSM-BD-31-06 apresentou resultado semelhante ao tratamento sem inoculação, enquanto todos os outros tratamentos revelaram incrementos significativos sobre a massa fresca da parte aérea da cultivar quando inoculada. O comportamento do arroz IRGA-417 corrobora com os resultados obtidos por PERIN et al. (2003), que conduziram experimentos de inoculação de arroz com *A. brasilense* em solução nutritiva sob condições controladas e observaram que aos 12 dias após a inoculação, não houve diferença significativa entre tratamento controle e inoculado nos parâmetros massa fresca de raízes e de parte aérea.

Quando avaliada a massa seca da parte aérea das plântulas (Tabela 8), em IRGA-417 a inoculação com *A. lipoferum* e UFSM-BD-54-06 determinou diferença estatisticamente superior. Em IRGA-419, apenas *A. lipoferum* e em IRGA-420 todos, exceto o isolado UFSM-

BD-31-06, determinaram valores estatisticamente superiores aos obtidos no tratamento sem inoculação.

Tabela 8 – Massa seca da parte aérea das plântulas de arroz irrigado cultivadas em solução nutritiva e inoculadas com bactérias diazotróficas aos 25 dias após transplântio de acordo com o tratamento em cada cultivar (média de nove repetições). Santa Maria, 2005.

Tratamento	IRGA-417 (mg planta ⁻¹)	IRGA-419 (mg planta ⁻¹)	IRGA-420 (mg planta ⁻¹)
Sem inoculação	7,11b*	9,33b	7,78b
<i>A. brasilense</i>	8,22ab	10,44ab	12,22a
<i>A. lipoferum</i>	11,67a	13,89a	13,11a
UFSM-BD-14-06	7,67ab	11,22ab	14,11a
UFSM-BD-31-06	8,78ab	9,67ab	9,78ab
UFSM-BD-54-06	11,67a	11,78ab	13,22a
CV (%)=30,52			

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Efeitos positivos da inoculação de *A. brasilense* sobre a massa seca de plântulas de arroz, aos 20 dias, foram também obtidos por CURÁ et al. (2005), que consideram a atuação de *A. brasilense* benéfica para as plantas, pois liberam fitormônios, controlam o crescimento de patógenos presentes na rizosfera e fixam nitrogênio atmosférico, transformando-o em amônia facilmente assimilável pela planta. Um efeito considerável se observa sobre o sistema radicular, onde há desenvolvimento e aumento de raízes adventícias e pêlos absorventes, que são muito importantes para a absorção de fósforo.

Considerando que os valores de massa seca são atribuídos à maior capacidade do vegetal de absorver nutrientes do solo, este parâmetro pode ser útil para a seleção de estirpes que sejam boas produtoras em campo (RODRIGUES, 2004). Portanto, *A. lipoferum* e UFSM-BD-14-06 apresentaram os maiores valores absolutos de matéria seca quando inoculados em plantas de arroz crescidas em solução nutritiva, apresentando potencial para sua utilização como inoculante.

6.5.2 Crescimento de plântulas em solo

Os valores médios de altura e comprimento de raiz de plântulas não apresentaram diferença estatística entre as diferentes cultivares. Quanto a massa fresca das plântulas inteiras (parte aérea + raiz), massa fresca e massa seca de parte aérea (Tabela 9), verificaram-se diferenças significativas entre as cultivares. A cultivar IRGA-417 apresentou menores valores

para estes três parâmetros de avaliação e as cultivares IRGA-419 e IRGA-420 apresentaram valores estatisticamente superiores, exceto para massa fresca das plântulas inteiras, em que IRGA-419 apresentou valor intermediário entre as outras duas cultivares.

Tabela 9 – Altura, comprimento de raiz, massa fresca da plântula inteira, massa fresca e massa seca de parte aérea de plântulas de arroz irrigado inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas em solo, aos 26 dias após plantio (média de dez repetições). Santa Maria, 2005.

Cultivar	Altura (cm)	Comprimento de raiz (cm)	Massa fresca plântula inteira (mg)	Massa fresca parte aérea (mg)	Massa seca de parte aérea (mg)
IRGA-417	19,21a*	9,92a	141,88b*	77,37b	13,12b
IRGA-419	17,56a	10,00a	161,10ab	89,62a	15,45a
IRGA-420	17,63a	10,52a	171,57a	95,65a	16,15a
CV (%)	18,69	34,02	32,90	30,66	34,80

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Quando comparados os dados obtidos nos diferentes tratamentos de inoculação, sem considerar as cultivares de arroz, não se observam diferenças significativas nos valores de altura, massa fresca de parte aérea e comprimento de raiz principal. No entanto, valores estatisticamente diferentes são observados para massa fresca de plântula inteira e massa seca de parte aérea (Tabela 10), com a inoculação com *A. brasilense* determinando maiores valores e a inoculação com UFSM-BD-54-06 determinando menores valores para os dois parâmetros. O isolado UFSM-BD-14-06 determinou redução apenas da massa fresca de plântula inteira.

Tabela 10 – Altura, massa fresca parte aérea, comprimento de raiz, massa fresca da plântula inteira e massa seca de parte aérea de arroz irrigado inoculado com bactérias diazotróficas e cultivado em solo, aos 26 dias após transplântio de acordo com o tratamento, independente da cultivar (média de dez repetições). Santa Maria, 2005.

Tratamento	Altura (cm)	Massa fresca parte aérea (mg)	Comprimento de raiz (cm)	Massa fresca plântula inteira (mg)	Massa seca parte aérea (mg)
Sem inoculação	18,18a*	84,60a	10,04a	157,23ab	15,43ab
<i>A. brasilense</i>	17,56a	97,07a	10,28a	187,13a	16,90a
<i>A. lipoferum</i>	17,82a	87,53a	9,15a	159,03ab	14,80ab
UFSM-BD-14-06	18,01a	82,53a	10,92a	140,90b	13,73ab
UFSM-BD-31-06	19,15a	88,67a	11,40a	160,50ab	15,60ab
UFSM-BD-54-06	18,07a	84,87a	9,11a	144,30b	12,97b
CV (%)=	18,69	30,66	34,02	32,90	34,80

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p = 0,05$; teste Tukey).

Quando avaliados os valores de altura das plântulas nos diferentes tratamentos de inoculação (Tabela 10), verificou-se que apenas em IRGA-417 houve resposta à inoculação, com o isolado UFSM-BD-31-06 apresentando maior valor quanto a este parâmetro e *A. brasilense* determinando redução da altura das plântulas. Um excesso de produção de AIA pode ter ocasionado o efeito negativo.

Para IRGA-419 e IRGA-420 não se observaram diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos. A ausência de diferenças significativas decorrentes da inoculação pode ser devido à falta de interação entre os microrganismos e as cultivares utilizadas. DI CIOCCO & CÁCERES (1994) inocularam *Setaria itálica* com *A. brasilense* e *A. lipoferum* e observaram que a magnitude da resposta à inoculação com estes microrganismos depende da cultivar e da cepa utilizada. DIDONET et al (2003) inocularam dez linhagens de arroz de Terras Altas com *A. brasilense* e *A. lipoferum* e observaram que algumas linhagens não responderam à inoculação com aumento da altura e em uma linhagem a inoculação com *A. brasilense* apresentou negativo.

Tabela 10 – Altura das plântulas de arroz irrigado inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas em solo aos 26 dias após transplântio de acordo com o tratamento em cada cultivar (média de dez repetições). Santa Maria, 2005.

Tratamento	IRGA-417 (cm)	IRGA-419 (cm)	IRGA-420 (cm)
Sem inoculação	18,84ab*	18,19a	17,50a
<i>A. brasilense</i>	16,31b	18,09a	18,28a
<i>A. lipoferum</i>	19,15ab	17,43a	16,88a
UFSM-BD-14-06	20,40ab	16,41a	17,21a
UFSM-BD-31-06	21,16a	18,56a	17,74a
UFSM-BD-54-06	19,38ab	16,67a	18,16a
CV (%)=18,69			

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

SARWAR & KREMER (1995) compararam a produção de auxinas entre bactérias promotoras de crescimento (plant growth promoter rhizobacteria - PGPR) e rizobactérias de efeito inibidor (deleterious rhizobacteria – DRB) e verificaram que as últimas produziram altos níveis de auxinas, que por sua vez, inibiram o crescimento da raiz de *Convolvulus arvensis* L. Em experimento semelhante, utilizando *Lactuca sativa*, BARANZANI & FRIEDMAN (1999) verificaram também que PGPR secretaram baixos níveis da auxina ácido indolacético (AIA) em relação as DRB. Esses experimentos confirmam a hipótese de que a

concentração de AIA determina a extensão da inibição ou promoção do desenvolvimento das plantas.

Quando avaliado peso de massa fresca de plântula inteira em cada cultivar, observou-se que para IRGA-417 e IRGA-420 não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos de inoculação, mas na cultivar IRGA-419 houve efeito benéfico pela ação de *A. brasilense* e deletério para UFSM-BD-14-06 e UFSM-BD-54-06, ficando os outros tratamentos em valores intermediários (Tabela 11).

Tabela 13 – Massa fresca das plântulas de arroz irrigado inteiras inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas em solo aos 26 dias após transplântio, de acordo com o tratamento em cada cultivar (média de dez repetições). Santa Maria, 2005.

Tratamento	BR-IRGA-417 (mg planta ⁻¹)	BR-IRGA-419 (mg planta ⁻¹)	IRGA-420 (mg planta ⁻¹)
Sem inoculação	137,90a*	162,20ab	171,60a
<i>A. brasilense</i>	134,90a	214,10a	212,40a
<i>A. lipoferum</i>	155,40a	171,30ab	151,40a
UFSM-BD-14-06	145,10a	122,40b	155,20a
UFSM-BD-31-06	156,80a	151,40ab	173,30a
UFSM-BD-54-06	121,20a	145,20b	166,50a
CV (%)=32,90			

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Quando avaliada a massa fresca da parte aérea das plântulas (Tabela 12), observaram-se diferenças apenas em IRGA-419, cultivar em que a inoculação com *A. brasilense* determinou maior valor (111,80 mg planta⁻¹) e a inoculação com o isolado UFSM-BD-14-06 determinou o menor valor (72,30 mg planta⁻¹).

Tabela 12 – Massa fresca da parte aérea das plântulas de arroz irrigado inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas em solo aos 26 dias após transplântio de acordo com o tratamento em cada cultivar (média de dez repetições). Santa Maria, 2005.

Tratamento	BR-IRGA-417 (mg planta ⁻¹)	BR-IRGA-419 (mg planta ⁻¹)	IRGA-420 (mg planta ⁻¹)
Sem inoculação	76,80a*	88,10ab	88,90a
<i>A. brasilense</i>	67,10a	111,80a	112,30a
<i>A. lipoferum</i>	82,20a	93,80ab	86,60a
UFSM-BD-14-06	86,90a	72,30b	91,40a
UFSM-BD-31-06	85,70a	86,80ab	93,50a
UFSM-BD-54-06	68,50a	84,90ab	101,20a
CV (%)=30,66			

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

No caso de massa fresca, seja de planta inteira ou de parte aérea, as cultivares IRGA – 417 e IRGA – 420 não apresentaram diferenças significativas para estes parâmetros. A ausência de diferenças significativas nestas cultivares pode estar relacionada com a ausência de interação entre planta e bactéria, decorrente de características genéticas específicas da planta, como produção de exsudatos radiculares, ou da ação do microrganismo inoculado, como competição com outros microrganismos presentes no solo ou falta de algum nutriente específico para estabelecer a interação (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000).

Na cultivar IRGA – 419, no entanto, os mesmos fatores podem ter facilitado a colonização da raiz, induzindo os efeitos observados por conta da inoculação com *A. brasilense*. Por outro lado, verificou-se atuação negativa dos isolados UFSM-BD-14-06 e UFSM-BD-54-06 sobre a massa fresca da planta inteira e de UFSM-BD-14-06 sobre a massa fresca da parte aérea na mesma cultivar pode ser explicada por um possível efeito antagonista a outros microrganismos, inclusive presença de cepas nativas de *A. brasilense*, que poderiam vir a beneficiar a cultivar.

PERIN et al. (2003) conduziram experimento com inoculação de diferentes microrganismos diazotróficos em arroz e verificaram que não houve diferença significativa entre inoculação com *A. brasilense* e controle não inoculado aos 12 dias após a inoculação sobre a massa fresca da parte aérea, tal como ocorreu com IRGA-417 e IRGA-420 neste experimento. Por outro lado, ITZIGSOHN et al (1995) inocularam *A. brasilense* e verificaram efeito significativamente positivo sobre a massa fresca da parte aérea de plântulas de girassol, sendo que PERIN et al. (2003), utilizando a mesma espécie de microrganismo, verificaram efeitos benéficos sobre as plântulas de milho. Comportamentos similares foram observados no presente experimento com inoculação de *A. brasilense* na cultivar IRGA-419.

Nenhuma cultivar utilizada apresentou resposta a inoculação quanto ao comprimento de raiz principal (Tabela 13). Resultado semelhante foi obtido por PERIN et al. (2003), onde a inoculação de arroz com *A. brasilense* não apresentou efeito claro sobre a massa fresca das raízes em relação ao tratamento controle não inoculado. DIDONET et al. (2003) inocularam dez diferentes linhagens de arroz com *A. brasilense* e *A. lipoferum* e algumas destas linhagens também não apresentaram maior comprimento de raiz em relação ao tratamento sem inoculação.

Tabela 13 – Comprimento de raiz principal de plântulas de arroz irrigado inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas em solo aos 26 dias após transplântio de acordo com o tratamento em cada cultivar (média de dez repetições). Santa Maria, 2005.

Tratamento	IRGA-417 (mg)	IRGA-419 (mg)	IRGA-420 (mg)
Sem inoculação	8,69a*	10,20a	11,23a
<i>A. brasilense</i>	9,03a	10,45a	11,35a
<i>A. lipoferum</i>	10,01a	8,92a	8,52a
UFSM-BD-14-06	10,65a	11,08a	11,03a
UFSM-BD-31-06	12,05a	10,99a	11,16a
UFSM-BD-54-06	9,11a	8,38a	9,83a
CV (%)=34,02			

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

SALA et al. (2005) verificaram que a inoculação de diversas bactérias diazotróficas endofíticas produziu comprimento de raiz principal significativamente maior em alguns genótipos de trigo e reduziu o comprimento em outros genótipos. OKON & KAPULNIK (1986) conduziram estudo sobre a morfologia das raízes de milho inoculadas com *A. brasilense* e verificaram que este microrganismo causa alterações morfológicas na raiz logo após a germinação. Durante as três primeiras semanas após a germinação aumentam o número de pelos radiculares e de raízes laterais nas plantas inoculadas, mas não se altera o peso da raiz. A massa seca radicular aumenta em estágios posteriores. Tal argumentação pode ser válida para o arroz, já que foi colhido em 3,5 semanas no presente trabalho.

Quando avaliada a massa seca da parte aérea, não foi verificada resposta à inoculação na cultivar IRGA-417. No entanto, nas cultivares IRGA-419 e IRGA-420 foram observadas diferentes respostas, com *A. brasilense* determinando maiores valores em ambas cultivares. No entanto, a inoculação com o isolado UFSM-BD-14-06 determinou apresentou menores valores em IRGA-419 e com *A. lipoferum* em IRGA-420 (Tabela 14).

Tabela 14 – Massa seca da parte aérea das plântulas de arroz irrigado inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas em solo aos 26 dias após transplântio de acordo com o tratamento em cada cultivar (média de dez repetições). Santa Maria, 2005.

Tratamento	IRGA-417 (mg)	IRGA-419 (mg)	IRGA-420 (mg)
Sem inoculação	13,20a*	16,00ab	17,10a
<i>A. brasilense</i>	10,40a	19,90a	20,40a
<i>A. lipoferum</i>	15,10a	16,00ab	13,30a
UFSM-BD-14-06	13,60a	12,10b	15,50a
UFSM-BD-31-06	15,70a	15,10ab	16,00a
UFSM-BD-54-06	10,70a	13,60ab	14,60a
CV (%)=34,80			

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Nenhuma das diferentes inoculações apresentou efeito sobre a massa seca das plantas de IRGA-417. Mas em IRGA-419, quando inoculado com *A. brasilense*, a massa seca apresentou maior valor em relação aos outros tratamentos, e quando com o isolado UFSM-BD-14-06, apresentou menores valores. Em IRGA-420, novamente *A. brasilense* determinou maiores valores. Os resultados corroboram com os dados fornecidos por BASHAN (1999), o qual relata que a inoculação de plantas de algodão com *A. brasilense* aumenta o crescimento de pelos radiculares e o número de raízes laterais, resultando em incremento significativo de massa das plantas sob condições de casa de vegetação. Por outro lado, a redução de massa seca produzido por *A. lipoferum* em IRGA-420 não era esperada, pois vários experimentos de inoculação com este microrganismo têm revelado efeitos positivos sobre plantas de arroz tanto em casa de vegetação quanto no campo (KENNEDY et al., 2004).

O fato de *A. brasilense* determinar incremento significativo sobre a massa seca das plântulas das cultivares IRGA-419 e IRGA-420 em relação ao tratamento sem inoculação, pode ser devido a eficiência da associação planta-bactéria no acúmulo de biomassa, como sugerido por BALDANI & DÖBEREINER (1980) ao avaliar experimentos com trigo.

Os dados obtidos com o crescimento de arroz em solução nutritiva, apresentaram IRGA-420 como a cultivar com melhor resposta à inoculação e *A. lipoferum* e o isolado UFSM-BD-54-06 com melhores efeitos sobre as plântulas de arroz. Nestas condições, não houve interferência de fatores ambientais, como alterações de pH, temperatura e competição com outros microrganismos. Foi possível avaliar apenas o efeito de cada microrganismo por cultivar. No entanto, na prática não sucede desta forma. Os microrganismos estão sujeitos a diversos fatores adversos presentes no solo até que colonizem a rizosfera de uma planta.

Quando os mesmos tratamentos foram conduzidos em unidades experimentais com solo, as cultivares IRGA-419 e IRGA-420 apresentaram bom desempenho, e entre as bactérias inoculadas, *A. brasilense* foi quem proporcionou maior efeito sobre os parâmetros de crescimento das plantas. *A. brasilense* é considerada uma espécie agressiva em relação aos outros microrganismos que habitam a rizosfera. Isso se confirma em relação a *A. lipoferum*, que foi capaz de atuar sobre a planta quando em solução nutritiva, mas não manteve o mesmo efeito em solo. *A. brasilense*, por sua vez, embora não estimulado pelas ótimas condições da solução nutritiva, encontrou ambiente de competição no solo que lhe favoreceu quando na rizosfera da cultivar IRGA-420, que certamente produziu exsudatos radiculares que favoreceram seu estabelecimento (VALÉ et al, 2005).

Dentre os isolados utilizados UFSM-BD-14-06, UFSM-BD-31-06 e UFSM-BD-54-06, apesar de semelhantes estatisticamente a *A. brasilense* e *A. lipoferum*, o isolado UFSM-BD-31-06 foi quem determinou maiores valores de massa seca nas cultivares, confirmando a possibilidade de escolher isolados *in vitro* pela sua capacidade de produção de auxinas em meio de cultura, embora quanto a fixação biológica de nitrogênio “*in vitro*”, o isolado apresentou valores menores que *A. brasilense* e *A. lipoferum*. No entanto, apesar de produzir grande quantidade de auxinas “*in vitro*”, superior inclusive a *A. brasilense* e *A. lipoferum*, em condições controladas de crescimento no solo não foi capaz de determinar efeitos superiores a estes sobre as plantas, indicando que não é apenas a produção de auxinas que determina o efeito benéfico de um isolado sobre as plantas.

6.6 CONCLUSÕES

Plântulas de arroz irrigado IRGA-420, quando cultivadas em solução nutritiva e inoculadas com *A. lipoferum* e o isolado UFSM-BD-14-06 aumentam a produção de massa seca. Quando cultivadas em solo, novamente as plântulas de IRGA-420 apresentaram os maiores valores de massa seca sob inoculação com *A. brasilense* e UFSM-BD-31-06.

6.7 REFERÊNCIAS

BALDANI, V L. D.; DÖBEREINER, J. Host – plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum*. **Soil Biology & Biochemistry**, n. 12, p. 433 – 439, 1980.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 10, p. 2397-2406, 1999.

BASHAN, Y. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, p. 246-256, 1999.

CAMPOS, D. B.; RESENDE, A. S.; ALVEZ, B. J.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura de arroz sob inundação. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 41-46, 2003.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y. *et al.* Photosynthetic Bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5437 – 5447, 2000.

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**, marzo, p. 10 – 12, 2005,

DI CIOCCO, C. A.; CÁCERES, E. A. R. Field inoculation of *Setaria italica* with *Azospirillum* spp. in Argentine humid pampas. **Field Crops Research**, v. 37, n. 3, p. 253-257, jun. 1994.

DIDONET, A. D.; MARTIN-DIDONET, C. C. G.; GOMES, G. F. Avaliação de linhagens de arroz de terras altas inoculadas com *Azospirillum lipoferum* Sp59b e *A. brasilense* Sp24. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, n. 69, dez. 2003.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107 – 149, 2003.

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, 1995, 60 p.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T. *et al.* Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5285 – 5293, 2001.

FALLIK, E.; OKON, Y. inoculants of *Azospirillum* brasilense: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 1, p. 123-126, 1996.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema SISVAR para análises estísticas**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000. 66p

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D.T. **Circular 37**, Agriculture Experiment Station. University of California, Berkely, U.S.A., 1950.

ITZIGSOHN, R.; ABBASS, Z.; SARIG, S.; OKON, Y. Inoculations effects of *Azospirillum* on sunflowers (*Helianthus annuus*) under different fertilization and irrigation regimes. In: FENDRIK, I.; GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. *Azospirillum VI and related microorganisms*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. p. 503-513.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 77-119, 1994.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promoting be better exploited. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 36, p. 1229-1244, 2004.

LADHA, J. K.; REDDY, P. M. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant and Soil**, n. 242, p. 205 -215, 2003.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n.12, p. 1591 – 1601, 1994.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. **Plant and Soil**, v. 30, n. 1-3, 1986.

PAZOS, M.; HERNÁNDEZ, A. Evaluación de cepas nativas del género *Azospirillum* y su interacción con el cultivo del arroz. **Cultivos Tropicales**, v. 22, n. 4, p. 25-28, 2001.

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**, v. 37, n. 2, p. 47-53, 2003.

PINHEIRO, R. O. **Investigação da adesão de *Azospirillum* spp. às raízes de trigo**. 1992. 110 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1992.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of Gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 1, p. 29-54, 1998.

RODRIGUES, E. P. **Caracterização fisiológica de estirpes de *Azospirillum amazonense* e avaliação dos efeitos da inoculação em plantas de arroz inundado (*Oriza sativa* L.)**. 2004. 66f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 29, p. 345 – 352, 2005.

SALOMONE, I. G.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 193 – 196, 1996.

SALOMONE, I. E. G.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p. 249-256, 1996.

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

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 42, p.487 - 506, 2000.

SUMMER, M. E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Sciences**, v. 12, p. 54-123, 1990.

VALÉ, M.; NGUYEN, C.; DAMBRINE, E. DUPOUEY, J. L. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 37, p. 2329 – 2333, 2005.

7 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM ARROZ IRRIGADO SOB DIFERENTES DOSES DE ADUBO NITROGENADO E INOCULAÇÃO

DIAZOTROPHIC BACTERIA IN FLOODED RICE UNDER DIFFERENTS DOSES OF N-FERTILIZER AND INOCULATION

7.1 RESUMO

O presente experimento foi conduzido com objetivo de verificar os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas (*Azospirillum brasilense* e isolado UFSM-BD-31-06) sobre o desenvolvimento e produtividade da cultivar do arroz IRGA – 420, devido à importância desta cultivar no cultivo de arroz irrigado no Estado do Rio Grande do Sul, bem como avaliar a ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas por meio de quantificação, utilizando meios seletivos NFb (para *Azospirillum brasilense/A. amazonense*), JNFb (para *Herbaspirillum*), LGI (*A. amazonense*) e LGI-P (*Gluconacetobacter*). O arroz IRGA-420 foi cultivado em campo sob diferentes doses de nitrogênio (0, 60 e 120 kg N ha⁻¹), e inoculações (testemunha, *A. brasilense* e isolado UFSM-BD-31-06), com delineamento experimental em blocos ao acaso e três repetições. Raízes das plantas foram coletadas aos 40 dias após a semeadura (DAS), 90 DAS e 120 DAS, esterilizadas superficialmente, a fim de obter contagem de diazotróficos endofíticos pelo método do Número Mais Provável (NMP). Foram avaliados altura, massa fresca e seca, comprimento e volume radicular, e N-total das amostras. Ao final do ciclo, as plantas foram colhidas e foi calculado o rendimento em grãos de cada tratamento. Os resultados apresentaram altas populações de bactérias diazotróficas endofíticas nas raízes (10⁵ a 10⁸ UFC g⁻¹), exceto para contagem em meio LGI-P na primeira (10² a 10⁶ UFC g⁻¹) e segunda coletas (10³ a 10⁸ UFC g⁻¹). Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos e nem entre as épocas de coleta. A inoculação de arroz IRGA-420 com bactérias diazotróficas não determinou diferenças significativas entre os parâmetros de crescimento vegetal analisados, mas foi observado um incremento importante na produtividade da cultivar, que variou entre 8 e 32%. A inoculação com *A. brasilense* e com o isolado UFSM-BD-31-06 apresentou efeitos positivos sob diferentes dose de nitrogênio aplicadas. *A. brasilense* apresentou redução do incremento da produtividade (26,91%, 21,97%

e 12,84%) com o aumento da dose de nitrogênio aplicada, e o isolado UFSM-BD-31-06 apresentou incremento semelhante em 0 e 60 kg N ha⁻¹ (aproximadamente 17%), mas um alto incremento (31,85%) quando aplicada dose de 120 kg N ha⁻¹.

Palavras-chave: arroz; diazotróficos; endofíticos; fixação biológica de nitrogênio; inoculação.

7.2 ABSTRACT

This experiment was performed with the aim to verify the effects of diazotrophic bacteria inoculation (*Azospirillum brasilense* and UFSM-BD-31-06 isolate) upon the development and productivity of the flooded rice cultivar IRGA – 420, because of their importance in rice culture in Rio Grande do Sul State, and evaluate the occurrence, quantify and diversify of endophytic diazotrophic bacteria, utilizing selective medium NFB (*Azospirillum brasilense/A. amazonense*), JNFb (*Herbaspirillum*), LGI (*A. amazonense*) and LGI-P (*Gluconacetobacter*). The rice cultivar IRGA-420 was cultivated under different doses of nitrogen (0, 60 e 120 kg N ha⁻¹), different inoculations (control, *A. brasilense* and UFSM-BD-31-06 isolate), with randomized complete block design with and three replication. Roots of plants were collected at 40, 90 and 120 days after seedling, were superficially desinfected, in order to obtaining the number of endophytic diazotrophics by the most probable number (MPN). Height, fresh and dry mass, length and volume root, and total-N of the sample were evaluated. At the end of the cycle, the plants were harvested and the yield in grains was calculated in each treatment and the increase regarding uninoculated and unfertilizer treatment. The results presented greater populations of endophytic diazotrophic bacteria in root (10⁵ a 10⁸ UFC g⁻¹), except to enumerate in LGI-P medium in first (10² a 10⁶ UFC g⁻¹) and second collects (10³ a 10⁸ UFC g⁻¹). Significant differences between the average of treatments were not found, and between collects times neither. The rice IRGA-420 inoculation with diazotrophic did not determined significant differences between the growth plant parameters analysed, but an important increase in the productivity of cultivar was observed, which had a variably between 8 and 32%. The *A. brasilense* inoculation and UFSM-BD-31-06 isolate inoculation exhibited positive effects under different doses of the N-fertilizer applied. *A. brasilense* exhibited reduction of the increased of productivity (26,91%,

21,97% e 12,84%) with the increase of the N-fertilizer dose applied, and the UFSM-BD-31-06 isolate exhibited similar increase in 0 e 60 kg N ha⁻¹ (aproximately 17%), but a great increase when applied doses of 120 kg N ha⁻¹ (31,85%).

Key-words: biological nitrogen fixation, diazotrophic, endophytic, inoculation, rice.

7.3 INTRODUÇÃO

O arroz é uma cultura importante no sul do Brasil. Segundo dados da CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2006), na safra 2005/2006 foram colhidas 6.431.300 toneladas de arroz em uma área de 1.018,1 mil hectares, com produtividade média de 6.317 kg ha⁻¹. LOPES (2005) considera que há potencial para produção de até 10 t ha⁻¹ de arroz, desde que a pesquisa busque aumento de produtividade e redução de custos de produção.

As doses de nitrogênio recomendadas para a cultura de arroz no Rio Grande do Sul variam de acordo com a cultivar utilizada e a quantidade de matéria orgânica presente no solo. Para solos com baixo teor de matéria orgânica (inferior a 2,5%), como é o caso de grande parte da área cultivada com arroz irrigado no Estado, as recomendações são de 120 kg ha⁻¹ ano para as cultivares modernas. A necessidade de adubação nitrogenada, a perda de nitrogênio para o ambiente e o alto custo de produção e aplicação de nitrogênio são fatores que justificam a condução de pesquisas no sentido de utilizar bactérias capazes de fixar nitrogênio diretamente da atmosfera, reduzindo assim as perdas para o ambiente, a poluição de águas e solos e o custo de produção (SMIL, 1997). Considerando esses fatores, alternativas capazes de reduzir o uso deste insumo e proporcionar boa produtividade, apresentam importante repercussão social e econômica.

A interação de bactérias diazotróficas com diversas culturas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao potencial evidenciado na melhoria da produção das culturas e, conseqüentemente, na redução dos custos de produção ao diminuir a quantidade de adubos nitrogenados aplicados. Apesar das contribuições na fixação biológica de nitrogênio terem sido verificadas inicialmente em leguminosas, plantas da família *Graminae* utilizadas em diversos experimentos têm apresentado potencial significativo, respondendo com aumento na produção quando inoculadas com bactérias diazotróficas. Várias espécies destes gêneros

foram identificadas em associação com plantas de arroz, mas são necessários mais estudos sobre sua diversidade e comportamento nessa cultura (BALDANI *et al.*, 2002, PENG *et al.*, 2002, ELBELTAGY *et al.*, 2001).

A compreensão da ação das bactérias diazotróficas sobre a cultura de arroz depende de estudos que demonstrem as particularidades de associações destas a cultivares específicas, de acordo com as condições ambientais e estádios de desenvolvimento do vegetal, o que pode auxiliar a compreensão do papel ecológico desses microrganismos nos agroecossistemas (BARRAQUIO *et al.*, 1997).

Várias espécies de bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de colonizar a raiz dos vegetais. São por isso, chamadas associativas, como é o caso de *A. brasiliense* (TARRAND *et al.*, 1978), *A. lipoferum* (TARRAND *et al.*, 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES *et al.*, 1983) e *A. irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1991). Outras bactérias diazotróficas, capazes de colonizar o interior da raiz e partes aéreas das plantas, permitem a sobrevivência da planta em solos pobres e promovem benefícios à mesma. São as endofíticas, pertencentes aos gêneros *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Azoarcus* (BALDANI *et al.*, 2002). As bactérias endofíticas colonizam de diversas formas as plantas, formando relações não-patogênicas com seus hospedeiros. Quando as relações estabelecidas são benéficas, estimulam o crescimento da planta, aumentam a resistência a doenças, melhoram a habilidade da planta de resistir ao estresse ambiental e/ou aumentam a fixação de nitrogênio atmosférico (STURZ & NOWAK, 2000). Trabalhos conduzidos na última década têm se preocupado em identificar bactérias endofíticas entre as abundantes e variadas populações de muitas plantas, como batata, milho, trigo, sorgo, cana-de-açúcar e arroz (BENT & CHANWAY, 2002), utilizando métodos experimentais, como microscopia eletrônica e biologia molecular.

Apesar da grande produção de arroz no Rio Grande do Sul, pouco da tecnologia de inoculação de microrganismos diazotróficos tem sido aplicada no campo, enquanto países como Egito, México, Argentina e Uruguai fazem amplo uso de bactérias diazotróficas como inoculante e apresentam resultados de aumento de produção. Tanto em casa de vegetação como em campo, são verificados resultados que podem chegar a 50% de incremento na produção quando esses microrganismos são inoculados (BALDANI *et al.*, 2002). No entanto, esses resultados são influenciados pela variedade do vegetal, estágio fisiológico do vegetal, tipo de solo, atuação ou interferência de outros componentes da microbiota e competitividade (STURZ & NOWAK, 2000).

BISWAS et al. (2000) e PENG et al. (2002), conduzindo seus experimentos nas Filipinas, verificaram que a inoculação de arroz irrigado com estirpes de *Rhizobium leguminosarum* produziu ganho substancial em biomassa. BALDANI et al. (2000) inocularam arroz com cepas de *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1984) e *Burkholderia* spp., verificando que é possível obter um aumento de rendimento de arroz entre 20 e 30%.

Quanto aos sistemas de produção agrícola, o sucesso na utilização de bactérias diazotróficas está relacionado à habilidade de selecionar, incorporar e manter populações benéficas no campo. A rotação de culturas e a forma de manejo da lavoura podem influenciar as populações microbianas do solo, sendo que se busca o desenvolvimento de sistemas de produção que beneficiem as populações de diazotróficos. Aplicações de protetores vegetais químicos, por sua vez, reduzem a quantidade e a qualidade de populações microbianas específicas (STURZ & NOWAK, 2000).

Grande variabilidade tem sido verificada nos resultados de inoculação de bactérias diazotróficas nas culturas. OKON & LABANDERA-GONZALEZ (1994) realizaram revisão dos experimentos de inoculação de *Azospirillum* publicados, e verificaram que 60-70% obtiveram sucesso, com rendimentos estatisticamente significativos, variando entre 5 e 30%. Estudos realizados mediante inoculação de bactérias diazotróficas em arroz apresentaram fixação de 17 – 19% de nitrogênio atmosférico em relação ao total fixado. No campo, esse incremento pode chegar próximo a 50% (BALDANI et al., 2000). No entanto, não se conhece até o momento a forma de ação das bactérias diazotróficas colonizadoras de variedades de arroz cultivadas no Rio Grande do Sul, como seu potencial fixação de nitrogênio, produção de substâncias promotoras de crescimento, colonização das raízes e, conseqüentemente, sua participação no aumento da produtividade do arroz.

O presente experimento foi conduzido com objetivo de verificar os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas (*Azospirillum brasilense* e isolado UFSM-BD-31-06) sobre as bactérias diazotróficas endofíticas presentes nas raízes e sobre os parâmetros desenvolvimento e produtividade da cultivar do arroz irrigado IRGA – 420, escolhida devido à sua importância no cultivo de arroz irrigado no Estado do Rio Grande do SUL.

7.4 MATERIAL E MÉTODOS

7.4.1 Inoculação, preparo das sementes e cuidados culturais

Para preparo do inoculante, foi utilizada uma estirpe padrão de *Azospirillum brasilense* (BR 11101) cedido pela EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica, RJ e um isolado denominado UFSM-BD-31-06, que apresentaram bom desempenho em estudos prévios em câmara de crescimento, que foi realizada a fim de selecionar estirpes para aplicação em campo. O inoculante foi preparado utilizando-se o meio nutritivo Digs para crescimento das estirpes, contendo em média 10^8 bactérias mL⁻¹ inoculante. Um volume de 12 mL de cada inoculante foi aplicado sobre 120 g de sementes de arroz da cultivar IRGA-420 não esterilizadas, que secaram em estufa a 35° C por 3 horas.

As sementes inoculadas e secas foram então semeadas em solo Planossolo Hidromórfico Eutrófico arênico, em área de várzea sistematizada do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (RS), em 04/11/2005. A análise de solo apresentou pH 5,1, percentual de matéria orgânica de 2,4 e 17% de argila. Foi empregado o sistema convencional de cultivo com densidade de semeadura de 120 kg ha⁻¹.

A distância entre as linhas de semeadura de 17 cm, utilizando-se para o experimento área total de 270 m² (45 x 6 m). Imediatamente após a semeadura, foi aplicado adubo NPK 5-20-30 na dose de 300 kg ha⁻¹. Não foi aplicada fonte de nitrogênio nesse período. Doses de 60 e 120 kg ha⁻¹ de nitrogênio, na forma de uréia comercial, foram aplicadas em duas épocas, aos 30 e 40 dias após a semeadura (03/12/2006 e 11/01/2006).

Durante o ciclo de crescimento da cultura não foram aplicados fungicida nem herbicida, a fim de eliminar possíveis interferências dos referidos produtos sobre as bactérias inoculadas. A semeadura ocorreu em solo drenado, com entrada de água em 27/11/2005 (23 dias após a semeadura). As parcelas foram divididas por taipas e fechadas após entrada de água para evitar mistura de água entre as parcelas com diferentes doses de nitrogênio e inoculação.

7.4.2 Coleta a análise das amostras

O experimento foi acompanhado pela contagem do número de bactérias diazotróficas endofíticas e analisando diversos parâmetros obtidos em três diferentes épocas de coleta. A primeira coleta ocorreu aos 40 dias após a semeadura (DAS), na fase de perfilhamento das plântulas de arroz, a segunda aos 90 DAS, na fase de formação do primórdio floral e a terceira aos 120 DAS. De cada parcela foram retiradas, ao acaso, três plantas inteiras, para determinação da altura (cm), massa fresca (g) e comprimento (cm) e volume de raiz (g). Foram extraídas as raízes das plantas para realização da contagem de bactérias diazotróficas. O processo de preparo das raízes para contagem ocorreu no mesmo dia da coleta.

Para a contagem da população de bactérias diazotróficas endofíticas, utilizou-se o método descrito por DÖBEREINER et al. (1995), que consiste em lavar as raízes de arroz em água corrente, retirar 15 g, secar e desinfetar superficialmente. A desinfecção superficial segue as seguintes etapas: imersão das raízes por 10 minutos em cloramina-T a 1% ($C_7H_7ClNNaO_2S_3H_2O$), 10 minutos em água destilada estéril, 10 minutos em tampão fosfato e 10 minutos em água destilada estéril. Após, 10 g de raízes secas foram trituradas com 90 mL de solução salina ($8,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$) e então realizaram-se diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-7} , transferindo sucessivamente 1 mL da suspensão de cada diluição para frascos contendo 9 mL de solução salina. De cada uma das diluições, alíquotas de 100 μL foram inoculadas em triplicata, em frascos contendo 5 mL dos meios semi-sólidos sem fonte nitrogenada, NFB para *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*, JNFb para *Herbaspirillum* spp. (DÖBEREINER et al., 1995), JMV para *Burkholderia* (BALDANI, 1996), LGI para *A. amazonense* e LGI-P para *Gluconacetobacter* spp. (DÖBEREINER et al., 1995).

Três frascos por diluição foram incubados a 30°C por 7 dias, sendo considerados positivos para contagem os frascos que apresentaram uma película aerotóxica típica próxima da superfície do meio. A contagem da população de bactérias diazotróficas foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP). Utilizou-se a tabela de McCrady (DÖBEREINER et al., 1995) para determinar, pelo método estatístico, a população de bactérias presentes nas amostras de raízes.

Após secagem em estufa a 60° C por três dias da parte aérea de cada amostra, foi determinada a massa seca (g) e uma porção de aproximadamente 0,5 g foi processada para análise do teor de N-total (%) pelo método Kjeldhal (TEDESCO et al., 1995). Por ocasião da

3ª coleta, não foram avaliadas as raízes, devido à dificuldade de retirar raízes inteiras de arroz, característica da espécie vegetal, em que as raízes se entrelaçam. Aos 135 DAS, foi realizada a colheita e triagem do arroz, do qual se avaliou o rendimento em grãos. Para a avaliação do rendimento em grãos das parcelas do experimento, as amostras referentes à coleta de 1 m² de cada parcela foram triadas e seus volumes pesados. Foram retiradas as impurezas em limpador Intecnial – Model de porções de 300 g de cada amostra, e após pesagem do volume resultante, procedeu-se à determinação de umidade, para então calcular-se o rendimento em grãos do arroz com base em 13% de umidade.

7.4.3 Delineamento experimental

O experimento foi estruturado em delineamento de blocos ao acaso, com três repetições e com bifatorial (bactérias e doses de N), com três repetições. Foram aplicados três tratamentos com bactérias (controle, *Azospirillum brasilense* e isolado UFSM-BD-31-06) e três doses de nitrogênio na forma de uréia (0, 60 e 120 kg ha⁻¹).

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). Na análise de variância foi aplicado teste de Tukey com nível de significância de 5% e os dados transformados para log₁₀.

7.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.5.1 Número de bactérias presentes nas raízes do arroz irrigado IRGA-420

Os resultados do levantamento da ocorrência de bactérias diazotróficas associadas às raízes do arroz IRGA-420 cultivado em campo revelaram a presença de bactérias relacionadas a *Azospirillum brasilense/ lipoferum* (meio NFb), *Herbaspirillum* (meio JNFb), *A. amazonense* (meio LGI) e *Gluconacetobacter* (meio LGI-P) nas três épocas de coleta realizadas (40 DAS, 90 DAS, 120 DAS). Bactérias relacionadas a *Burkholderia* (meio JMV) não foram detectadas em nenhuma das amostras. Em todos os tratamentos e épocas de coleta se verificaram altas concentrações de bactérias diazotróficas endofíticas nas raízes, que

variaram de 10^4 a 10^8 UFC g⁻¹, exceto para contagem em meio LGI-P na primeira coleta (10^2 a 10^6 UFC g⁻¹) e segunda coleta (10^3 a 10^8 UFC g⁻¹).

Estes resultados são similares aos encontrados por PUNSCHKE et al. (2005), que quantificaram bactérias diazotróficas de duas variedades de arroz no Uruguai e encontraram 69% das amostras de raízes com concentrações maiores que 10^5 UFC g⁻¹. No presente experimento, 98,77% das amostras de raízes quantificadas em meio NFB apresentaram populações maiores que 10^5 UFC g⁻¹. Para os meios JNFb, LGI e LGI-P se observou que em 98,77%, 97,53% e 74,08%, respectivamente, as populações ultrapassaram 10^5 UFC g⁻¹. Não foram detectadas bactérias diazotróficas em meio JMV, para bactérias relacionadas a *Burkholderia*.

Nas populações de bactérias diazotróficas relacionadas a *Herbaspirillum* (meio JNFb), *A. amazonense* (LGI) e *Gluconacetobacter* (LGI-P) não foram observadas diferenças significativas decorrentes das diferentes inoculações na fase de perfilhamento do arroz (40 DAS). No entanto, a população relacionada a *Azospirillum brasilense/lipoferum* (meio NFB) foi menor nos tratamentos com inoculação do que nos tratamento testemunha (sem inoculação). Esse resultado indica uma possível interação das bactérias inoculadas com a microbiota nativa, reduzindo-as. JANZEN & MCGILL (1995) estudaram as interações em nível de comunidade de *A. brasilense* em modelo microcosmos e verificaram que este microrganismo é capaz de alterar a estrutura da comunidade.

Quando foram consideradas as populações de bactérias diazotróficas em função das doses de nitrogênio aplicadas, não se verificaram diferenças significativas entre as doses para os meios JNFb, LGI e LGI-P. Resultados semelhantes foram obtidos por SALA et al. (2005), os quais observaram que, em alguns genótipos de trigo não houve alteração do número de diazotróficos endofíticos quando adicionado nitrogênio ao solo de cultivo. Mas em outros genótipos, os mesmos autores observaram aumento da quantidade desses microrganismos com o aumento da dose de nitrogênio. KIRCHHOF et al. (1997) observaram que a quantidade de diazotróficos era menor ou não detectável em altos níveis de nitrogênio mineral. MUTHUKUMARASAMY et al. (2002) consideraram que o fertilizante nitrogenado atua sobre o estado fisiológico da planta e pode, portanto, alterar as populações destas bactérias. SILVA et al. (2004) avaliaram o efeito das doses de N sobre a população de diazotróficos na cultivar IRGA-419, cultivar próxima à do presente experimento, e não observaram diferença significativa nas populações presentes no rizoplano de arroz irrigado com e sem adubação nitrogenada de 90 kg ha⁻¹.

Quando foram comparados os nove tratamentos entre si, novamente não se verificaram diferenças entre as populações de diazotróficos endofíticos (Tabela 1). É possível que, mesmo apresentando números semelhantes de diazotróficos, ocorram diferentes formas de interação planta-microrganismos, como proposto por SALOMONE & DÖBEREINER (1996). Outra possibilidade é que, devido ao alto coeficiente de variação observado entre as amostras, típico de experimentos em campo, sujeitos a múltiplas variações ambientais, não se tenham observado as alterações ocorridas entre os tratamentos.

Tabela 1 – Número de bactérias diazotróficas (\log_{10}) relacionadas aos meios NFb, JNF, LGI e LGI-P, presentes nas raízes do arroz irrigado IRGA-420 aos 40 DAS. Média de três repetições. Santa Maria, 2005.

Tratamentos	NFb (UFC g ⁻¹)	JNFb (UFC g ⁻¹)	LGI (UFC g ⁻¹)	LGI-P (UFC g ⁻¹)
Sem inoculação + 0 kg N ha ⁻¹	8,24a*	7,11a	7,11a	4,58a
Sem inoculação + 60 kg N ha ⁻¹	7,76a	7,03a	8,15a	6,13a
Sem inoculação + 120 kg N ha ⁻¹	7,86a	7,86a	7,86a	6,93a
<i>A. brasilense</i> + 0 kg N ha ⁻¹	7,21a	7,14a	7,14a	6,17a
<i>A. brasilense</i> + 60 kg N ha ⁻¹	7,25a	6,93a	6,93a	6,55a
<i>A. brasilense</i> + 120 kg N ha ⁻¹	7,08a	7,40a	7,40a	5,06a
UFSM-BD-31-06 + 0 kg N ha ⁻¹	6,87a	7,13a	7,13a	4,74a
UFSM-BD-31-06 + 60 kg N ha ⁻¹	7,56a	7,80a	7,80a	6,31a
UFSM-BD-31-06 + 120 kg N ha ⁻¹	7,19a	7,15a	7,16a	6,06a
CV(%) =	7,62	12,70	9,01	17,05

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

A segunda coleta ocorreu aos 90 DAS, na fase de florescimento do arroz, não se verificando diferenças entre as populações de bactérias diazotróficas quanto aos tratamentos de inoculação nem quanto às doses de nitrogênio aplicadas.

Não se verificaram diferenças significativas quando considerados os diversos tratamentos utilizados nesse experimento (Tabela 2), embora sejam observadas variações entre os valores absolutos das populações. A semelhança entre as populações pode ser devida ao fato de serem quantificados apenas os microrganismos endofíticos, que são menos vulneráveis a variações ambientais e competição do que os microrganismos rizosféricos (COCKING, 2003).

Tabela 2 – Número de bactérias diazotróficas (\log_{10}) em NFb, JNFb, LGI e LGI – P presentes nas raízes do arroz irrigado IRGA-420 aos 90 DAS. Média de três repetições. Santa Maria, 2006.

Tratamentos	NFb (UFC g ⁻¹)	JNFb (UFC g ⁻¹)	LGI (UFC g ⁻¹)	LGI – P (UFC g ⁻¹)
Sem inoculação + 0 kg N ha ⁻¹	7,98a*	7,93a	7,83 a	6,91 a
Sem inoculação + 60 kg N ha ⁻¹	6,56a	7,01a	6,02 a	4,74 a
Sem inoculação + 120 kg N ha ⁻¹	8,11a	8,15a	7,69 a	6,86 a
<i>A. brasilense</i> + 0 kg N ha ⁻¹	7,46a	7,95a	6,96 a	6,05 a
<i>A. brasilense</i> + 60 kg N ha ⁻¹	7,50a	7,94a	7,49 a	5,75 a
<i>A. brasilense</i> + 120 kg N ha ⁻¹	7,78 a	7,98a	7,81 a	6,92 a
UFSM-BD-31-06 + 0 kg N ha ⁻¹	7,17 a	6,83a	6,58 a	5,66 a
UFSM-BD-31-06 + 60 kg N ha ⁻¹	7,46 a	7,87a	6,62 a	6,51 a
UFSM-BD-31-06 + 120 kg N ha ⁻¹	7,98 a	7,94a	8,11 a	7,31 a
CV(%)=	9,72	8,40	10,84	22,36

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Entre as populações avaliadas na terceira coleta, que ocorreu aos 120 DAS, em fase de grãos secos, ao considerar como fator de variação as diferentes inoculações, não se verificaram diferenças para os meios NFb, JNFb e LGI. Para LGI-P, o tratamento sem inoculação apresentou maior população que os tratamentos com inoculação (Tabela 3). Tal resultado pode ser explicado pela agressividade natural de isolados de *Azospirillum*, presentes no inóculo utilizado, que podem ter reduzido a população nativa relacionada a *Gluconacetobacter* avaliada pelo meio LGI-P (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000).

Tabela 3 - Número de bactérias (\log_{10}) relacionadas aos meios NFb, JNFb, LGI e LGI-P presentes em raízes esterilizadas superficialmente de arroz irrigado IRGA-420, coletadas aos 120 DAS. Média de três repetições. Santa Maria, 2006.

Bactéria inoculada	NFb (UFC g ⁻¹)	JNFb (UFC g ⁻¹)	LGI (UFC g ⁻¹)	LGI-P (UFC g ⁻¹)
Sem inoculação	7,55a*	6,32a	7,91a	7,77a
<i>A. brasilense</i>	7,40a	6,36a	7,62a	6,86b
UFSM-BD-31-06	7,67a	7,12a	8,02a	7,02b
CV(%)=	6,07	17,39	5,63	8,60

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Ao considerar as doses de N como fator de variação, novamente foram as bactérias diazotróficas relacionadas ao meio NFb quem apresentaram diferenças, com maiores populações onde não houve aplicação de N, e uma possível inibição destas por doses de 60 e 120 kg ha⁻¹ (Tabela 4). Esses dados estão de acordo com KIRCHHOF (1997), que observou redução do número de bactérias diazotróficas com aumento da dose de N mineral aplicado, devido a inibição da enzima nitrogenase pelo nitrogênio mineral disponível.

Tabela 4 – Número de bactérias (\log_{10}) relacionadas aos meios NFb, JNFb, LGI e LGI-P presentes em raízes esterilizadas superficialmente de arroz IRGA-420, coletadas aos 120 DAS. Média de três repetições. Santa Maria, 2006.

Dose de N (kg ha^{-1})	NFb (UFC g^{-1})	JNFb (UFC g^{-1})	LGI (UFC g^{-1})	LGI-P (UFC g^{-1})
0	7,99a	6,67a	7,85a	7,23a
60	7,34b	6,52a	7,91a	7,18a
120	7,28b	6,60a	7,78a	7,24a
CV(%)=	6,07	17,39	5,634	8,60

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Comparando os diferentes tratamentos na terceira coleta, sem considerar as fontes de variação, novamente nenhuma diferença significativa foi observada entre as populações dos diversos tratamentos (Tabela 5). A ausência de diferenças significativas pode ser explicada, mais uma vez, pelo fato de que as populações quantificadas neste experimento são endófitas, e, portanto, estão menos sujeitas a variações ambientais devido à proteção que recebem no interior dos tecidos vegetais trocando nutrientes e recebendo proteção contra danos causados pelo oxigênio ao complexo nitrogenase (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Outra possibilidade é que o meio aquático em que cresce o arroz IRGA-420 favoreceria a disseminação e o equilíbrio populacional das diferentes bactérias presentes.

Tabela 5 – Número de bactérias (\log_{10}) quantificadas em NFb, JNFb, LGI e LGI-P presentes nas raízes do arroz irrigado IRGA-420 aos 120 DAS. Média de três repetições. Santa Maria, 2006.

Tratamentos		NFb (UFC g^{-1})	JNFb (UFC g^{-1})	LGI (UFC g^{-1})	LGI - P (UFC g^{-1})
Sem inoculação + 0 kg N ha^{-1}	T-1	7,89a*	6,08a	8,11 a	7,33 a
Sem inoculação + 60 kg N ha^{-1}	T-2	7,12a	5,86a	7,86 a	8,23 a
Sem inoculação + 120 kg N ha^{-1}	T-3	7,65a	7,00a	7,76 a	7,76 a
A. brasilense + 0 kg N ha^{-1}	T-4	7,95a	6,53a	7,96 a	6,83 a
A. brasilense + 60 kg N ha^{-1}	T-5	6,92a	6,58a	7,69 a	6,60 a
A. brasilense + 120 kg N ha^{-1}	T-6	7,32 a	5,98a	7,48 a	7,14 a
UFMS-BD-31-06 + 0 kg N ha^{-1}	T-7	8,15 a	7,41a	7,75 a	7,53 a
UFMS-BD-31-06 + 60 kg N ha^{-1}	T-8	7,98 a	7,13a	8,19 a	6,87 a
UFMS-BD-31-06 + 120 kg N ha^{-1}	T-9	6,88 a	6,83a	8,11 a	6,81 a
CV(%) =	-	6,07	17,39	5,63	8,58

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Quanto às variações populacionais entre as diferentes épocas de coleta de raízes (Tabela 6), não houve interação época x tratamento, mas foram observadas diferenças entre as épocas para todos os meios, exceto para NFb. Em meio JNFb houve queda populacional ao

fim do ciclo vegetativo das plantas. BODDEY et al (1986) inocularam 3 diferentes cepas de *A. brasilense* em trigo e verificaram efeito semelhante, de redução de populações diazotróficas de raízes esterilizadas em fim de ciclo, embora medissem a população em meio NFb.

Tabela 6 – Variações populacionais verificadas entre as diferentes épocas de coleta. Média de três repetições. Santa Maria, 2006.

Época	NFb (UFC g ⁻¹)	JNFb (UFC g ⁻¹)	LGI (UFC g ⁻¹)	LGI-P (UFC g ⁻¹)
40 DAP	7,45a*	7,29a	7,41b	5,84b
90 DAP	7,56a	7,51a	7,23b	6,30b
120 DAP	7,54a	6,60b	7,85a	7,27a
CV(%)=	7,95	17,39	8,63	16,27

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Quanto às populações avaliadas em meio LGI e LGI – P, estas aumentaram ao fim do ciclo, o que pode ter ocorrido devido a disponibilidade de matéria orgânica em decomposição pelas bactérias, no início da senescência da planta. RODRIGUES (2003) verificou comportamento semelhante na população de diazotróficos endofíticos em algumas cultivares de arroz na fase de maturação completa dos grãos.

BARRAQUIO et al. (1997) observaram que o número de diazotróficos endofíticos atinge um máximo no florescimento ou próximo a este em alguns genótipos de arroz. No presente experimento, embora não significativos estatisticamente, verificaram-se pequenos aumentos dos 40 DAS aos 90 DAS para populações quantificadas nos meios NFb, JNFb e LGI – P, mas quanto ao meio LGI houve comportamento diferente do esperado.

A observação do comportamento das populações quantificadas em meio NFb, em cada um dos tratamentos, revelou diferença significativa apenas no tratamento T-7, onde o arroz foi inoculado com o isolado UFSM-BD-31-06 e não houve adubação nitrogenada (Tabela 7). Neste caso, houve aumento significativo da população ao fim do ciclo da planta, o que seria esperado para todos os grupos avaliados (RODRIGUES, 2003). É possível que tenha ocorrido uma interação entre o isolado inoculado e a planta, referente aos exsudatos radiculares, pois conforme NEHL et al. (1996), os exsudatos radiculares são determinantes de quais microrganismos permanecerão na rizosfera e, conseqüentemente, colonizarão o interior da raiz.

Tabela 7 - Variação da população de bactérias diazotróficas (\log_{10}) quantificadas em NFB presentes nas raízes do arroz irrigado IRGA-420 aos 40, 90 e 120 DAS. Médias de três repetições. Santa Maria, 2005/2006.

Época	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8	T-9
40 DAS	8,24a*	7,76a	7,86a	7,21a	7,25a	7,08a	6,87b	7,56a	7,19a
90 DAS	7,98a	6,56a	8,11a	7,46a	7,50a	7,78a	7,17ab	7,46a	7,98a
120 DAS	7,89a	7,12a	7,65a	7,95a	6,92a	7,32a	8,15a	7,98a	6,88a
CV(%)=	7,95								

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Obs: T1: Sem inoculação + 0 kg N ha⁻¹, T-2: Sem inoculação + 60 kg N ha⁻¹, T-3: Sem inoculação + 120 kg N ha⁻¹, T-4: *A. brasilense* + 0 kg N ha⁻¹, T-5: *A. brasilense* + 60 kg N ha⁻¹, T-6: *A. brasilense* + 120 kg N ha⁻¹, T-7: UFSM-BD-31-06 + 0 kg N ha⁻¹, T-8: UFSM-BD-31-06 + 60 kg N ha⁻¹ e T-9: UFSM-BD-31-06 + 120 kg N ha⁻¹

Quanto ao comportamento das populações quantificadas em meio JNFb, não houve interação entre época de coleta e tratamento, e não foi observada nenhuma alteração populacional significativa ao longo do ciclo da planta em nenhum dos tratamentos. MUTHUKUMARASAMY et al. (2006) obtiveram resultados semelhantes ao inocular cana-de-açúcar com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* sp. sob diferentes doses de nitrogênio, onde verificaram que as populações dos microrganismos avaliadas não foram afetadas pela fase de crescimento da planta.

Quanto ao comportamento das populações quantificadas em meio LGI (Tabela 8), houve correlação significativa entre época de coleta e tratamento ($r = 0,88$; $p < 0,05$; $n = 81$). Foi observada alteração populacional significativa e semelhante ao longo do ciclo da planta nos tratamentos T-2 (Sem inoculação + 60 kg N ha⁻¹) e T8 (UFSM-BD-31-06 + 60 kg N ha⁻¹), onde se observa uma queda populacional aos 90 DAS seguidas de um aumento aos 120 DAS. A queda populacional aos 90 DAS pode ter ocorrido devido a proximidade da época de aplicação de nitrogênio com a época de coleta, sendo que aos 120 DAS as populações já teriam se readaptado ao ambiente.

Tabela 8 - Variação da população de bactérias diazotróficas (\log^{10}) quantificadas em meio LGI (relacionadas a *A. amazonense*), presentes nas raízes do arroz irrigado IRGA-420 aos 40, 90 e 120 DAS. Médias de três repetições. Santa Maria, 2005/2006.

Época	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8	T-9
40 DAP	7,11a*	8,15a	7,86a	7,14a	6,93a	7,40a	7,13a	7,79ab	7,15a
90 DAP	7,83a	6,02b	7,69a	6,92a	7,50a	7,81a	6,58a	6,62b	8,11a
120 DAP	8,11a	7,86a	7,76a	7,69a	7,69a	7,47a	7,76a	8,19a	8,11a
CV(%)=	8,63								

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Obs: T1: Sem inoculação + 0 kg N ha⁻¹, T-2: Sem inoculação + 60 kg N ha⁻¹, T-3: Sem inoculação + 120 kg N ha⁻¹, T-4: *A. brasilense* + 0 kg N ha⁻¹, T-5: *A. brasilense* + 60 kg N ha⁻¹, T-6: *A. brasilense* + 120 kg N ha⁻¹, T-7: UFSM-BD-31-06 + 0 kg

Quanto ao comportamento das populações quantificadas em meio LGI-P (Tabela 9), não houve interação entre época de coleta e tratamento, mas foram observados incrementos populacionais significativos ao fim do ciclo da planta nos tratamentos T-2 (sem inoculação + 60 kg N ha⁻¹), T-6 (*A. brasilense* + 120 kg N ha⁻¹) e T-7 (UFSM-BD-31-06 + 0 kg N ha⁻¹).

Não foi possível estabelecer nenhum comportamento padrão, pois nos referidos tratamento há diferentes inoculantes e diferentes doses de nitrogênio aplicadas. No entanto, é possível observar que em T-2 (Testemunha + 60 kg N ha⁻¹) e T-7 (UFSM-BD-31-06 + 0 kg N ha⁻¹) os aumentos populacionais ocorreram na ausência ou baixa dose de nitrogênio, e no caso de T-6 (*A. brasilense* + 120 kg N ha⁻¹), o aumento populacional de *A. brasilense* não foi prejudicado pela alta dose de nitrogênio, contrariando dados publicados por KENNEDY et al. (2004) e MUTHUKUMARASAMY et al. (2002), os quais verificaram queda nestas populações quando aumentadas as doses de adubo nitrogenado.

Tabela 9 - Variação da população de bactérias diazotróficas (\log^{10}) quantificadas em LGI-P (relacionadas a *Gluconacetobacter*), presentes nas raízes do arroz IRGA-420 aos 40, 90 e 120 DAS. Médias de três repetições. Santa Maria, 2005/2006.

Época	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8	T-9
40 DAP	4,58b*	6,13b	6,93a	6,17a	6,55a	5,06b	4,74b	6,31a	6,06a
90 DAP	6,91a	4,74b	6,86a	6,05a	5,75a	6,92ab	5,67ab	6,51a	7,31a
120 DAP	7,33a	8,23a	7,76a	7,17a	6,60a	7,14a	7,53a	6,87a	6,81a
CV(%)=	16,27								

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Obs: T1: Sem inoculação + 0 kg N ha⁻¹, T-2: Sem inoculação + 60 kg N ha⁻¹, T-3: Sem inoculação + 120 kg N ha⁻¹, T-4: *A. brasilense* + 0 kg N ha⁻¹, T-5: *A. brasilense* + 60 kg N ha⁻¹, T-6: *A. brasilense* + 120 kg N ha⁻¹, T-7: UFSM-BD-31-06 + 0 kg N ha⁻¹.

No tratamento T-1 houve um acréscimo progressivo ao longo do ciclo, em valores absolutos, na população relacionada a *Gluconacetobacter*, o que era esperado, já que nesse tratamento não houve influência da aplicação de nitrogênio nem de inoculante.

7.5.2 Parâmetros de desenvolvimento e produtividade do arroz irrigado IRGA-420

Quando o tipo de bactéria inoculada foi considerado como fator de variação, verificou-se que entre os dados obtidos na primeira coleta, os valores de altura, comprimento de raiz e N – total não apresentaram diferenças significativas. De forma semelhante, DI CIOCCO e CÁCERES (1994) inocularam *Setaria itálica* com *A. brasilense* e não encontraram diferenças significativas na porcentagem de N – total entre plantas controle e inoculadas crescidas em solos fertilizados. No entanto, em solo não adubado a inoculação bacteriana causou um aumento significativo na massa seca, tal como verificado neste experimento. Para massa de raiz, massa fresca e massa seca de parte aérea foram observados valores maiores na ausência de inoculação (2,44, 4,28 e 0,68g, respectivamente) e menores para inoculação com *A. brasilense* (1,61, 3,19 e 0,54 g, respectivamente). O isolado UFSM-BD-31-06 apresentou valores intermediários (1,87, 3,24 e 0,59 g, respectivamente).

OKON e KAPULNIK (1986) estudaram a ação de *Azospirillum* sobre raízes de trigo e milho e verificaram que durante as três primeiras semanas após a germinação aumentou o número de pêlos radiculares de ramificações radiculares e o número de raízes laterais, mas não houve alteração na massa da raiz. As alterações morfológicas apresentam efeito sobre a produção de plantas inoculadas, pois apresentam grande proporção de raízes jovens. No campo, mesmo com menor desenvolvimento de raiz inoculada, conduziu a altos rendimentos de arroz em grãos, o que é atribuído a uma melhor absorção de nutrientes devido ao grande número de pêlos radiculares. PERIN et al (2003) avaliaram a capacidade de estabelecimento endofítico de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em plântulas de arroz aos 12 dias e não observaram efeito claro da inoculação, pois as plantas não apresentaram bom crescimento.

RODRIGUES (2004) encontrou alta correlação entre a massa seca e comprimento radicular, sugerindo que o aumento na massa seca pode ser atribuído a maior capacidade de absorção de nutrientes devido ao aumento do sistema radicular. Infere que a escolha de estirpes determinantes de maior massa seca da parte aérea seja válida devido à correlação

observada. Porém, neste experimento não foi verificada correlação, pois o comprimento de raiz foi semelhante entre os diferentes tratamentos de inoculação, e massa fresca e seca foram menores ou semelhantes ao tratamento sem inoculação.

Quando os dados foram analisados considerando as doses de N aplicadas, observaram-se valores maiores de altura de planta, massa de raiz, massa fresca e seca de parte aérea e N – total na aplicação de maior dose de N. O comprimento de raiz não apresentou diferença entre as doses aplicadas, mas observou-se aumento na massa de raiz. O comprimento de raiz semelhante pode ser atribuído a determinações genéticas, já que se trata da mesma cultivar em todos os tratamentos.

Não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos quanto à altura da planta e comprimento de raiz, possivelmente devido a uma determinação genética (Tabela 9).

Tabela 9 - Altura, comprimento de raiz, massa de raiz, massa fresca, massa seca e N – total das plantas de arroz irrigado IRGA – 420 aos 40 DAS (média de 3 repetições). Santa Maria, 2005.

Tratamentos	Altura planta (cm)	Comprimento raiz (cm)	Massa raiz (g)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	N-total (%)
T-1**	34,37a*	18,57 a	1,85ab	2,67bc	0,52cd	1,78ab
T-2	32,27 a	16,70 a	2,32ab	3,94abc	0,70abc	2,28ab
T-3	42,73 a	17,50 a	3,17a	6,24a	0,83ab	2,89a
T-4	32,70 a	17,77 a	1,35b	1,97c	0,39d	1,48b
T-5	36,13 a	17,30 a	1,54 b	3,36bc	0,61bcd	2,25 ab
T-6	42,00 a	18,70 a	1,96 b	4,23abc	0,63bcd	2,20 ab
T-7	32,93 a	16,43 a	1,53 b	2,24c	0,44cd	1,71 ab
T-8	33,97 a	16,40 a	1,41 b	2,25c	0,44cd	1,86 ab
T-9	38,33 a	19,03 a	2,67 b	5,19ab	0,89a	2,77 ab
CV(%) =	12,26	9,62	25,45	24,76	14,95	22,39

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

** T1: Sem inoculação + 0 kg N ha⁻¹, T-2: Sem inoculação + 60 kg N ha⁻¹, T-3: Sem inoculação + 120 kg N ha⁻¹, T-4: *A. brasilense* + 0 kg N ha⁻¹, T-5: *A. brasilense* + 60 kg N ha⁻¹, T-6: *A. brasilense* + 120 kg N ha⁻¹, T-7: UFSM-BD-31-06 + 0 kg N ha⁻¹, T-8: UFSM-BD-31-06 + 60 kg N ha⁻¹ e T-9: UFSM-BD-31-06 + 120 kg N ha⁻¹

Quanto a massa de raiz, T-3 (sem inoculação + 120 kg N ha⁻¹) apresentou valor maior (3,17 g), em T-1 (sem inoculação e sem aplicação de N) e T-2 (sem inoculação + 60 kg N ha⁻¹) se observaram valores intermediários (1,85 e 2,32 g, respectivamente) e valores menores foram verificados nos tratamentos restantes (T-4 a T-8 – inoculação com diferentes bactérias e diferentes doses de N). DOBBELAERE et al. (2002) inocularam trigo com *A. brasilense* em diferentes concentrações de inoculante e diferentes doses de nitrogênio, e concluíram que quando o inoculante apresenta altas concentrações (10⁷ – 10⁸ UFC planta⁻¹), pode ocorrer um

efeito negativo sobre o peso seco da raiz, o que pode ter ocorrido neste experimento, pois foi aplicado sobre as sementes um inoculante contendo 10^8 UFC mL⁻¹.

Quanto à massa fresca, T-3 (sem inoculação + 120 kg N ha⁻¹) apresentou valor maior e T-4 (*A. brasilense* e sem N), T-7 (I – 31 e sem N) e T-8 (I – 31 + 60 kg N ha⁻¹) valores menores, e os tratamentos T-1, T-2, T-5, T-6 e T-9 valores intermediários, não sendo verificado nenhum padrão específico de comportamento.

Quanto à massa seca, o comportamento foi diferente. O tratamento T-9 (I – 31 + 120 kg N ha⁻¹) é que apresentou o maior valor (0,89 g) e T-4 (*A. brasilense* e sem N) o menor valor (0,39 g), e todos os outros tratamentos apresentaram valores intermediários. Quanto ao N – total, o tratamento T-3 (sem inoculação + 120 kg N ha⁻¹) apresentou maior valor (2,89 %) e T-4 (*A. brasilense* e sem N) o menor valor (1,48 %), enquanto todos os outros apresentaram valores intermediários. DOBBELAERE et al. (2003) citam experimentos realizados em que valores de massa fresca e massa seca não apresentaram diferença significativa entre plantas inoculadas (trigo e milho) e sem inoculação. No entanto, houve efeito pronunciado da inoculação sobre a massa seca, especialmente em baixos e médios níveis de adubação com nitrogênio (200 – 350 mg planta⁻¹) e em baixas concentrações de inoculante (10^5 – 10^6 UFC planta⁻¹). SALOMONE et al. (1996) verificaram que a resposta à inoculação com *Azospirillum* sobre o acúmulo de massa seca foi diferente entre os genótipos de milho utilizados, sendo que algumas variedades tiveram os valores quadruplicados e uma delas revelou efeito negativo.

Por ocasião da segunda coleta, aos 90 DAS, foram avaliados a altura das plantas, o comprimento de raiz, o peso de raiz, massa fresca da parte aérea, massa seca da parte aérea e N – total. Não se verificaram diferenças significativas entre os valores para nenhum dos parâmetros analisados quando se considerou como fator de variação a inoculação nem quando consideradas as diferentes doses de nitrogênio aplicadas.

Quando os diferentes tratamentos foram comparados entre si, não se verificaram diferenças significativas entre os valores de nenhum dos parâmetros avaliados, como se observa na Tabela 10. No entanto, considerando o alto coeficiente de variação obtido para os valores de peso de raiz e comparando aos seus valores absolutos, observa-se grande variação entre os tratamentos.

Tabela 10- Altura, comprimento de raiz, massa de raiz, massa fresca, massa seca e N – total das plantas de arroz irrigado IRGA – 420 aos 90 DAS, conforme os tratamentos (média de 3 repetições). Santa Maria, 2006.

Tratamentos	Altura planta (cm)	Comprimento raiz (cm)	Massa raiz (g)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	N-total (%)
T-1**	71,27a*	16,86 a	2,43 a	5,99 a	1,84 a	1,51 a
T-2	77,02 a	17,07 a	1,67 a	7,65 a	2,35 a	1,74 a
T-3	79,73 a	15,54 a	4,57 a	7,80 a	2,12 a	1,94 a
T-4	76,85 a	15,20 a	2,17 a	6,87 a	2,24 a	1,53 a
T-5	82,69 a	14,97 a	3,27 a	8,28 a	2,37 a	1,58 a
T-6	80,84 a	16,28 a	2,90 a	7,68 a	2,22 a	1,94 a
T-7	75,53 a	14,76 a	1,93 a	6,93 a	2,23 a	1,23 a
T-8	79,86 a	15,33 a	2,63 a	7,69 a	2,50 a	1,70 a
T-9	78,33 a	16,03 a	2,47 a	7,69 a	2,42 a	1,60 a
CV (%)	6,20	9,24	43,43	15,46	17,40	16,46

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

** T1: Sem inoculação + 0 kg N ha⁻¹, T-2: Sem inoculação + 60 kg N ha⁻¹, T-3: Sem inoculação + 120 kg N ha⁻¹, T-4: *A. brasilense* + 0 kg N ha⁻¹, T-5: *A. brasilense* + 60 kg N ha⁻¹, T-6: *A. brasilense* + 120 kg N ha⁻¹, T-7: UFSM-BD-31-06 + 0 kg N ha⁻¹, T-8: UFSM-BD-31-06 + 60 kg N ha⁻¹ e T-9: UFSM-BD-31-06 + 120 kg N ha⁻¹

Esses resultados são explicados por MANTELIN & TOURAINE (2004), que concluíram que o desenvolvimento de raízes, a absorção de nitratos disponíveis e o efeito da inoculação por bactérias promotoras de crescimento são independentes entre si.

Utilizando cultivares de arroz Carajás e IAC-202 sob diferentes doses de N, NEVES et al. (2004) observaram semelhante concentração de N nas folhas das duas cultivares. Tal resultado conduz à constatação de que há diferentes fatores atuando na rizosfera das plantas, capazes de modular a dinâmica do nitrogênio.

Quando avaliados os dados da terceira coleta, realizada aos 120 DAS, novamente não se verificaram diferenças estatísticas para altura, massa fresca, massa seca e N – total entre os diferentes tratamentos (Tabela 11), semelhante ao ocorrido aos 90 DAS.

REIS et al. (2005) realizaram experimento para avaliar a influência da adubação nitrogenada sobre a absorção de nitrogênio pelo arroz irrigado e verificaram que, à medida que aumentaram as doses, as quantidades absorvidas reduziram proporcionalmente.

Tabela 11 - Altura, massa fresca, massa seca e N – total das plantas de arroz irrigado IRGA – 420 aos 120 DAS. (Média de 3 repetições). Santa Maria, 2006.

Tratamentos	Altura (cm)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	N-total (%)
T-1**	77,94a*	8,06a	3,11a	0,74a
T-2	81,45a	8,22a	3,24a	0,71a
T-3	78,56a	8,06a	3,15a	0,84a
T-4	76,35a	7,74a	3,08a	0,66a
T-5	80,45a	8,05a	3,06a	0,70a
T-6	86,28a	9,42a	3,58a	0,83a
T-7	75,61a	8,18a	3,37a	0,66a
T-8	77,39a	7,56a	3,03a	0,57a
T-9	79,56a	7,94a	3,13a	0,59a
CV(%) =	6,98	14,68	13,71	32,31

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

** T1: Sem inoculação + 0 kg N ha⁻¹, T-2: Sem inoculação + 60 kg N ha⁻¹, T-3: Sem inoculação + 120 kg N ha⁻¹, T-4: *A. brasilense* + 0 kg N ha⁻¹, T-5: *A. brasilense* + 60 kg N ha⁻¹, T-6: *A. brasilense* + 120 kg N ha⁻¹, T-7: UFSM-BD-31-06 + 0 kg N ha⁻¹, T-8: UFSM-BD-31-06 + 60 kg N ha⁻¹ e T-9: UFSM-BD-31-06 + 120 kg N ha⁻¹

Considerando esses resultados, é possível inferir que, no presente experimento, as diferenças que poderiam ser observadas entre as diferentes doses de nitrogênio aplicadas foram minimizadas pela ação das bactérias diazotróficas, gerando valores semelhantes entre os tratamentos. A ação das bactérias poderia ser creditada a população de bactérias diazotróficas presentes no solo, já que os valores de N-total nos tratamentos T-1, T-2 e T-3 (sem inoculação) foram semelhantes aos com inoculação por *A. brasilense* e UFSM-BD-31-06 (T-4 a T-9). DÖBEREINER (1977) publicou estudo sobre fixação de nitrogênio em gramíneas por *A. lipoferum*, concluindo que sua inoculação não ofereceria grandes expectativas em solos onde houvesse grande população do mesmo. Independente da confirmação da eficiência da inoculação, o solo utilizado neste experimento continha grande população de diazotróficos e este fator pode ter sido determinante para os resultados obtidos.

Quando comparados entre os tratamentos e as diferentes épocas de coleta, verificou-se que os valores de N – total diminuíram na coleta aos 120 DAS em relação às demais épocas em todos os tratamentos. Aos 40 e 90 DAS apenas T3, T5 e T9 apresentaram diferenças significativas (Tabela 12). Resultados semelhantes foram obtidos por RODRIGUES (2004), que verificou que na fase de maturação dos grãos, a palha de arroz apresentou menor quantidade de nitrogênio, atribuindo tal resultado à translocação deste para os grãos. No presente experimento não foi realizada avaliação do N-total dos grãos.

Tabela 12 – Valores de N- total verificados em cada tratamento aos 40, 90 e 120 DAS do arroz irrigado IRGA – 420 (média de três repetições). Santa Maria, 2005/2006.

Coleta	T1**	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
40 DAP	1,78 a	2,28 a	2,89 a	1,48 a	2,25 a	2,20 a	1,71 a	1,85 a	2,77 a
90 DAP	1,51 a	1,74 a	1,94 b	1,53 a	1,58 b	1,94 a	1,23ab	1,70 a	1,60 b
120 DAP	0,74 b	0,71 b	0,84 c	0,66 b	0,70 c	0,83 b	0,66 b	0,57 b	0,59 c
CV (%) =	22,73								

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

** T1: Sem inoculação + 0 kg N ha⁻¹, T-2: Sem inoculação + 60 kg N ha⁻¹, T-3: Sem inoculação + 120 kg N ha⁻¹, T-4: *A. brasilense* + 0 kg N ha⁻¹, T-5: *A. brasilense* + 60 kg N ha⁻¹, T-6: *A. brasilense* + 120 kg N ha⁻¹, T-7: UFSM-BD-31-06 + 0 kg N ha⁻¹, T-8: UFSM-BD-31-06 + 60 kg N ha⁻¹ e T-9: UFSM-BD-31-06 + 120 kg N ha⁻¹

GUIMARÃES et al. (2003) relataram comportamento semelhante quando avaliaram o efeito de diferentes inoculações sobre o acúmulo de massa seca e N – total da parte aérea do arroz, verificando diferenças significativas apenas aos 40 dias após o transplântio e nenhuma diferença entre os tratamentos aos 70 e 130 dias após o transplântio.

O desdobramento dos tratamentos em cada época de coleta (Tabela 13) permite observar que as diferenças significativas no % de N – total ocorreram aos 40 DAS, na fase vegetativa da planta onde T-1, T-4 e T-7 (tratamentos sem adubação nitrogenada) apresentaram valores menores em relação aos tratamentos com adubação. T-8 (UFSM-BD-31-06 + 60 kg N ha⁻¹) apresentou igualmente menores valores nesta fase. Também se pode verificar que, nos casos de T-4 (inoculação com *A. brasilense*) e T-7 (inoculação com UFSM-BD-31-06) não houve efeito sobre o N – total em decorrência da atuação das bactérias diazotróficas inoculadas. Resultados semelhantes relacionados a percentagem de nitrogênio presente na massa seca das raízes, palha e grãos de trigo e milho foram obtidos por DOBBELAERE et al. (2003), que demonstraram que a inoculação com *A. brasilense* não alterou a concentração de N em relação às plantas não inoculadas.

Tabela 13 – Valores de N – total verificados aos 40, 90 e 120 dias após a semeadura do arroz irrigado IRGA-420. (Média de três repetições). Santa Maria, 2005/2006.

Tratamentos	40 DAS	90 DAS	120 DAS
T-1**	1,78 b*	1,51 a	0,74 a
T-2	2,28 ab	1,74 a	0,71 a
T-3	2,89 a	1,94 a	0,84 a
T-4	1,48 b	1,53 a	0,66 a
T-5	2,25 ab	1,58 a	0,70 a
T-6	2,20 ab	1,94 a	0,83 a
T-7	1,71 b	1,23 a	0,66 a
T-8	1,86 b	1,70 a	0,57 a
T-9	2,77 a	1,60 a	0,59 a
CV(%) =	22,73		

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

** T1: Sem inoculação + 0 kg N ha⁻¹, T-2: Sem inoculação + 60 kg N ha⁻¹, T-3: Sem inoculação + 120 kg N ha⁻¹, T-4: *A. brasilense* + 0 kg N ha⁻¹, T-5: *A. brasilense* + 60 kg N ha⁻¹, T-6: *A. brasilense* + 120 kg N ha⁻¹, T-7: UFSM-BD-31-06 + 0 kg N ha⁻¹, T-8: UFSM-BD-31-06 + 60 kg N ha⁻¹ e T-9: UFSM-BD-31-06 + 120 kg N ha⁻¹

O rendimento da cultura é um fator preponderante no interesse por novas técnicas de agricultura, como a inoculação, a fim de proporcionar ao produtor um retorno líquido pelo cultivo. BHATTARAI & HESS (1993) consideraram que o incremento em torno de 25% no rendimento em grãos de trigo que foi obtido no experimento é economicamente promissor. Embora não se observem diferenças significativas entre os valores absolutos do rendimento em grãos entre os diferentes tratamentos de inoculação deste experimento, é possível observar porcentagens importantes no aumento do rendimento. O rendimento esperado para a cultivar IRGA-420 em lavoura bem manejada está em torno de 7,55 t ha⁻¹. No presente experimento foram obtidos valores entre 4,05 e 5,34 t ha⁻¹. Os menores valores podem ser justificados pela presença de plantas invasoras durante o cultivo, pois não foram utilizados herbicidas para evitar interferências sobre as populações bacterianas.

Quando considerados os diferentes inoculantes como fator de variação, os aumentos verificados foram entre 12 e 14% (Tabela 14).

Tabela 14 – Produtividade do arroz irrigado IRGA – 420 em kg ha⁻¹ em relação ao tratamento sem inoculação.

Tratamentos	Rendimento (kg ha ⁻¹)	Aumento rendimento (%)
Sem inoculação	4348,19 a*	–
<i>A. brasilense</i>	4886,89 a	12,39
UFSM-BD-31-06	4958,51 a	14,04
CV(%) =	27,20	–

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Ao considerar as doses de N aplicadas, o rendimento da cultura também não apresentou diferenças significativas entre os valores, sendo que as porcentagens de aumento foram menores do que aquelas verificadas na comparação de diferentes inoculações (Tabela 15), ficando em torno de 2,5%, tanto para média quanto alta dose de N.

Tabela 15 – Produtividade do arroz IRGA – 420 em kg ha⁻¹ e aumento de rendimento em relação às diferentes doses de N aplicadas.

Dose de N (kg N ha ⁻¹)	Rendimento (kg ha ⁻¹)	Aumento rendimento (%)
0	4652,92 a*	–
60	4769,90 a	2,51
120	4770,77 a	2,53
CV(%)	27,20	–

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (p= 0,05; teste Tukey).

Na comparação entre os tratamentos, não foram encontradas diferenças significativas entre os valores, mas observado que todos apresentaram valores absolutos superiores ao T-1 (Sem inoculação e sem nitrogênio) (Tabela 15). Quando os rendimentos foram comparados em percentuais de acréscimo em relação ao tratamento T-1 (sem inoculação e sem adição de N), observaram-se aumentos entre 8 e 32 % (Tabela 11).

Tabela 15 – Rendimento em grãos e percentual de aumento em relação ao tratamento sem inoculação e adubação do arroz irrigado IRGA-420. Média de três repetições. Santa Maria, 2006.

Tratamentos	Rendimento do arroz (t ha ⁻¹)	Aumento rendimento (%)
Sem inoculação + 0 kg N ha ⁻¹	4,05a	-
Sem inoculação + 60 kg N ha ⁻¹	4,61a	13,83
Sem inoculação + 120 kg N ha ⁻¹	4,39a	8,39
A. brasileiro + 0 kg N ha ⁻¹	5,14a	26,91
A. brasileiro + 60 kg N ha ⁻¹	4,94a	21,97
A. brasileiro + 120 kg N ha ⁻¹	4,57a	12,84
UFMS-BD-31-06 + 0 kg N ha ⁻¹	4,77a	17,18
UFMS-BD-31-06 + 60 kg N ha ⁻¹	4,75a	17,28
UFMS-BD-31-06 + 120 kg N ha ⁻¹	5,34a	31,85
CV(%)	27,21	

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (p≤ 0,05; teste Tukey).

BHATTARAI & HESS (1993) inocularam duas variedades de trigo e verificaram aumento significativo no rendimento em grãos em plantas inoculadas com *Azospirillum*, entre 12 e 19 %. No entanto, as cultivares não apresentaram diferenças na porcentagem de N nos grãos nem na palha entre plantas inoculadas e controle, semelhante ao ocorrido neste experimento.

A fixação biológica de N em sistemas agrícola decresce em resposta à adubação nitrogenada. Mesmo em baixas concentrações, nitrogênio combinado, como amônia ou nitrato, conduzem à repressão dos genes da nitrogenase e, conseqüentemente, inativam a atividade da nitrogenase (TAN et al, 2003). Esta pode ser a explicação para importante percentual de aumento do rendimento quando *A. brasilense* foi inoculado em solo sem adição de nitrogênio (26,91%). Porém, observando os percentuais de acréscimo quando adicionados 60 e 120 kg N ha⁻¹, a inoculação com *A. brasilense* ainda apresentou melhores resultados do que sem inoculação (21,97% para 12,84%). DOBBELAERE et al., (2003) citam experimentos em que foram observados maiores efeitos da inoculação em campos moderadamente fertilizados com N, P e K, indicando, nesses casos, que a inoculação com *A. brasilense* não substituiria o N fertilizado, mas melhoraria sua utilização, levando os cereais a produtividade semelhante aos de altos níveis de fertilização. Já em alta dose de N, o acréscimo no rendimento do arroz foi menor, caindo para 12,84% e confirmando o efeito positivo da inoculação sobre a produtividade do arroz.

Quanto ao isolado UFSM-BD-31-06, apresentou incrementos menores do que a inoculação com *A. brasilense* em doses de 0 e 60 kg N ha⁻¹, mas sob 120 kg N ha⁻¹ apresentou incremento superior a todos os outros tratamentos. Este fato não era esperado, pois contraria a concepção de que altos níveis de nitrogênio mineral inibem a ação de bactérias diazotróficas. No entanto, há possibilidade da interação de outros fatores, como um aumento da produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal. DOBBELAERE et al., (2003) obtiveram respostas positivas de inoculação com *Azospirillum* sob altos níveis nutricionais de N, indicando que as respostas das plantas não são decorrentes apenas da fixação biológica de N na rizosfera, mas que outros mecanismos estão envolvidos.

OKON & LABANDERA-GONZALEZ (1994) obtiveram sucesso em 60- 70 % dos seus experimentos de inoculação, sendo que 5- 30% deles apresentaram respostas estatisticamente significativas, destacando que a promoção de crescimento vegetal nem sempre significa alto rendimento em grãos.

A área plantada com arroz no Rio Grande do Sul atinge 1.000.000 de hectares. Conforme recomendações do ROLAS – Rede Oficial de Laboratórios de Análise de Solos – 2005, a dose sugerida para aplicação de N na lavoura é de 120 kg N ha⁻¹. Considerando que a uréia – fonte de N geralmente aplicada – possui apenas 47% de N, são necessários 255 kg deste fertilizante para aplicar em um hectare de lavoura de arroz, a um custo de R\$ 204,00 (R\$ 800,00 a tonelada), sem contabilizar os custos de mão-de-obra, depreciação de máquinas e combustível necessários para aplicação de fertilizantes.

Caso a inoculação suprisse apenas 20% do adubo nitrogenado aplicado na lavoura orizícola, reduziria o gasto em uréia em R\$ 40,80 por hectare e gastaria apenas R\$ 6,50 com inoculante na mesma área: ganho líquido de R\$ 34,30 por hectare. Aplicando esses valores para uma área de 100 hectares, o produtor economizaria 3.400,00 reais por cultivo. No Estado do Rio Grande do Sul, seriam economizados 34 milhões de reais em uma única safra de arroz no Estado.

Os valores acima mencionados são importantes, mas igualmente importante é o papel da fixação biológica no ambiente, reduzindo os níveis de nitratos que se acumulam em lagos e rios, decorrentes da lixiviação do nitrogênio aplicado nas lavouras. A aplicação de inoculantes contabiliza não só a redução dos custos da lavoura, mas principalmente a preservação do ambiente, que é o nosso bem maior.

Apesar da pesquisa sobre fixação biológica de nitrogênio em gramíneas já ultrapassar os 35 anos, muito pouco dessa tecnologia tem sido aplicada no campo. Países como Egito, México, Argentina e Uruguai já utilizam inoculantes à base de *Azospirillum*.

Além da economia na aplicação de N e da conservação ambiental, outra possibilidade a ser explorada, é a aplicação de *Azospirillum* como bioestimulante para plantas (produzem auxinas que estimulam a raiz e, por isso, melhoram a absorção de nutrientes) no caso de cultivos em regiões onde a aplicação de adubos é nula ou escassa, como ocorre em algumas áreas menos desenvolvidas e/ou de agricultura de subsistência.

7.6 CONCLUSÕES

Não houve diferença entre o número de bactérias diazotróficas avaliadas nos meios NFb, JNFb, LGI e LGI-P, em relação à dose de nitrogênio aplicada, nem quanto às diferentes inoculações.

A utilização de bactérias diazotróficas no cultivo de arroz irrigado IRGA-420 determinou aumento na produtividade em grãos.

A inoculação do arroz irrigado IRGA-420 não determinou aumento do teor de N-total das plantas.

O incremento da produtividade do arroz irrigado IRGA-420 quando inoculado com *Azospirillum brasilense* foi reduzido com aumento da dose de nitrogênio aplicada. O isolado UFSM-BD-31-06, no entanto, determinou um alto incremento na produtividade quando aplicada dose de 120 kg N ha⁻¹.

7.7 REFERÊNCIAS

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) **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS, Caxias do Sul, 2002, 433p.

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 1996. 262 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

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

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SAMPAIO, M. J. A. M.; DÖBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 56, p. 365, 1984.

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

BENT, E.; CHANWAY, C. P. Potential for misidentification of a spore – forming *Paenibacillus polymixa* isolate as an endophyte by using culture-based methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4650 – 4652, 2002.

BHATTARAI, T.; HESS, D. Yield responses of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. **Plant and Soil**, n. 151, p. 67-76, 1993.

BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B. *et al.* Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, v. 92, p. 880 – 886, 2000.

BODDEY, R. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, n. 95, p. 109-121, 1986.

COCKING, E. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, n. 252, p. 169 – 175, 2003.

DI CIOCCO, C. A.; CÁCERES, E. A. R. Field inoculation of *Setaria italica* with *Azospirillum* spp. in Argentine humid pampas. **Field Crops Research**, v. 37, n. 3, p. 253-257, jun. 1994.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A.*

irakense strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, n. 36, p. 284-297, 2002.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107 – 149, 2003.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em gramíneas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 1, n. 1, p. 01 – 54, 1977.

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, 1995, 60 p.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5285 – 5293, 2001.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema SISVAR para análises estatísticas**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000. 66p.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R.M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 39, p. 361 – 364, 1989.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 25-30, 2003.

JANZEN, R. A.; MCGILL, W. B. Community-level interactions control proliferation of *Azospirillum brasilense* Cd in microcosmos. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 189 – 196, 1995.

KHAMMAS, K.M., AGERON, E., GRIMONT, P.A.D., KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research Microbiology**, n. 140, p. 679-693, 1989.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology & Biochemistry**, n. 36, p. 1229 – 1244, 2004.

KIRCHHOF, G.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; ECKERT, B.; DÖBEREINER, J.; HARTMANN, A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant and Soil**, n. 194, p. 45 – 55, 1997.

LOPES, S. I. G. Arroz irrigado: situação atual e perspectivas de uso de cultivares híbridas, transgênicas e mutadas. In: **IV Congresso Brasileiro de Arroz irrigado e XXVI Reunião da Cultura do Arroz Irrigado**. 9 a 12 de agosto de 2005, Santa Maria, Anais volume II, p. 594-605. 2005.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 55, p. 417-430, 1983.

MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 394, p. 27 – 34, 2004.

MUTHUKUMARASAMY, R., REVATHI, G., SESHADRI, S., LAKSHMINARASIMHAN, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, v. 83, n. 2, p. 137 – 145, 2002.

MUTHUKUMARASAMY, R.; GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M.; REVATHI, G. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* sp. In micropropagated sugarcane plants. **Microbiological Research**, n. 161, p. 238 – 245, 2006.

NEHL, D. B.; ALLEN, S. J.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, n. 5, p. 1-20, 1996.

NEVES, M. B.; BUZETTI, S.; ARF, O.; DE SÁ, M. E. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura em dois cultivares de arroz com irrigação suplementar. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 26, n. 4, p. 429-435, 2004.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum* – inoculated roots. **Plant and Soil**, v. 90, n. 1-3, p. 3-16, fev. 1986.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZÁLEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n.12, p. 1591-1601, 1994.

PENG, S.; BISWAS, J. C.; LADHA, J. K. *et al.* Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. **Agronomy Journal**, n. 94, p. 925 – 929, 2002.

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**, v. 37, n. 2, p. 47-53, 2003.

PUNSCHKE, K.; CARLOMAGNO, M.; LABANDERA, C. Potencial agronómico de bacterias fijadoras de nitrógeno endófitas de arroz. In: V Simposio de Recursos Geneticos para América Latina e el Caribe: **Actas Uruguay**, 2005.

REIS, M. S.; SOARES, A. A.; SOARES, P. C.; CORNÉLIO, V. M. O. Absorção de N, P, K, Ca, Mg e S pelo arroz irrigado influenciada pela adubação nitrogenada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 4, p. 707 – 713, 2005.

RODRIGUES, E. P. **Caracterização fisiológica de estirpes de *Azospirillum amazonense* e avaliação dos efeitos da inoculação em plantas de arroz inundado (*Oriza sativa* L.)**. 2004. 66f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.

RODRIGUES, L. S. **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado**. 2003. 94f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2003.

SALOMONE, I. E. G.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, n. 23, p. 249 – 256, 1996.

SILVA, D. M.; FRIES, M. R.; ANTONIOLLI, Z. I.; AITA, C.; VOSS, M.; JACQUES, R.; SEMINOTTI, J.; CARVALHO, C. A. Bactérias diazotróficas em solo cultivado com arroz irrigado (*Oriza sativa*), **Revista Brasileira de Agrociência**, n. 4, p. 467 – 474, out – dez, 2004.

SMIL, V. Abonos nitrogenados. **Investigación y Ciencia**, n. 09, p. 64 – 70, 1997.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 42, p.487 - 506, 2000.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, n. 15, p. 183 – 190, 2000.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S.S., DONZELI, V. P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 29, p. 345 – 352, 2005.

TAN, Z.; HUREK, T.; REINHOLD – HUREK, B. Effect of N – fertilization plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice . **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 1009-1015, 2003.

TARRAND, J. J., KRIEG, N. R., DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 24, p. 967-980, 1978.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análises de solo, plantas e outros materiais. **Boletim Técnico nº 5**, Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS. Porto Alegre, 1995. 174p.

CONCLUSÕES

A inoculação de bactérias diazotróficas na cultivar de arroz irrigado IRGA_420 não aumenta o conteúdo de nitrogênio da planta, mas permite manter alta produtividade vegetal com redução da quantidade de adubo nitrogenado.

A seleção *in vitro* de isolados quanto a capacidade de produção de ácido indolacético e fixação biológica de nitrogênio permite a obtenção de isolados promissores para aplicação como inoculante em sementes de arroz para desenvolvimento em campo.

As cultivares de arroz BR-IRGA-410, IRGA-417, IRGA-419, IRGA-420, Epagri-108, Epagri-109 e Tio Taka, apresentam grande diversidade e quantidade de bactérias diazotróficas endofíticas, com potencial de utilização como inoculante.

As populações nativas de bactérias diazotróficas endofíticas presentes nas raízes do arroz irrigado IRGA-420 não são influenciadas pelas altas doses de N aplicadas na cultura de arroz, nem pela inoculação de outras bactérias diazotróficas durante o ciclo da cultura.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no experimento evidenciam a possibilidade de outras pesquisas, como a avaliação “*in vitro*” de bactérias selecionadas em meio JNFb (*Herbaspirillum*), LGI (*A. amazonense*), LGI-P (*Gluconacetobacter*) e JMV (*Burkholderia*), que no momento se encontram armazenadas na Universidade Federal de Santa Maria.

Existe também a necessidade de acompanhamento de lavouras de arroz com plantio de outras cultivares, utilizando sementes inoculadas com bactérias diazotróficas sob uso convencional de agroquímicos e conduzidas em diferentes regiões agroclimáticas do Estado do Rio Grande do Sul.

O isolado UFSM-BR-31-06, embora obtido por processo reconhecido de isolamento de bactérias diazotróficas, necessita de identificação bioquímica e molecular para que prossigam estudos quanto a sua atuação sobre o rendimento da cultura de arroz e possibilidade de confecção de inoculante específico.