

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**INOCULAÇÕES DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO NO CULTIVO DE ARROZ EM SOLUÇÃO
NUTRITIVA**

Érico Leandro da Silveira

Bacharel em Ciências Biológicas

JABOTICABAL, SP - BRASIL

Julho – 2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**INOCULAÇÕES DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO NO CULTIVO DE ARROZ EM SOLUÇÃO
NUTRITIVA**

Érico Leandro da Silveira

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves

Co-orientadora Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, para obtenção do Título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

**Jaboticabal, SP - BRASIL
Julho – 2008**

S587i Silveira, Érico Leandro da
Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo
de arroz em solução nutritiva / Érico Leandro da Silveira. --
Jaboticabal, 2008
xii, 83 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Lúcia Maria Carareto Alves
Banca examinadora: Vera Lúcia Divan Baldani, Edvan Alves
Chagas, Ester Wickert, Janete Aparecida Desiderio Sena
Bibliografia

1. Fixação de nitrogênio. 2. Inoculantes. 3. Isolamento. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Érico Leandro da Silveira – Nascido em 20 de Janeiro de 1976, no município de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, concluiu a graduação em Ciências Biológicas (Bacharel e Licenciatura Plena), nas Faculdades Integradas Rio Pretense no município de São José do Rio Preto em 22 de Dezembro de 1997. Em 2002, ingressou-se no curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV- UNESP – Campus Jaboticabal, defendeu a dissertação intitulada “Identificação de comunidades bacterianas de solo por seqüenciamento do gene 16S rDNA” em Abril de 2004, Nessa mesma Universidade, em Agosto de 2004, iniciou-se o curso de Doutorado. Em Dezembro de 2007 ingressou na Rede Estadual de Ensino como Professor Titular no município de São Paulo – S.P.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INOCULAÇÕES DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO CULTIVO DE ARROZ EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

AUTOR: ÉRICO LEANDRO DA SILVEIRA
ORIENTADORA: Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES
Co-Orientador(a): Dra. ELIANA GERTRUDES MACEDO LEMOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA pela Comissão Examinadora:


Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES


Dra. VERA LUCIA DIVAN BALDANI


Dr. EDVAN ALVES CHAGAS


Dra. ESTER WICKERT


Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO SENA

Data da realização: 04 de julho de 2008.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES

“Descobri que a leitura é uma forma servil de sonhar. Se tenho de sonhar, porque não sonhar os meus próprios sonhos?”

Fernando Pessoa

Aos meus pais

Gervásio da Silveira e Irene Maria Mastelari da Silveira

Que ensinaram a importância do estudo,

Por darem amor, apoio e compreensão,

Pelo esforço e trabalho que possibilitaram o estudo

Pela educação, lições de vida e moral

Aos meus irmãos

Wellington Ricardo da Silveira e Grazielle M. da Silveira (In memorium)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves, com quem muito aprendi, pela orientação, pela amizade e pela oportunidade de crescimento profissional.

A Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, a quem muito admiro pela competência profissional e genialidade. Agradeço pela co-orientação e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Aos professores Dr. Antônio Carlos Monteiro, Dr. Ely Nahas, João Pizauro e a Dra. Maria Inês T. Ferro, pelas sugestões no Exame de Qualificação, as quais contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos meus amigos que foram mais que irmãos Dr. Irlan Leite de Abreu, Dr. Luciano T. Kishi, Dr. Rodrigo Mateus Pereira, Dr. Tehuni Orlando Gonzalez e Fernando César Ferreira.

Aos meus amigos de república por terem me suportado todo esse tempo e pela amizade.

A minha namorada Bruna pelo amor e dedicação nestes momentos que passamos juntos.

Aos professores da Graduação pelos ensinamentos aprendidos e conselhos.

Aos meus amigos de Graduação que me deram apoio todo esse tempo.

Aos meus amigos da equipe RPCP que ajudaram em muito para finalização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) e Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), **meus grandes amigos**, que diretamente ou indiretamente, me ajudaram neste trabalho, com os quais tive o privilégio de conviver, trocando experiências acadêmico-profissionais e, principalmente usufruindo do verdadeiro sentido da palavra amizade.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Tecnologia pelo convívio.

Aos meus pais Gervásio da Silveira e Irene M. Mastelari da Silveira, e aos meus irmãos pelo amor, dedicação.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO DE LITERATURA	03
II.1 A cultura do arroz no Brasil	03
II.2 Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas - RPCPs	04
II.3 Bactérias produtoras de fitohormônios	07
II.4 Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas	09
II.5 Principais bactérias fixadores de nitrogênio em plantas não leguminosas (gramíneas e outras culturas)	11
II.6 A Atividade da nitrogenase para seleção de promotores de crescimento em plantas	16
II.7 A importância de técnicas moleculares no estudo de diversidade de microrganismos promotores de crescimento vegetal	17
III. MATERIAL E MÉTODOS	19
III.1 Localização do Experimentos	19
III.2 Sementes e estirpes bacterianas	19
III.3 Coleta e isolamento das bactérias selvagens	19
III.4 Determinação colométrica de auxinas	23
III.5 Extração de DNA dos isolados selvagens encontrados nos cultivares Maravilha e Irga 144	23
III.6 Amplificação dos genes 16S rRNA	25
III.7 PCR para seqüenciamento	26
III.8 Sequenciamento dos produtos da PCR	26
III.9 Análise das seqüências	27
III.10 Preparação para análises filogenéticas	27
III.11 A atividade de redução de Acetileno (ARA)	28
III.12 Estudos de crescimento das plântulas de arroz irrigado em solução nutritiva	29

III.13 Análises estatísticas do experimento em solução nutritiva.....	30
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
I.V.1 Coleta e isolamento.....	33
I.V.2 Identificação dos isolados selvagens por técnica de seqüenciamento do 16S rDNA.....	40
IV.3 Atividade da redução de acetileno em etileno in vitro	47
IV.4 Promoção de crescimento em arroz por <i>Rizobium leguminosarum</i>	51
IV.5 Resultados das inoculações de bactérias isoladas de cultivares Maravilha e Irga 144	62
V. CONCLUSÕES.....	68
VI.REFERÊNCIAS.....	69
VII.APÊNDICE 01.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Jarra Magenta (Sigma) adaptada	32
Figura 2 Ilustração demonstrando o desenvolvimento das raízes pelo tubos cortados na jarra magenta	32
Figura 3 Teste colorimétrico de produção de AIA das bactérias cedidas para este trabalho cultivadas em meio de cultura DYGS suplementado com 100µg/mL de triptofano.	37
Figura 4 Teste colométrico de produção de AIA com as bactérias selvagens isoladas neste trabalho cultivadas em meio de cultura DYGS suplementado com 100µg/mL de triptofano.	38
Figura 5 Perfil eletroforético da extração de DNA dos isolados obtidos dos cultivares Maravilha e Irga 144 em gel de agarose 1,5% contendo o Brometo de etídeo (0,5mg/µl).	41
Figura 6 Perfil eletroforético de DNA dos isolados selvagens de arroz Marvilha e Irga 144 em gel de agarose 1,5% contendo Brometo de etídeo (0,5 mg/µl).	41
Figura 7 Perfil eletroforético gerados a partir de fragmentos de DNA pela amplificação do DNA dos isolados bacterianos dos cultivares e Maravilha e Maravilha através do conjunto de oligonucleotídeos iniciadores Fd1/Rd1 em gel de Agarose 1% contendo Brometo de etídeo (0,5 mg/µl)	42
Figura 8 Morfologia das raízes de plântulas de arroz cultivado em solução nutritiva por 30 dias sob diferentes condições de tratamento com inoculação de <i>R. leguminosarum</i>	60
Figura 9 Ilustração demonstrando o experimento de plântulas de arroz IAC 103 cultivado em solução nutritiva por 30 dias sob diferentes condições de tratamento com inoculação de <i>R. leguminosarum</i> ..	61
Figura 10 Morfologia das raízes de plântulas de arroz cultivado em solução nutritiva por 30 dias sob diferentes condições de	

tratamento com inoculação de isolados obtidos dos cultivares Irga 144 e Maravilha..... **66**

Figura 11 Ilustração demonstrando o experimento de plântulas de arroz IAC 103 cultivado em solução nutritiva por 30 dias sob diferentes condições de tratamento com inoculações de isolados obtidos dos cultivares Irga 144 e Maravilha..... **67**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Estirpes bacterianas utilizadas neste estudo fornecidas por outras instituições.....	20
Tabela 2 Descrição dos tratamentos utilizados na inoculação de sementes do cultivar IAC 103.....	31
Tabela 3 Resultados da quantidade de isolados obtidos através dos meios de cultura no cultivar Irga 144.....	33
Tabela 4 Resultados da quantidade de isolados obtidos através dos meios de cultura no cultivar Maravilha	34
Tabela 5 Produção de AIA por bactérias provenientes da Fepagro, Embrapa e cultivares Irga 144 e Maravilha em diferentes períodos de cultivo	39
Tabela 6 Resultados das classificações taxômicas através do sequenciamento parcial do 16S rDNA dos isolados selvagens positivos para produção de AIA.....	46
Tabela 7 Atividade de redução de acetileno (ARA) dos isolados positivos para AIA.....	50
Tabela 8 Condições em que foram submetidas os experimentos com suspensões bacterianas (YM) em relação às sementes para o cultivo do IAC 103 em solução nutritiva.....	55
Tabela 9 Efeito dos diferentes tratamentos no cultivo do cultivar IAC 103 em solução nutritiva. Métodos estatísticos foram realizados pelo método Tukey pelo programa Estat.....	56 e 57
Tabela 10 Efeito dos diferentes tratamentos no cultivo do cultivar IAC 103 em solução nutritiva, com isolados obtidos dos cultivares Maravilha e Irga 144. Métodos estatísticos foram realizados pelo método Tukey pelo programa Estat.....	64 e 65

ABREVIATURAS

B – Boro

BOD – Biologic Oxygen Demand

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência.

Cu – Cobre

CuSO₄ – Sulfato de cobre

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

Fe³⁺ - Íon férrico

H₂O – Água

H₃BO₃ – Ácido bórico

K₂HPO₄ - Fosfato de potássio dibásico

KOH – hidróxido de potássio

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

MnSO₄ – Sulfato manganoso

N₂O – Óxido nitroso

Na₂MoO₄ - Molibdato de sodio

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NO₃ – Nitrito

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (“Polimerase Chain Reaction”)

Tris- Hidroxymetil aminometano “Hydroxymethyl aminomethane”

ZnSO₄ – sulfato de zinco

Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva

RESUMO - O arroz é o cereal mais consumido na dieta humana no mundo, sendo que o Brasil é um dos maiores produtores e consumidores desse cereal. A produção brasileira entre arroz irrigado e sequeiro é estimada entre 10 a 11 milhões toneladas por ano. Os gastos com fertilizantes nitrogenados nessa cultura provocam um alto custo de produção para o agricultor, sendo esses gastos repassados ao consumidor. Desta forma, existe a necessidade de avanços nas pesquisas sobre os microrganismos que se encontram na rizosfera de diversos vegetais e que auxiliam o vegetal na obtenção de nutrientes diminuindo o custo de produção da cultura, além de aumentar a produção de grãos. O objetivo deste trabalho foi avaliar cinco estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* e isolados selvagens obtidos de dois cultivares de arroz no Brasil, avaliar quanto à produção de ácido indolacético, potencial de fixação biológica de nitrogênio e capacidade de promover o crescimento de arroz em solução nutritiva. Os ensaios com arroz foram realizados em uma câmara de crescimento, em um delimito inteiramente casualizado em um período de 30 dias. Todos os isolados *R. leguminosarum* deste experimento e 19 isolados selvagens foram positivos para a produção de ácido indolacético *in vitro*. As estirpes SEMIAs 2051 e 235 foram às maiores produtoras de ácido indolacético com 91,56 µg/mL e 68,30 µg /mL, respectivamente. Entretanto somente três estirpes de rizóbios e 12 isolados selvagens conseguiram reduzir acetileno a etileno em condições laboratoriais, sendo a SEMIA 2051 a que mais se destacou. Inoculações de sementes de arroz com as estirpes SEMIAs 235, 2050, 2051 e MT6 resultaram em aumento significativo em relação à massa seca, e no números de raízes laterais nas radículas das plântulas em 30 dias. (para $P \leq 001$). Este estudo indicou que as bactérias SEMIAs 235, 2050 e 2051 e MT6 podem promover o crescimento de arroz em solução nutritiva, sendo portanto, considerados importantes para o desenvolvimento de inoculantes para esta cultura, permitindo a diminuição dos custos e aumento da produção.

Palavras chave: ácido Indolacético, fixação de nitrogênio, inoculantes, isolamento, raízes.

Inoculations of promotion bacteria of growth in the culture of rice in nutritional solution

ABSTRACT - Rice is the most consumed cereal grain in human food and Brasil is one of the most important producers of this culture. Brazilian production of irrigated and non-irrigated Rice is estimated in 10 – 11 millions of thousand kilograms per year. Nitrogenated fertilizers represents an important part f the production costs that are repassed to the final consumers. In this way, there are needs of more efforts in research about microorganisms that live in plant rizosphere and that were able to help the plant to obtain nutrients from the soil, mainly nitrogen, and so, increase the production while decreasing the production costs. This work has the objective of evaluate the indolacetic acid production of five strains of *Rhizobium leguminosarum* by *trifolii*, and e wild isolated of two cultivating of rice in Brazil its biological nitrogen fixation potential and its capacity to promote rice growth in nutritional solution. Essays were carried out in growth chamber with outline completely casualized during 30 days. All strains of *R. leguminosarum* and wild isolated produced indolacetic acid, and SEMIAs 2051 and 235 were the higher producers, with 91,56 µg/mL and 68,30 µg /mL, respectively. However, only three strains and 12 wild isolated were able to reduce acetilene to etilene in laboratorial conditions, and SEMIA 2051 was the most efficient strain. Inoculations in Rice seeds that were made with SEMIAs 235, 2050, 2051and MT6 strains resulted in a significative increase in dry mass and in the number of lateral roots in the plants in 30 days ($P \leq 001$). This work showed that strains SEMIAs 235, 2050 e 2051 and MT6 can promote Rice growth in nutritive solutions and so, are important for the developing of inoculants that could be used for this culture, reducing the cultural costs and also increase the rice production in world.

Keywords: indolacetic acid, biological nitrogen fixation, inoculants, isolation, root.

I. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o cereal mais consumido na dieta humana no mundo, sendo que o Brasil é um dos maiores produtores e consumidores desse cereal. Estima-se que a produção brasileira de arroz irrigado e de sequeiro esteja entre 10 a 11 milhões de toneladas por ano. Os gastos com fertilizantes nitrogenados nessa cultura provocam um alto custo de produção para o agricultor, sendo esses gastos repassados ao consumidor. Desta forma, existe a necessidade de avanços nas pesquisas sobre microrganismos que se encontram na rizosfera de diversos vegetais e que auxiliam o vegetal na obtenção de nutrientes, diminuindo o custo e aumentando a produção.

As Rizobacterias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCPs) representam uma grande variedade de bactérias de solo que, quando associadas com plantas, levam a um aumento substancial da área da raiz. Esse aumento na superfície radicular promove uma maior eficiência na retirada de água, macro e micronutrientes pelas plantas. Outro aspecto importante é que as RPCPs apresentam um relativo efeito antagônico sobre muitos microrganismos patogênicos, promovendo, portanto, um eficiente controle biológico na natureza.

A utilização dos microrganismos na forma de inoculantes biológicos pode ajudar o mercado agrícola, pois é uma das tecnologia mais eficientes em substituir métodos tradicionais de adubação com fertilizantes a base de uréia, e atualmente é utilizado principalmente em culturas de leguminosas. Na cultura de arroz inoculantes nacionais direcionados para esta cultura não estão ainda disponíveis no mercado brasileiro, devido que o processo de fixação biológica de nitrogênio não é tão eficiente como para as leguminosas existindo resultados controversos relacionados à baixa sobrevivências dos microrganismos no solo e à necessidade reinoculação das plantas após a germinação.

O Brasil é um dos países pioneiros em utilização das bactérias de diazotróficas como produtos comerciais formados por bactérias de solo chamados rizóbios que formam estruturas especializadas nas raízes plantas para a redução e o repasse do nitrogênio em uma forma assimilável para as leguminosas, entretanto

muitos estudos apontam que esta bactéria tem habilidade de colonizar as raízes de não leguminosas, sugerindo outro mecanismo de estimulação para o crescimento e desenvolvimento da planta.

Devido ao aumento dos avanços nas pesquisas sobre descobertas de novos microrganismos que possam ser utilizados futuramente como produtos agrícolas em gramíneas. A biotecnologia ganhou um novo aliado para diversidade e classificações microbianas dos solos através metodologias moleculares, pois as técnicas tradicionais não supre as necessidades de situá-la, sobretudo, em seu contexto ecológico.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar estirpes isoladas de diferentes cultivares Maravilha e Irga 144 em duas localidades do Brasil, e estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* o potencial de serem consideradas bactérias promotoras de crescimento de plantas. Essa avaliação foi realizada através da produção de ácido indol acético, da fixação de nitrogênio medida pela redução acetileno *in vitro* e também do efeito da inoculação destas em sementes de arroz em condições de laboratoriais. As bactérias que se comportaram como RPCP poderão futuramente ser utilizadas em ensaios em casa de vegetação e em campo como inoculantes para o arroz.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II.1 A cultura do arroz no Brasil

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma planta da família *Poacea*, monocotiledônea da ordem *Glumiflorae*. O ciclo de vida da planta varia de 80 a 280 dias, dependendo da variedade, e a maturação dos grãos ocorre entre 15 a 40 dias. As raízes fasciculadas de muitas variedades de arroz de sequeiro alcançam profundidade de 1m, por outro lado, as raízes do arroz raramente atingem 40cm em solos inundados (SOUZA, 2000).

Esta gramínea originária da Ásia atualmente é cultivada em todo mundo (SOUZA, 2000) e é o cereal mais consumido pela população mundial (GUIMARÃES et al., 1999; EL-KHAWAS & ADACHI, 1999; KENENDY, et al., 2004), sendo que cerca de 2,4 bilhões de pessoas dependem do arroz para a sua alimentação (BIWAS et al., 2000). Existe uma previsão de que aproximadamente 8 milhões de pessoas dependerão deste cereal em 2020, desta forma há necessidade de aumento da produção mundial em 2% ao ano para se atender à necessidade futura desse alimento (PERRINE et al. 2001). Entretanto, nos últimos 10 anos, a produção de arroz no mundo tem se mantido estacionária (GUIMARÃES & SANT'ANA, 1999).

O Brasil destaca-se como um dos países mais importantes quanto à produção e consumo de arroz do mundo, produzindo anualmente entre 10 e 11 milhões toneladas desse cereal em uma área de 4,9 milhões de hectares. Esta produção se encontra dividida quase equitativamente entre o plantio do arroz irrigado e do tipo sequeiro e equivale a 80% do que é consumido pela população. A preferência do consumidor brasileiro é pelo arroz longo fino, com o consumo médio anual de aproximadamente 54 kg/hab/ano, existindo, portanto, a necessidade do país importar 1 a 2 milhões de toneladas desse cereal a cada ano (GUIMARÃES et al., 1999; GUIMARÃES, 2007).

As perspectivas de aumento de produção do arroz no país para os próximos anos são favoráveis, principalmente considerando-se a abertura de novas áreas de

plântio que eram destinadas à soja e milho, nos cerrados ([http:// www.arroz.agr.br](http://www.arroz.agr.br)). O cultivo de arroz requer solos com grandes quantidades de nutrientes para seu crescimento, desenvolvimento e produção. Para a produção de uma tonelada de grãos de arroz são necessários 16 a 17 kg de nitrogênio, entretanto muitos solos brasileiros são deficientes neste mineral (CHOUDHURY & KENNEDY, 2004). Atualmente, para suprir a demanda alimentar de arroz, grande quantidade de minerais é aplicada ao solo para se melhorar o crescimento e captação de nutrientes pelo vegetal. Dentre esses suplementos, o nitrogênio (N) é o mais importante, porém as aplicações em excesso deste elemento podem resultar em poluição ambiental, como a contaminação de lençóis freáticos por NO₃, acidificação do solo e aumento da taxa de desnitrificação, resultando no aumento da emissão de N₂O para a atmosfera (BISWAS et al., 2000; KENNEDY et al., 2004).

Geralmente a uréia é a fonte mais comum de N usado nos solos, mas apenas aproximadamente 50% do que é aplicado ao solo é utilizada pela planta. Aplicações em excesso deste nutriente podem gerar inúmeros fatores fisiológicos negativos, podendo até interromper o crescimento da planta. Este mesmo processo pode se repetir também com o nutriente fósforo (KENNEDY et al., 2004).

Para reverter este quadro de impacto ambiental provocado pela adubação em excesso na cultura do arroz e pelas dificuldades de equilíbrio na adubação de gramíneas, existem diversos estudos com relação à aplicação e à utilização de adubos biológicos na cultura do arroz e de outros cereais de importância econômica mundial. Desta forma, tais adubos poderão ser substituídos por formulações constituídas, principalmente, por bactérias fixadoras de nitrogênio, também denominadas diazotróficas (FERREIRA et al., 2003; XIE et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2003).

II.2 Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas – RPCPs

As plantas não são capazes de crescer e muito menos de se desenvolver sem o auxílio dos microrganismos. No solo existe um grande número de bactérias

que se localizam na rizosfera (região de poucos milímetros de espessura de solo em torno da raiz). Aproximadamente 7 a 15% da superfície total das raízes é ocupada por estas células microbianas (GRAY & SMITH, 2005). Entretanto, apesar da importância dos microrganismos no desenvolvimento de vários vegetais, trabalhos utilizando microrganismos como biofertilizantes em arroz ainda são recentes. Existem resultados positivos com a utilização de microrganismos como substitutos de produtos agropecuários à base de uréia, dentre os quais podem ser citados os pertencentes aos gêneros: *Azotobacter*, *Clostridium*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*. Além disso, existem trabalhos que relatam a utilização como biofertilizante de outro gênero bacteriano, o *Rhizobium*, que pode suplementar a ausência do fertilizante nitrogenado através da promoção do crescimento (CHOUHURY & KENNEDY, 2004).

Recentemente estudos sobre a atividade microbiológica na rizosfera de diversos vegetais levaram ao descobrimento de grupos de microrganismos importantes para o desenvolvimento vegetal. Dentre eles estão as rizobactérias, capazes de colonizar as raízes, estimulando-as diretamente ou beneficiando o crescimento e o desenvolvimento de diversas plantas. Essas bactérias são chamadas Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas ou RPCP (BISWAS et al., 2000; GYANESHWAR et al., 2001; GRAY & SMITH, 2005; BARRIUSO et al., 2005; KOKALIS-BURELLE et al., 2006; COOK, 2007; KRAVECHENCKO, et al. 2007).

A maioria das RPCPs bacterianas estudadas na literatura são gram negativas, e o seu principal efeito sobre as plantas é o fornecimento de fitohormônios de crescimento como auxinas, várias giberelinas e citocininas (EL-KHAWAS & ADACHI, 1999). A presença desses compostos auxilia o crescimento da raiz e da parte aérea do vegetal aumentando a captação de nutrientes pela planta (ANTOUN et al., 1998, ASGHAR et al., 2002). Além disso, estas bactérias também contribuem indiretamente para o desenvolvimento da plantas através da produção de diversos antibióticos ou outros mecanismos de biocontrole, os quais inibem o crescimento de diversos microrganismos considerados fitopatogênicos (DASHI et al., 1998, GRAY & SMITH, 2005).

Um exemplo de RPCP que provocou um efeito indireto na promoção de

crescimento em plantas foi o trabalho realizado por LUZ (2001) que utilizou estirpes de *Pseudomonas putida* e *Pantoea agglomerans*. Estas bactérias promoveram um maior crescimento do trigo nas regiões de Passo Fundo e Pato Branco no sul do Brasil, e reduziram a ocorrência de fungos patogênicos.

O sucesso do controle biológico em associação antagonista de patógenos em gramíneas precisa ser melhor compreendido. É necessário um melhor conhecimento não só da interação planta-bactéria, mas também de uma série de fatores dinâmicos bióticos e abióticos que podem regular os ecossistemas (YANG, et al., 2008).

Desta forma, GRAY & SMITH (2005) propuseram dois novos conceitos para se classificar ou dividir as bactérias RPCPs:

(1) **iRPCPs** – são bactérias que residem dentro das células das plantas, produzindo nódulos, estruturas especializadas em fixação de nitrogênio em leguminosas. Atualmente, as bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* são as mais estudadas deste grupo, mas existem outros gêneros bacterianos de solos que pertencem a essa categoria como: *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*.

(2) **eRPCPs** – bactérias que se desenvolvem extracelularmente nos tecidos das raízes de diversas plantas, não produzindo nódulos, mas com capacidade de promover o crescimento vegetal através da produção de sinais ou substâncias específicas. Nesta categoria podem ser incluídas bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*.

Além destas, existem bactérias que podem ser classificados tanto como iRPCPs ou eRPCPs, como as pertencentes ao gênero *Burkholderia* (GRAY & SMITH, 2005).

Alguns sinais envolvendo plantas ePGPRs ainda não estão bem compreendidos e precisam ser melhor investigados, embora se saiba que algumas bactérias desta categoria podem produzir e secretar certas moléculas com peso molecular entre 400 a 1000 Da, como o caso de bactérias produtoras de sideróforos, que blindam as raízes com Fe^{3+} , protegendo-as contra o ataque de fitopatógenos (GRAY & SMITH, 2005).

Pesquisas de eRPCPs se concentraram inicialmente em *Bacillus* sp, que são bactérias gram-positivas. Este microrganismo pode ser usado separadamente ou

também como co-inoculantes, quando aplicado com bactérias gram-negativas tais como o *Bradyrhizobium japonicum*. Em plantas de grão de bico, sua associação com bactérias do gênero *Rhizobium* auxilia no aumento da solubilização de fósforo no solo. Entretanto, aplicação do *Bacillus* sp sem outro coadjuvante pode provocar vários efeitos nas plantas dependendo da característica do solo, tendo sido detectado um aumento de crescimento significativo em tomate, amendoim e em espécies florestais como *Pinus* (GRAY & SMITH, 2005).

DASHI et al. (1998) apontaram um efeito positivo no aumento do crescimento das plantas de 5 a 30% em diversas culturas como milho, algodão, lentilha, canola, e arroz, dentre outros, após o tratamento com bactérias iRPCPs ou eRPCPs.

II.3 Bactérias produtoras de fitohormônios

A produção de fitohormônios, como auxinas, citocinas e giberelinas, são os mais comuns mecanismos encontrados de promoção de crescimento em plantas por eRPCPs (GRAY & SMITH, 2005).

A auxina é uma classe de fitohormônio que funciona em baixas concentrações, para regular o crescimento e desenvolvimento da planta, ocorrendo na natureza na forma de ácido indolacético, AIA (LEBUHN & HARTMANN, 1993; GRAY & SMITH, 2005). Além disso, outros hormônios que estimulam o desenvolvimento e o crescimento nos vegetais já há muito tempo foram encontrados como metabolitos bacterianos, por exemplo, a citocinina e a giberelina (GRAY & SMITH, 2005).

ZAHAROVA et al. (1999) apontaram que 80% das bactérias isoladas de rizosfera são capazes de produzir AIA. Entretanto existem poucos trabalhos sobre a biossíntese de auxinas por microrganismos do solo em seu próprio ambiente, porém sabe-se que o aminoácido L-triptofano (L-Trp) é um precursor fisiológico para a biossíntese de auxinas em diversas plantas e microrganismos e que a enzima chamada ipdC (indole-3-pyruvate decarboxylase – EC 4.1.1.74) é a enzima chave para a biossíntese destes compostos (LEBUHN & HARTMANN, 1993).

A síntese de AIA nos microrganismos também pode ocorrer através de outras vias biossintéticas, sendo a mais comum aquela que ocorre a partir do indol-3-

acetaldeído (Ipya) (BROEK et al., 1999).

Processos de identificação de AIA em laboratório são freqüentemente utilizados para identificação e seleção de RPCPs. Desse modo, ONA et al. (2005) realizaram ensaios *in vitro*, nos quais as condições ambientais que beneficiariam a produção de auxinas por *Azospirillum brasilense* foram adequadas. Estes autores sugeriram que o relacionamento entre esta espécie bacteriana e a raiz é um fator favorável para a produção de AIA, pois essas interações apresentam características que beneficiam a formação deste hormônio tais como: baixas concentrações de carbono, nitrogênio e oxigênio e a presença de triptofano.

Trabalho realizado por EL-KHAWAS & ADACHI (1999) demonstraram que em condições laboratoriais, as espécies *Azospirillum brasilense* (ATCC 2970) (TARRAND et al., 1978) e *Klebsiela pneumoniae* (ATCC 13883) têm potencial para a produção AIA. Além disso, os mesmos autores verificaram que a quantidade deste hormônio produzido pode ser ajustado *in vitro*, o que se torna uma importante característica para a promoção do crescimento vegetal.

Um método eficiente para avaliar a detecção e separação de compostos indólicos, que pode ser aplicado tanto em amostras de solo como em isolados microbianos, foi utilizado por LEBUHN & HARTMANN (1993). Através da técnica de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta eficiência) e utilizando sistemas de gradiente com uma mistura de metanol, água deionizada e ácido acético, os autores demonstraram que a taxa de auxina em solos da rizosfera variava de 2,9 a 8 µg/g de solo seco. Por outro lado, utilizando as mesmas as amostras, demonstraram que houve um desvio de até 5% nas concentrações destes compostos quando a análise foi realizada com o teste colorimétrico. Assim, os grandes impasses na aplicação do método do CLAE seriam a necessidade de um especialista para execução e o alto custo das análises que, dependendo do objetivo do trabalho, tornando essa técnica inviável.

CHI et al., (2005) detectaram por CLAE que isolados adaptados entre *Rhizobium* e arroz têm apresentado uma produção regular de AIA e giberelinas em culturas *in vitro* e um aumento extraordinário de AIA nos exudatos de raízes após 40 dias da germinação. Foram observados ainda elevados níveis de AIA e giberelinas extraídos de folhas de arroz quando inoculados com *Sinorhizobium meliloti* e

Azorhizobium caulinodans.

Um outro hormônio sintetizado pelos microrganismos é a citocinina que também auxilia no crescimento de diversas espécies de vegetais, atuando nas divisões celulares, na germinação das sementes, na expansão das raízes e folhas e também na senescência do vegetal. Dentre os microrganismos produtores deste composto podemos citar a espécie *Pseudomonas fluorescens* que produz altas concentrações deste fitohormônio (GRAY & SMITH, 2005). Por outro lado, algumas bactérias como o *Bacillus* sp também produzem altos níveis de giberelinas, que induzem efeitos positivos no crescimento de caules e galhos de diversas plantas (GRAY & SMITH, 2005).

Além disso, é comum encontrar microrganismos de solo que produzem altas concentrações de vários fitohormônios, que causam efeitos positivos em gramíneas, como é o exemplo de *Acetobacter diazotrophicus* (CALVACANTE & DÖBEREINER, 1988) e *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986) que produzem tanto o AIA como três diferentes compostos de giberelinas (BASTIAN et al., 1998).

II. 4 Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes para a produtividade de diversas culturas (GUIMARÃES et al. 2003), por ser constituinte de diversas moléculas como os ácidos nucleicos, aminoácidos, bases nitrogenadas, clorofila, dentre outros (FERREIRA, 2008, MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). A maior parte do nitrogênio está presente na crosta terrestre (93,8%) e o restante se encontra na atmosfera na forma de N_2 , entretanto essa forma química não é acessível nutricionalmente para os seres eucariotos e para a maioria dos procariotos. Para que este macro elemento esteja disponível para os seres vivos é necessária a atuação de microrganismos que possuam a enzima nitrogenase, capazes de reduzir este elemento atmosférico em substâncias que podem ser assimiladas pelos vegetais e outros seres vivos, sendo denominados fixadores de N_2 ou diazotróficos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um processo utilizado pelos diazotróficos e é uma tecnologia importante para substituir os adubos nitrogenados

em determinadas culturas vegetais, que podem gerar impactos ambientais e gastos econômicos. Através da utilização de microrganismos que fixam nitrogênio do ar, o crescimento e o desenvolvimento do vegetal podem ser melhorados. Esse processo consiste na colonização, pelos microrganismos, de diferentes tecidos das plantas, como raízes e folhas. Além disso, tais microrganismos podem contribuir com o desenvolvimento vegetal habitando a rizosfera da planta (BARRAQUIO, 1997; CHOUDHURY & KENNEDY, 2004).

O Brasil é um dos países pioneiros em utilização das bactérias diazotróficas em vegetais na forma de inoculantes biológicos, sendo tal tecnologia um dos mais eficientes métodos de adubação disponíveis no mercado agrícola (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Os inoculantes também são chamados de biofertilizantes e são constituídos por bactérias diazotróficas, as quais contribuem para o crescimento e desenvolvimento de diversas culturas e, conseqüentemente, no aumento da produção agrícola (YANNI et al., 1997). Além disto, o uso desses biofertilizantes também pode diminuir e até mesmo solucionar o impacto ambiental causado no campo e nos lençóis freáticos gerado pelo uso abusivo de adubo nitrogenado industrializado (YANNI et al., 1997; BISWAS et al., 2000; GYANESHWAR et al., 2001; GRAY & SMITH, 2005).

O maior exemplo de aplicação de inoculante realizado com bactérias fixadoras de nitrogênio em produção de grãos é o da soja. Esta biotecnologia possibilita ao Brasil uma economia de 3 bilhões de dólares ao ano (<http://www.cnpab.embrapa.br>). Esse inoculante contém bactérias fixadoras de nitrogênio específicas, chamada rizóbios, que contribuem para o desenvolvimento desta leguminosa. Os rizóbios, quando em contato com as raízes das leguminosas induzem a formação de nódulos, onde ocorre o processo de aproveitamento do nitrogênio do ar por estes microrganismos (CHI et al., 2005).

Para plantas não leguminosas o processo de FBN não é tão eficiente como para as leguminosas. Resultados controversos observados em diversos trabalhos apontam que tal tecnologia ainda precisa ser melhor avaliada, principalmente quanto à baixa sobrevivências dos microrganismos no solo e à necessidade reinoculação das plantas após a germinação (FERREIRA, 2008).

Atualmente, inoculantes nacionais direcionados, por exemplo, para o arroz

ainda não estão disponíveis no mercado brasileiro. Mesmo porque, os trabalhos acadêmicos com finalidade de mostrar a eficiência de aumento de produção nessa gramínea ainda não são conclusivos a ponto de se implantar um produto no mercado FERREIRA et al., (2003). Desse modo, existe a necessidade da realização de mais estudos em laboratório e campo sobre a utilização de inoculantes para a fixação de nitrogênio em arroz ou outra gramínea

II.5 Principais bactérias fixadores de nitrogênio em plantas não leguminosas (gramíneas e outras culturas).

A maioria das espécies fixadoras de nitrogênio é de vida livre, ocorrem em diversos tipos de solos, rizosfera, em águas doce ou salgada, em associações com fungos e até em tratos de animais ou cupins. Esses microrganismos apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Além disso, podem invadir e podem invadir endofiticamente as plantas colonizando tecidos internos. (CRAWFORD, et al, 2000; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A ocorrência destas bactérias é comum em gramíneas e em outras monocotiledôneas, como as palmeiras e *Orchidaceae* (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Avanços sobre as pesquisas de FBN em gramíneas ocorreram graças ao desenvolvimento de meios de cultivo especiais, como meio NFb e JNFB livre de N os quais, sem uma fonte nitrogenada e sob a condição semi-sólida, criam um ambiente ideal para o desenvolvimento dos microrganismos e para a fixação de nitrogênio atmosférico. Tal ambiente se assemelha ao que ocorre no solo ou internamente nas plantas, com níveis de baixos de oxigênio (BALDANI, 1980; OLIVEIRA et al., 2002).

Apesar de que as pesquisas de diazotróficos terem sido iniciadas no Brasil na década de 50, por Döbereiner e outros pesquisadores, com os gêneros *Azotobacter* e *Beijerinckia*, somente trinta anos depois estas pesquisas foram intensificadas com o gênero *Azospirillum* (BALDANI & BALDANI, 2005; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A principal RPCP estudada atualmente no Brasil com capacidade de ser redutora de N₂ em gramíneas, é uma bactéria pertencente ao gênero *Azospirillum*

(EL-KHAWAS & ADACHI, 1999; RADWAN et al., 2005). Este microrganismo é aeróbico, heterotrófico, sendo extensivamente encontrado nas rizosferas em gramíneas, apesar de poderem penetrar e crescer intercelularmente em raízes de arroz. Estirpes de *Azospirillum* usadas como inoculante em cultura de arroz foram capazes de promover crescimento de produção de grãos em casa de vegetação de 32 a 81%. Tais resultados se mostraram dependentes da espécie utilizada e proporcionaram um aumento de 22% na produção em relação ao controle sem a inoculação, em condições de campo (EL-KHAWAS & ADACHI, 1999). Esta bactéria é uma fonte natural de auxinas para os vegetais não leguminosos e, portanto com grande interesse agrícola. Além disso, KENNEDY et al. (2004) demonstraram que o *Azospirillum* pode penetrar na raiz para crescer internamente nas células como uma bactéria endofítica.

BALDANI et al., (1997) descreveram que existem muitas informações sobre as propriedades fisiológicas e ecológicas do gênero *Azospirillum*, mas infelizmente ainda faltam algumas informações sobre os mecanismos de interação que existe entre bactéria – planta, assim como informações sobre os genes envolvidos neste processo.

Desde 1990, com o objetivo de reduzir custo excessivo com fertilizantes, a Embrapa Agrobiologia, vem pesquisando a utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante em culturas de arroz. Existem previsões de que o produtor, utilizando tal insumo poderá reduzir os gastos com a produção de arroz em até 30 por cento. *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986) é a melhor bactéria encontrada até o momento para ser usado futuramente como inoculante na cultura do arroz. Além disso, estudos revelaram que a aplicação deste microrganismo nesta gramínea leva à produção de grãos com maior conteúdo protéico. No entanto, até o momento não existe ainda nenhum produto comercial nacional disponível para o mercado. Além dos experimentos em casa de vegetação e na área experimental da Embrapa Agrobiologia, também estão sendo realizados diversos testes, com inoculantes para arroz, em várias regiões do Brasil (<http://www.cnpab.embrapa.br>).

A espécie *H. seropedicae* é uma bactéria diazotrófica endofítica e que já foi isolada em diferentes gramíneas como, por exemplo, milho, sorgo, arroz, cana-de-

açúcar e também em palmeiras (BALDANI et al., 1997; CHOUDHURY & KENNEDY, 2004). Esta bactéria não sobrevive adequadamente em solo natural e pode ser afetada por diversos fatores bióticos que existe nesse habitat (BALDANI et al., 1997), entretanto testes realizados em casa de vegetação com a inoculação desta bactéria em arroz aumentaram sensivelmente a extensão da raiz em 44 a 90% em relação ao controle (KENNEDY et al., 2004).

BALDANI et al. (2000) avaliaram em casa de vegetação a contribuição de FBN de diferentes isolados de *H. seropedicae* e *Burkholderia* sp. em diferentes cultivares em arroz sequeiro. Os resultados demonstraram que 90 estirpes estudadas levaram a um aumento de peso fresco das plantas, mas duas dentre estas estirpes se destacaram (ZAE 67 e ZAE 54) pois causaram um aumento de 31 e 54% nesse parâmetro respectivamente.

Foi demonstrado que a estirpe *H. seropedicae* produz altos níveis de AIA e giberelinas (GRAY & SMITH, 2005). Em outro ensaio, BALDANI (1996) utilizando essa bactéria em experimentos gnotobióticos e em vasos, demonstrou que 23 estirpes de *H. seropedicae* promoveram um aumento na parte área das plântulas de arroz, após trinta dias do plantio, em comparação com a testemunha sem inoculação. Dentre estas, sete foram mais promissoras proporcionando um aumento na fixação biológica de nitrogênio (FBN) de cerca de 50% em relação à testemunha. No mesmo trabalho o autor mostrou que a bactéria *Burkholderia* sp. apresentou resultado semelhante aos obtidos com *Herbaspirillum* ssp no processo de FBN quando inoculadas em arroz.

Bactérias do gênero *Rhizobium* sp., normalmente são saprófitas e considerados como simbiontes específicos para leguminosas, entretanto muitos estudos apontam que este gênero bacteriano tem habilidade de colonizar as raízes de não leguminosas, sugerindo outro mecanismo de estimulação para o crescimento e desenvolvimento da planta (CHABOT et al., 1996; ANTOUN et al., 1998). Trabalho realizado por BISWAS et al. (2000) indicaram que espécies bacterianas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* E11 e IRBG74 promoveram considerável aumento no comprimento das raízes de plantas de arroz (20 a 40%). Além disso, PRAYITMO et al (1999) detectaram por técnica de microscopia eletrônica de fluorescência, que algumas estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, em

condições de laboratório, colonizam, multiplicam-se internamente em cultivares de arroz e migram para diversos tecidos da planta inclusive para as raízes laterais.

PERRINE et al. (2001) relataram que estirpes de *Rhizobium* sp contêm acima de 10 plasmídeos com diferentes tamanhos (150 a 1700 pares de bases), o que representam algo em torno de 25 a 50% do total do genoma. Esses mesmos autores pesquisaram, em diferentes estirpes de rizóbios, plasmídeos envolvidos na estimulação ou inibição do crescimento e desenvolvimento do arroz e observaram que quando esses plasmídeos foram mutados, em sítios específicos, as estirpes deixavam de promover o crescimento dessa planta.

Estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* foram encontradas por YANNI et al. (1997) trabalhando com cultivares de arroz no Egito e confirmaram que não contribuem diretamente para o termo FBN, mas detectaram a redução de impacto de poluição ambiental com a diminuição de produtos a base de N aplicação no solo e um aumento de produção 25 a 33% em relação ao controle.

A habilidade natural que várias estirpes de rizóbios possuem para infectarem cereais começou a ser explorada, mas ainda faltam muitas informações que precisam ser avaliadas (YANNI et al., 1997). CHI et al. (2005) demonstraram por microscopia eletrônica que a associação entre *Rhizobium*-arroz é muito complexa e dinâmica. Os autores citados sugeriram que esse gênero bacteriano possui um futuro em potencial para ser utilizado como biofertilizante para o arroz. Além disso, mostraram que este microrganismo não utiliza somente as quebras ou lesões de tecido das plantas, mas podem entrar ativamente pelos das raízes principais e laterais das plântulas. Eles possuem um processo dinâmico de infecção onde as bactérias migram de forma ativa para o interior das raízes e se deslocam para outras partes do vegetal como folhas, caules e galhos.

Além da cultura de arroz, existem outros trabalhos com RPCPs, em diversas culturas economicamente importantes, que selecionaram diferentes espécies bacterianas. CHABOT et al., (1996) isolaram bactérias de acordo com as características de solubilização de fósforo, e testaram quais seriam as possíveis espécies que podiam sobreviver e colonizar a rizosfera de milho e alface. Essas bactérias foram avaliadas para se verificar quais poderiam ser RPCPs e os melhores resultados foram observados com a espécie de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*

Semia P31 e R1. Essas bactérias se encontravam em maior número nas raízes, depois de 5 semanas da inoculação, em relação aos demais microrganismos analisados. Os autores propuseram estas duas estirpes como possíveis candidatos a bactérias promotoras de crescimentos do milho e alface.

Outro trabalho realizado com RPCPs em milho, descrito por WU et al. (2004), tinha como objetivo principal a troca da aplicação de fertilizantes químicos nesta cultura por fertilizantes biológicos, aumentar a produção desta planta e melhorar a fertilidade de solo. Os testes foram realizados em casa de vegetação com quatro biofertilizantes diferentes, contendo quatro espécies de microrganismos cada um. Os microrganismos utilizados nesse estudo foi o fungo *Glomus mosseae* e as bactérias *Azobacter chroococum*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus mucilaginosus* e todos os experimentos mostraram aumento de biomassa, germinação e assimilação nutricional da planta (NPK).

Trabalhos com RPCPs também podem ser observados em espécies silvestres. BARRIUSO et al. (2005) isolaram 720 estirpes bacterianas selvagens da rizosfera de duas espécies de *Pinus* (*P. pinea* e *P. pinaster*), deste total metade dos isolados apresentavam testes positivos para degradação do ácido aminociclopropanocarboxílico (ACC), produção de sideróforos, solubilização de fosfato e auxinas. Os autores também realizaram testes moleculares com PCR-RAPDs (random amplified polymorphic DNA) indicando uma baixa taxa de diversidade entre os isolados (85% de similaridade). Nesse estudo os isolados foram reunidos em 10 grupos diferentes sendo que pelo menos um representante de cada grupo tinha a capacidade de aumentar a biomassa da raiz e melhorar a simbiose que existem entre a micorrizas e a espécies de *Pinus*.

II.6 A atividade da nitrogenase para seleção de promotores de crescimento em plantas.

Espécies fixadoras de nitrogênio podem colonizar a rizosfera e também ocorrer endofiticamente em diversas plantas, desse modo, a identificação de isolados selvagens fixadores de nitrogênio é um elemento chave para produção de futuros inoculantes biológicos. Experimentos em gramíneas confirmaram a assimilação do nitrogênio atmosférico pelos auxílios dos microrganismos através do método de incorporação do N^{15} . Nas culturas de gramíneas as identificações e classificações de isolados selvagens é muito complicado, devido à ausência de diferenciações anatômicas, ao contrário do que ocorre nas leguminosas, especialmente nas raízes, como o caso da soja, feijão e amendoim, principalmente nas regiões das raízes, onde há a formação de nódulos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A taxônomia avançou muito nas últimas duas décadas quanto a fixação de N_2 , não só pelos avanços de biologia molecular (gene *nif*), mas também avanços e aperfeiçoamentos das técnicas qualitativas e quantitativas da atividade da nitrogenase (CRAWFORD, et al, 2000; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A nitrogenase é uma enzima versátil composta por duas unidades básicas: uma unidade ferro-proteína que coleta a força redutora e a outra unidade ferro-molibdênio, que reduz o substrato. Além disso, a nitrogenase tem a capacidade de reduzir outros compostos fora o N_2 , ela cataliza por exemplo, a redução do acetileno em etileno – ARA (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Tal capacidade de redução do acetileno pode ser medida por cromatografia gasosa e é considerado um processo rápido e de baixo custo, para ser usado em análises qualitativas ou quantitativas da nitrogenase. Desse modo, a técnica de redução do ARA é utilizada para se detectar a enzima nitrogenase e identificar espécies de diazotróficos (XIE et al., 2003; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

III. 7 A importância de técnicas moleculares no estudo da diversidade de promotores de crescimento vegetal

O uso da taxonomia tradicional não supre as necessidades para o conhecimento de uma espécie bacteriana, tendo em vista a necessidade de situá-la, sobretudo, em seu contexto ecológico (CANHOS et al., 1997).

A partir da década de 80, um grande número de metodologias moleculares vem sendo desenvolvido para análise da diversidade microbiana dos solos (AMANN et al., 1995; BORNEMAN et al., 1997; CULLEN e HIRSCH, 1998; SANDAA et al., 1998), tornando-se cada vez mais rotineiras (DROZDOWICZ, 1997). Tais metodologias utilizam o DNA genômico total, extraído diretamente do meio ambiente e ampliações via PCR tornam possível a identificação dos microrganismos ainda desconhecidos e não cultivados presentes na amostra (BORNEMAN et al., 1996; CANHOS et al., 1997; DROZDOWICZ, 1997, VALADARES-INGLIS e MELO, 1998; DOJKA et al., 1998; MACRAE, 2000; KENT e TRIPLET, 2002).

A utilização do gene 16S rRNA revolucionou o campo da ecologia microbiana e, com seu uso, é possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas de meio ambiente (LUDWIG, et al., 1997; KUSKE et al., 1997; HENTSCHEL, et al., 2002). Os estudos com o gene 16S rRNA foram iniciados por Carl Woese que argumentou que esta molécula era um excelente marcador molecular (ATLAS & BARTHA, 1998).

Os RNAs ribossômicos estão entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente em todos os seres vivos. Seu papel funcional no sistema de processamento de informações deve ter sido bem estabelecido nos primeiros ancestrais comuns de Bactéria, Arquea e Eucaria. Os genes dos rRNA em todos os organismos contemporâneos partem de um ancestral comum e eles não parecem submeter-se à transferência lateral de gene entre espécies. Por causa das unidades funcionais, grandes porções nos genes rRNA são bem conservadas e suas seqüências podem ser usadas para medir distâncias filogenéticas, mesmo entre os organismos mais distintamente relacionados. Variações nas seqüências dos nucleotídeos do gene de rRNA são indícios de mudanças evolucionárias. Resultados de filogenia baseados nas análises do gene 16S rRNA revelaram separação dos

domínios Bactéria, Archaea e Eucaria. Estudos filogenéticos moleculares proporcionam uma idéia de evolução em grande escala; quando vista desta maneira mostram a importância dos microrganismos na história evolutiva da vida na Terra, que não pode ser ignorada (ATLAS e BARTHA, 1998).

Com a evolução da aplicação das técnicas moleculares para o estudo da microbiota do solo, inúmeros métodos de extração de DNA foram aperfeiçoados. Tais métodos possuem procedimentos que envolvem a quebra ou digestão de paredes e membranas celulares para possibilitar a liberação do conteúdo genético da célula (VALARES-INGLIS & MELO, 1998).

III.MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 Localização dos Experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Plantas e Microrganismos (LBMP), do Departamento de Tecnologia, na Faculdade de Ciências e Agrárias e Veterinárias (FCAV), da Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal/SP.

III.2 Sementes e estirpes bacterianas

As sementes de arroz (safra 2004/2005) utilizadas neste experimento foram gentilmente cedidas pelo Dr. Luiz Enersto Azzini do Departamento do Centro de Grãos e Fibras/IAC e pertencem à cultivar IAC 103. Esta planta foi desenvolvida pelo Instituto Agrônômico de Campinas e adaptada às condições de sistema de cultivo inundado.

Para este trabalho foram selecionadas 05 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* adquiridas na FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) do Estado do Rio Grande do Sul, sendo elas: SEMIAs 235, 265, 384, 2050 e 2051 e mais duas estirpes *Herbaspirillum seropedicae* (Br 11175) e *Herbaspirillum seropedicae* (Br 11417), ambas cedida pela Dra. Vera Lúcia Divan Baldani, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa- Agrobiologia) do município de Seropédica. Do Estado do Rio de Janeiro, R.J. (Tabela 1).

III.3 Coleta e isolamento das bactérias selvagens

O isolamento das bactérias selvagens foi realizado em 10 plantas de arroz irrigado (cultivar IRGA 144) originárias de uma lavoura no município de Pelotas – no Estado do Rio Grande do Sul. As plantas estavam com 100 a 105 dias e nesta plantação foi aplicada uma adubação de 200 kg/ha de Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio (K) na proporção de 5:15:20. Além disso, nesta área de cultivo realizou-se outras duas aplicações de N-uréia, uma (80 kg/ha) por ocasião da entrada de água

Tabela1. Estirpes bacterianas utilizadas neste estudo fornecidas por outras instituições

Estirpe	Cultura do isolado	Classificação taxonômica	Origem
SEMIA 235	<i>Trifolium repens</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	Fepagro
SEMIA 265	<i>Trifolium pratense</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	Fepagro
SEMIA 384	<i>Vicia sativa</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	Fepagro
SEMIA 2050	<i>Trifolium vesiculosum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	Fepagro
SEMIA 2051	<i>Trifolium vesiculosum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	Fepagro
BR 11175	<i>Oryza sativa</i>	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Embrapa
BR 11417	<i>Oryza sativa</i>	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Embrapa

na lavoura, que ocorreu 20 dias após a germinação, e a outra (70 kg/ha) ocorreu na época da diferenciação do primórdio.

Outra coleta realizou-se em 10 plantas de arroz sequeiro (cultivar Maravilha) provenientes uma lavoura no município de Rio Verde no Estado do Mato Grosso, na qual as plantas foram coletadas 70 dias após as germinações das sementes. Nesta área foi aplicado somente micronutrientes foliares de Cu e B.

Para o isolamento das bactérias selvagens nestas plantas de arroz foram utilizados quatro materiais diferentes (solo, rizosfera, rizoplano e raízes). Esses materiais foram preparados e submetidos à diluição seriada (10 vezes) e plaqueamento em meio de cultivo. Este processo consistiu na adição de 100 µl da amostra à 900 µl de solução salina 0,85%, agitação de forma vigorosa em um agitador de tubos, e repetição do processo até a diluição de 10^{-7} , sendo que 100 µl das três últimas diluições (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) foram semeadas em placas de Petri (14 cm de diâmetro), contendo três meios de culturas específicos, os meios YM, NFB, JNFB (vide em Apêndice 01), suplementados com solução antifúngica de cicloheximida na concentração de 20 mg/mL. Ao todo, foram utilizadas oito réplicas para cada série diluída.

O isolamento de bactérias existentes no solo de cada cultivo de arroz, foi realizado com o excesso de solo aderido às raízes das plantas (cultivar Irga 144 e Maravilha). Desse material foram coletadas 10 g do solo os quais foram transferidos para recipientes estéreis contendo 90 ml de solução salina (NaCl 0,85%). Estes foram mantidos em agitação vigorosa por uma hora, para melhor desagregação das partículas do solo e deles retiraram-se 100 µl do sobrenadante para realização das diluições seriadas e isolamento bacteriano.

Para os isolados da rizosfera foi adotado o seguinte procedimento: as raízes das plantas de arroz dos cultivares IRGA 144 e Maravilha foram agitadas de forma cuidadosa para retirada do excesso de solo existente nas raízes plantas, mas o solo aderido à raiz (solo rizosférico) não foi excluído. Em fluxo laminar, uma solução salina 0,85% estéril foi utilizada para lavar a raiz e, dessa maneira, obter-se uma suspensão com solo rizosférico. Essa suspensão foi utilizada para a realização das diluições seriadas e plaqueamento em meio de cultivo, conforme descrito anteriormente.

Em seguida, adotou-se o procedimento de isolamento das bactérias do rizoplano. As raízes das plantas dos cultivares IRGA 144 e Maravilha foram cortadas, com o auxílio de bisturi estéril, em fragmentos de aproximadamente 3 cm, em fluxo laminar. Os fragmentos de raízes cortados foram depositados diretamente sobre placas de Petri com os meios de cultura citados anteriormente e, após três dias de cultivo, as colônias formadas foram coletadas.

Para a desinfecção das raízes e obtenção de microrganismos endofíticos utilizou-se o método descrito por DÖBEREINER (1995) com algumas modificações. Esse processo consistiu em lavar as raízes de arroz em água corrente, retirar 10 g e desinfetar as raízes por 10 minutos com etanol 70% e 5 minutos em hipoclorito de sódio 0,1%. Em seguida, porções de 10 g de raízes desinfetadas foram cortadas com um bisturi (estéril), colocadas com 90 mL de solução salina 0,85% também estéril e, maceradas com o auxílio de um pistilo, até que as raízes fossem totalmente fragmentadas. Após este processo, retirou-se 100 µl do sobrenadante para realização das diluições seriadas e isolamento bacteriano.

Ao término de todos estes procedimentos de isolamento, diluições e semeadura do inóculo, as placas após os inóculos foram incubadas em BOD, e invertidas a 30°C por um período de 3 a 5 dias, quando foi realizado o procedimento de coleta das colônias. Após a coleta das colônias, as mesmas foram estriadas e inoculadas novamente em placa de Petri com o meio de origem do isolamento. Esse procedimento repetiu-se por mais duas vezes para a confirmação da pureza das amostras.

Quando purificados, os isolados foram estocados e armazenados em tubos criogênicos, em meio de cultivo específico contendo 50% glicerol, até o momento de sua utilização no trabalho.

III.4 Determinação colorimétrica de auxinas

Todas as estirpes isoladas dos cultivares de arroz, as estirpes de rizóbios e as espécies de *H. Seropedicae* foram submetidas à avaliação da produção de Ácido Indolacético (AIA) através do método colorimétrico descrito por GORDON e WEBER (1951), com algumas modificações. Primeiramente as bactérias foram inoculadas e cultivadas em 50 mL de meio de cultura DYGS suplementado com 100 µg/mL de triptofano, no escuro, a 30°C e agitação constante de 150 rpm. As bactérias foram avaliadas em três diferentes estágios: quando o cultivo atingiu a DO₆₀₀ (Densidade ótica 600 nm) de 0,8, de 1,5 e de 3,5, com o ajuste da densidade bacteriana pela adição de solução salina 0,85%.

Após o período de cultivo nas densidades citadas, uma alíquota de 1,5 mL foi retirada de cada amostra e centrifugada durante 10 minutos, a 7.000 xg e temperatura de 15°C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubo de ensaio de vidro de 25 mL, sendo adicionados 2 mL do reagente de Salkowisk (FeCl₃.6H₂O 2% e HCl₃ 37%). Os tubos foram mantidos no escuro por 30 minutos. A presença do hormônio foi visualizada pela coloração rósea e quantificada pela absorbância a 530nm em um espectrofotômetro. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata. Como controle negativo utilizou apenas o meio de cultura DYGS. Para a estimativa de produção de AIA, utilizou-se uma curva de padrão com ácido indolacético (Sigma), com 98% de pureza, nas seguintes concentrações: 0,5, 10, 15, 25, 50, 75, 100 e 125 µg/mL..

III.5 Extração de DNA dos isolados selvagens encontrados no cultivares Maravilha e Irga144

Os isolados selvagens encontrados nas cultivares de arroz Maravilha e IRGA144, que se mostraram produtores de ácido indolacético, foram submetidos à análise molecular para a determinação taxonômica. Primeiramente foi realizada a extração do DNA genômico pela metodologia descrita por Sambrook et al. (1989) com algumas modificações. Este processo está descrito a seguir.

As bactérias foram cultivadas em 50 mL do meio Dyg's por 24 horas a 160

rpm à 28 °C. Após o cultivo, todo o meio de cultura foi transferido para tubos de centrifuga com capacidade de 250 mL para precipitação das bactérias por centrifugação a 12000 xg, por 30 minutos, a 4°C, em uma centrifuga modelo RC5C (Sorval Instruments^R – Du Pont). Após este período as células foram ressuspensas em 1mL de solução salina (0,85%) e transferidas para um microtubo com capacidade de 1,5mL. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15.600 xg, por 5 minutos, a 25°C para precipitação do sedimento celular.

Em seguida foram adicionadas às células precipitadas, 1 mL da solução salina – EDTA (pH 8,0). As suspensões foram transferidas para tubo de ensaio de vidro com capacidade de 25mL e incubadas a 37°C, por 10 minutos. Após este período adicionou-se 500 µl de solução de lizozima (5 mg/mL), preparada em uma solução tampão Tris/EDTA/Dextrose (pH 8,0) e 15 µl de RNase (10 mg/ mL). As amostras foram Incubadas a 37°C, por 40 minutos, com agitação moderada a cada 10 minutos. Ao término deste processo foram adicionadas às amostras, 500 µl de Solução SDS 20%, e estas foram incubadas à 60 °C por um período de 20 minutos.

Para precipitação do material genético e protéico dos isolados foram gotejados às amostras celulares lisadas 500 µl de perclorato de sódio (5M), agitando-se moderadamente os tubos até a formação de um precipitado. Em seguida, foram adicionados aos tubos 2 mL de solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1, v:v:v), agitando-os a 220 rpm, no gelo, por uma hora, em um agitador orbital. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos, 4 °C e 12.000 xg. Coletou-se a fase superior formada de cada amostra, as quais foram transferidas para tubos de vidro tipo corex. Em seguida, adicionou-se às amostras 2 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v:v), agitando-se as soluções a 220rpm, por 20 minutos, a 8 °C. Ao término deste período, as amostras foram centrifugadas a 5.860 xg, por 20 minutos, a 4°C. A fase superior de cada amostra foi novamente coletada e transferida para outros tubos de ensaios e repetiu-se o último processo.

Após a coleta da fase superior, adicionou-se a elas dois volumes de etanol 95% gelado, com agitação dos tubos de ensaio de forma moderada e incubação a -20 °C por aproximadamente 12 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 5860 x g, por 30 minutos, a 4°C, os sobrenadantes foram descartados, com lavagem dos precipitados com 1 mL de etanol 70% gelado,

seguido de centrifugação a 14.000 x g, por 5 minutos, a 4°C. Posteriormente, os resíduos obtidos foram secos por 30 minutos a temperatura ambiente e ressuspensos em 200 µL com solução de TE 10:1 (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). A quantificação das amostras de DNA foi realizada em espectrofotômetro a 260 nm. A leitura a 260 e 280 nm foi utilizada para a avaliação do grau de pureza do DNA.

A quantificação e avaliação da qualidade do DNA obtido foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) com uma alíquota de 3 µL de DNA adicionada de 3 µL de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol). A eletroforese foi realizada em uma cuba modelo Horizon 11-14 e conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), a 100 V. Foi aplicado no gel um plasmídeo pGEM de concentração conhecida (50 ng/µL) em diferentes volumes para comparar a intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio. A visualização do DNA foi realizada sob luz UV e a imagem foi documentada em um aparelho fotodocumentador (Bio Rad – Gel doc 1000), e as amostras foram quantificadas através do software Quantity One^R (Bio RadTM, Hercules, CA, USA).

III.6 Amplificação dos genes 16S rRNA

Os DNAs extraídos e quantificados dos isolados foram amplificados pela reação de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene 16S rRNA bacteriano através de reação contendo:

- tampão PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl],
- 200 µM de cada desoxiribonucleotídeo,
- 1,5 mM de MgCl₂, 50 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador,
- 2,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas).
- água milli-Q estéril para completar um volume final de 50 µL.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados por, (WEISBURG et al., 1991) Fd1 "forward" (5'-CCg AAT TCg TCg ACA ACA gAg TTT gAT CCT ggC TCA g – 3) e o rd1 "reverse" (5'-CCC ggg ATC CAA gCT TAA ggA

ggT gAT CCA gCC -3') . As amostras foram amplificadas em um termociclador de acordo com o programa utilizado por: 94°C, por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final por 5 minutos, a 72°C. A quantificação e visualização do produto de PCR 16S rDNA foi realizada da mesma forma descrita no item III.5

III.7 PCR para seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas em microplacas utilizando o kit “DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism” . Versão 3. As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se:

- 0,5 µL dos terminadores Big Dye;
- 3,2 pmoles dos iniciadores “forward” Fd1;
- 50 ng de DNA molde (produto de amplificação 16S rDNA).
- 4,6 µL de tampão 2,5 X (400 mM Tris-HCl, pH 9; 10 mM MgCl₂); e completando-se a reação com H₂O mili-Q estéril para 10 µL.

A reação de seqüenciamento foi submetida a um termociclador conforme descrito anteriormente no item III.6 .

III.8 Seqüenciamento dos produtos da PCR

Após a reação, as amostras foram preparadas para o seqüenciamento. Foram adicionados 80 µL de isopropanol 75%, sendo as mesmas agitadas levemente. Posteriormente, as amostras permaneceram por 15 minutos em temperatura ambiente e foram centrifugadas a 3.220 x g, por 45 minutos, a 20°C. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e as amostras foram deixadas por 5 minutos, invertidas em papel absorvente. Aos precipitados foram adicionados 150 µL de etanol 70%, centrifugadas a 3.220 x g por 5 minutos, a 20°C. Esta última operação foi repetida por mais duas vezes e as amostras foram secas em fluxo laminar por 1 hora.

Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 9 μ L Hi-Di Formamide – Catálogo – P/N 4311320 (ABI Prism) e desnaturadas a 95°C por 5 minutos. O seqüenciamento dos isolados foi realizado no seqüenciador capilar modelo ABI 3700 – Perkin Elmer.

III.9 Análise das seqüências

Para se verificar a qualidade das seqüências geradas utilizou-se o programa “Sequencing Analysis 3.4”, que gerou os eletroferogramas que foram submetidos à análise pelo programa “Phred/Phrap/Consed” (GORDON et al., 1998). A seleção das seqüências adequadas foi realizada pelo programa Phred, o qual analisa a qualidade das seqüências, visualizando graficamente pelo Consed e gerando arquivos no formato “fasta”, na qual o nível de exigência mínima foram de 250 bases com qualidade Phred acima de 20, auxiliado pelo programa “Contgen.pl”

Preliminarmente, as seqüências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com seqüências depositadas no banco de dados GenBank acessado através do “site” do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). A ferramenta utilizada para esta consulta foi o BLAST local - “Basic Local Alignment Search Tools” (ALTSCHUL et al., 1997).

As seqüências foram preparadas para o alinhamento pelo programa “BioEdit v5.0.9” (HALL, 1999) e alinhados pelo programa “CLUSTALX v.1.81” (THOMPSON et al., 1997).

III.10 Preparação para análises filogenéticas

Para gerar a matriz de distância dos dendogramas utilizou-se o método de construção da árvore “neighbor-joining” (SAITOU e NEI, 1987) com 400 bases e com algoritmo “Jukes-Cantor” (JUKES et al., 1969), respectivamente, processado pelo programa de Análise Genética de Evolução Molecular MEGA versão 2.1.(KUMAR et al., 2001).

No filograma foram utilizados somente os isolados que possuíam um índice de similaridade maior do que 94% pela classificação taxonômica do gene 16S rRNA,

e com classificação taxômica, foram acompanhados pelos seus respectivos representantes do NCBI. Os dados de “bootstrap” representaram repetições de 1000 vezes.

III.11 A Atividade de redução de Acetileno (ARA)

A fixação de nitrogênio atmosférico dos isolados foi medida pela redução do acetileno em etileno, pois o acetileno é um inibidor competitivo do nitrogênio na enzima nitrogenase. A metodologia empregada foi baseada no trabalho de XIE, et al. (2003), com o cultivo das estirpes de rizóbios, das espécies de *H. seropedicae* e dos isolados de plantas de arroz de sequeiro e irrigado (positivos para AIA) em meio DYGS até atingirem a densidade ótica de 0,8 a 600nm. Alíquotas de 100 µL de cada cultivo foram retiradas e aplicadas, em triplicata, em tubos de ensaio contendo meio sólido BMGM livre de nitrogênio (ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, et al., 2001), com capacidade de 50 mL e vedados com tampas de borracha. Cada triplicata foi incubada em BOD, por 48, 72 e 96 horas, a 30°C.

Após estes períodos 1/10 do ar dos tubos foi retirado e um volume igual de acetileno foi injetado. Os tubos foram incubados novamente por 24 horas a 30°C. Como controle negativo foi utilizado um tubo de ensaio sem o inóculo bacteriano. Após a incubação, a produção de etileno foi avaliada pela retirada de uma alíquota de 100 µL do ar contido nos tubos com um auxílio de uma seringa (modelo). A dosagem do etileno foi realizada por cromatografia gasosa pelo aparelho GC-148 Shimadzu. As temperaturas da câmara, do detector de injeção e da coluna foram de 60°C, 100°C e 60°C, respectivamente. Foi utilizado como padrão 138 ppm de gás etileno e o valor de ARA foi medido por nmol de etileno produzido por hora de incubação e calculado usando a fórmula abaixo

$$\text{ARA (nmol C}_2\text{H}_4\cdot\text{H}^{-1}\cdot\text{x Cultura}^{-1}\text{)}$$

ou seja,

$$\text{ARA} = V_{st} \times C_{st} \times A_{sa} \times V_{tu} / V_{sa} / A_{st} / H / 22.4 \times 10^6$$

Onde, V_{st} é o volume inicial do gás injetado (mL), C_{st} é a concentração do gás padrão (etileno), A_{sa} é a área de curva produzida do etileno no cromatógrafo (cm²), V_{tu} é o volume do gás utilizado (mL), V_{sa} é o volume de amostra do gás injetado (mL), A_{st} é a área de curva do gás injetado do acetileno (cm²) e H o tempo de incubação em horas.

III.12 Estudos de crescimento das plântulas de arroz irrigado em solução nutritiva

O experimento do cultivo de arroz foi realizado em uma câmara de crescimento com cultivar IAC 103, e com os seguintes passos: primeiramente as sementes de arroz foram descascadas e desinfetadas superficialmente através da aplicação de etanol 70%, por 3 vezes durante 5 minutos, em seguida os grãos foram embebidas em hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos, e lavados várias vezes com água deionizada. Após esse procedimento as sementes foram deixadas embebidas em recipiente estéril com água deionizada e esterilizada por um período de 24 horas.

A seguir parte das sementes foi transferida para meio sólido LB e incubadas em BOD por 48 horas à 30° C para verificar se o processo de desinfecção foi eficiente. As outras sementes foram utilizadas para os ensaios em solução nutritiva. Sob condições assépticas os experimentos foram preparados em sistemas de jarras de Magenta (Sigma) com capacidade de 340 mL. Para a germinação e cultivo da planta foi utilizada a solução nutritiva Yoshida (vide apêndice 01).

O sistema de cultivo hidropônico constituiu-se de 06 sementes por sistema, com quatro réplicas, sendo estas apoiadas em placa de microtubos de 0,5 mL cortados em sua base para o desenvolvimento da raiz (Figuras 1 e 2). Nesses ensaios utilizou-se 07 diferentes tipos de tratamento das sementes com bactérias produtoras de AIA em D.O.₆₀₀ 0,8, conforme descrito na Tabela 2.

Após o cultivo bacteriano em meio YM, na densidade ótica descrita anteriormente foram retiradas alíquotas do meio de cultura verificando a produção de AIA de cada estirpe naquele momento e também se realizou diluições seriadas de 10⁻⁷ e 10⁻⁸, verificando o número de colônias por diluição pela unidade formadora

de colônia (UFC) por espalhamento em placas de petri. Todos os controles foram realizados em triplicata. Outro controle utilizado, realizado posteriormente, foi a contagem de número de bactérias aderidas à semente após os diferentes tratamentos. Esse controle foi realizado por plaqueamento das diluições de 10^{-6} e 10^{-7} .

Após a realização dos tratamentos nas sementes e montagem dos recipientes, os mesmos foram incubados no escuro à 30°C por 48 horas para a germinação das sementes em BOD.

Sendo que, após a germinação das sementes, as Magentas foram transferidas para uma câmara de crescimento asséptica a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com controle de luminosidade em um fotoperíodo de 14h, com umidade relativa entre 50-70%, com quatro repetições em delineamento inteiramente ao acaso. No 15^o dia após a germinação, as tampas dos recipientes foram retiradas para não prejudicar o crescimento das plântulas. No 30^o dia de cultivo foi realizada a coleta e realizadas medidas como a extensão da parte aérea e raízes das plântulas e quantidade de raízes laterais com o auxílio de uma lupa eletrônica. Posteriormente as plântulas foram secas em estufa com circulação de ar a 65°C por 3 dias e analisados em uma balança de precisão modelo AEG 220 (Shimadzu) para determinação da massa seca.

III.13 Análises estatísticas do experimento em solução nutritiva

Todos os dados obtidos pelo cultivo foram submetidos às análises de variância e comparação pelo teste de Tukey para encontrar efeitos significativos nos tratamentos utilizados, com o auxílio do programa para análises estatísticas Estat v. 2.0 desenvolvido pelo Dept^o de Ciências Exatas da UNESP/Jaboticabal (BARBOSA et al., 1992).

Tabela 2. Descrição dos tratamentos utilizados na inoculação de sementes do cultivar IAC 103.

Tratamentos	Descrição do tratamento
1.	Sementes imersas com as suspensões bacterianas (meio YM), sob agitação de 100 rpm, a 28 ^o C, por 4 horas em volume de 1mL por semente.
2	Sementes imersas com as suspensões bacterianas (meio YM), sob agitação de 100 rpm, a 28 ^o C, por 4 horas em volume de 1mL por semente adicionadas de 3% de amido de milho (adesivo)
3	Sementes imersas com as suspensões bacterianas (meio YM), sob agitação de 100 rpm, a 28 ^o C, por 4 horas em volume de 1mL por semente e posteriormente era adicionado à solução nutritiva 5% do sobrenadante do meio de cultivo da bactéria.
4	Sementes imersas com as suspensões bacterianas (meio YM), sob agitação de 100 rpm, a 28 ^o C, por 4 horas em volume de 1mL por semente e posteriormente era adicionado à solução nutritiva 10% do sobrenadante do meio de cultivo da bactéria.
5	Sementes não tratadas, mas adição à solução nutritiva de 5% do sobrenadante do meio de cultivo da bactéria;
6	Sementes não tratadas, mas adição à solução nutritiva de 10% do sobrenadante do meio de cultivo da bactéria.
7	Sementes imersas com células bacterianas sem o sobrenadante do meio de cultura e imersas em s NaCl 0,85% 1 mL por semente

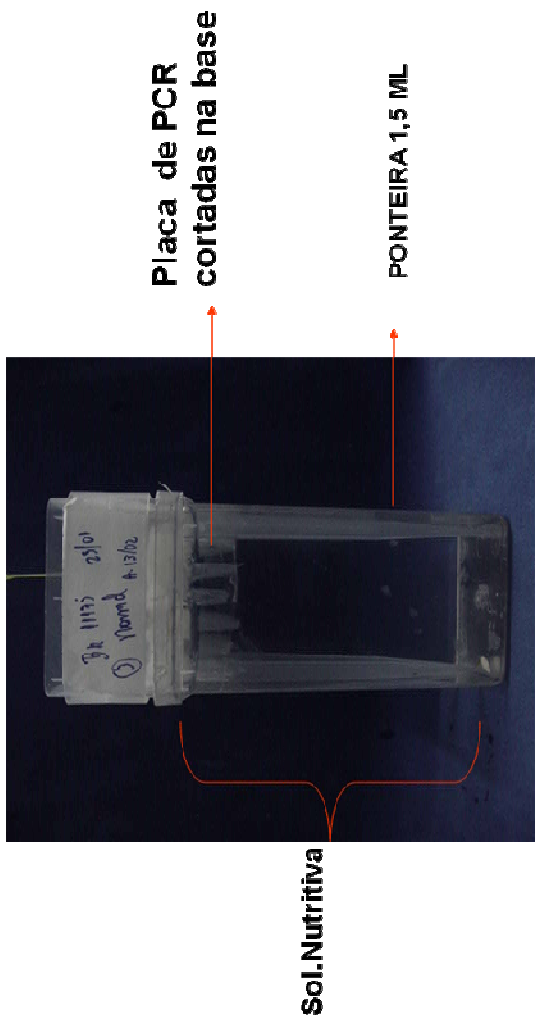


Figura 1 Jarra Magenta (Sigma) adaptada



Figura 2 Ilustração demonstrando o desenvolvimento das raízes pelos tubos cortados na jarra Magenta

IV. Resultados e Discussão

IV.1 Coleta e isolamento

O processo de isolamento de bactérias foi eficiente para as amostras do cultivar irrigado. Foram selecionadas colônias com diferentes características como coloração, bordas e formatos de colônias. No total 89 colônias foram coletadas de diferentes partes das raízes das plantas (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados da quantidade de isolados obtidos através dos meios de cultura no cultivar Irga 144

Origem	Arroz irrigado (Cultivar Irga 144)		
	Quantidade de isolados		
	YM	JNFB	NFB
Solo (S)	06	11	0
Rizosfera (RZ)	08	08	0
Rizoplano (RP)	03	0	02
Endofítico (End/E4)	19	08	11
TOTAL	36	27	13

Foi detectada a presença maior quantidade de bactérias quando o isolamento ocorreu no meio YM em comparação aos meios JNFB e NFB, o que pode estar relacionado principalmente devido a ausência de fonte de nitrogênio nos últimos meios citados. Por outro lado os meios de cultura NFB e JNFB facilitam o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum* e *Herbasprillum* respectivamente, considerando que esses meios foram desenvolvidos para o cultivo de isolados bacterianos diazotróficos de diferentes plantas principalmente gramíneas (KUSS et al., 2007b). Um outro dado importante sobre a coleta dos isolados foi que as maiores populações bacterianas foram observadas nas amostras da rizosfera e endofíticos, isto pode ser devido ao fato que as plantas fornecem um ambiente favorável a

proliferação das bactérias e além de fornecerem exudados como carboidratos, ácidos orgânicos e vitaminas.

Mesmo que o meio semi-seletivo YM não seja o mais apropriado para isolados diazotróficos, devido à sua composição, o objetivo principal da utilização deste foi o de selecionar bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, principalmente espécies de *R. leguminosarum*.

O processo de isolar bactérias da cultura de arroz cultivar Maravilha ficou abaixo do esperado, foram encontrados apenas 13 isolados endofíticos com meio de cultura YM (Tabela 4). Nos outros meios de culturas utilizados não foram isolados bacterianos, isto aconteceu provavelmente devido as características ambientais desta lavoura, como umidade, temperatura e pluviosidade e taxas de oxigênio no solo desta cultura. A cultura de arroz irrigado ao contrário é um ambiente favorável à presença de diazotróficos devido à inundação com água na cultura e a decomposição abundante. Esses fatores culturais resultam na queda do nível de oxigênio no solo o que facilita a presença dos microrganismos de fixadores de nitrogênio de vida livre e facilmente isolados através do cultivo nos meios NFB e JNFB.

Tabela 4. Resultados da quantidade de isolados obtidos através dos meios de cultura no cultivar Maravilha.

Arroz sequeiro (Cultivar maravilha)	
Origem	Quantidade de isolados
	YM
Endofíticos	13
Total	13

Após o processo de isolamento e armazenamento das bactérias deste trabalho, as mesmas passaram pelo processo qualitativo, realizado em meio DYGS com suplemento de triptofano. Apesar deste meio de cultura possuir em seu componente o extrato de levedura, que é uma fonte rica de aminoácidos, principalmente o triptofano, a adição deste precursor promove o aumento de síntese

do AIA. Por outro lado, alguns autores sugerem que a maioria das bactérias diazotróficas, principalmente do gênero *Azospirillum* produzam o ácido indolacético, por uma via independente do triptofano. Mas como neste trabalho está se testando a produção de AIA em isolados selvagens ainda desconhecidos e, portanto, o triptofano foi adicionado ao meio de cultura

Os resultados qualitativos de produção de AIA indicaram que todas as estirpes de *R. leguminosarum* e *H. seropedicae* produziram AIA em meio de cultura DYGS. Dos isolados selvagens apenas 19 amostras produziram AIA por este mesmo teste qualitativo, sendo 04 endofíticos de arroz sequeiro e 15 isolados de arroz irrigado, obtidas de diferentes locais da planta (dados não demonstrados) (Figuras 3 e 4).

Após o teste qualitativo foi realizado o teste quantitativo em todas as amostras positivas anteriormente durante as fases logarítmica e estacionária (Tabela 5). Observou-se que as bactérias apresentaram taxas diferenciadas de produção e esse aumento de teor está relacionado com o número de células presente no cultivo. Nos estágios mais tardios de cultivo, onde as DO_{600} atingiram os valores aproximados de 3,5 foram observadas as maiores concentrações de AIA de cada amostra (9,80 a 120 $\mu\text{g/mL}$, aproximadamente). As estirpes SEMIA 235 e SEMIA 2051 foram as maiores produtoras de AIA entre o rizóbios, mas apresentaram quantidades de produção menor quando comparada às bactérias BR11175 e BR11417. Enquanto que as maiores produtoras deste hormônio foram E4-10 e RZ01, ambas isoladas de cultivar irrigado (estirpes desconhecidas) e que produziram 25,27 e 29,36 $\mu\text{g/mL}$ de AIA, respectivamente.

Verificou-se que as bactérias deste estudo apresentam valores de produção de AIA que ficaram acima dos reportados por KUSS et al. (2007a). Nesse trabalho os autores estudaram a produção de AIA “in vitro” em várias espécies de *Azospirillum*, isolados de diferentes cultivares de arroz irrigado no Estado do Rio Grande do Sul, utilizaram o mesmo meio de cultura (DGYS sem triptofano) em cultivos por 72 horas. KUSS e seus colaboradores observaram valores de produção de AIA que variaram de 2,79 a 13,47 $\mu\text{g/mL}$, abaixo dos observados no atual trabalho. A diferença entre os dois trabalhos pode ser explicada devido a ausência

de triptofano no meio de cultura apesar do conhecimento prévio dos isolados como pertencentes ao gênero *Azospirillum*.

EL-KHAMAS & ADACHI, (1999) demonstraram que *in vitro* estirpes de *Azospirillum brasilense* (ATCC 2970) e *Klebsiela pneumoniae* (ATCC 13883) produziram em NFB e NFDM respectivamente, suplementado com 100 µg/mL de triptofano, uma grande quantidade de ácido indol acético sendo que *A. brasilense* produziu 46µg/mL após 72 horas de cultivo, e *K. pneumoniae* produziu 35 µg/mL com 48 horas de cultivo.

Bactérias diazotróficas produtoras de AIA podem desempenhar um papel fundamental na promoção de crescimento das plantas, principalmente nos primeiros estágios de desenvolvimento, e no processo de enraizamento. Sabe-se que esse estímulo é dependente da dosagem do hormônio, pois o excesso dele pode retardar ou até inibir o crescimento do vegetal (BROEK et al., 1999).



Figura 3. Teste colorimétrico de produção de AIA com as bactérias cedidas para este trabalho cultivadas em meio de cultura DYGS suplementado com 100µg/mL de triptofano. O cultivo atingiu DO_{600} (Densidade ótica 600 nm) de 3,5 ajustando-se pela adição de solução salina 0,85% com os isolados cedidos para estudo com D.O. acima de 3.5 (fase estacionária) em meio DYGS

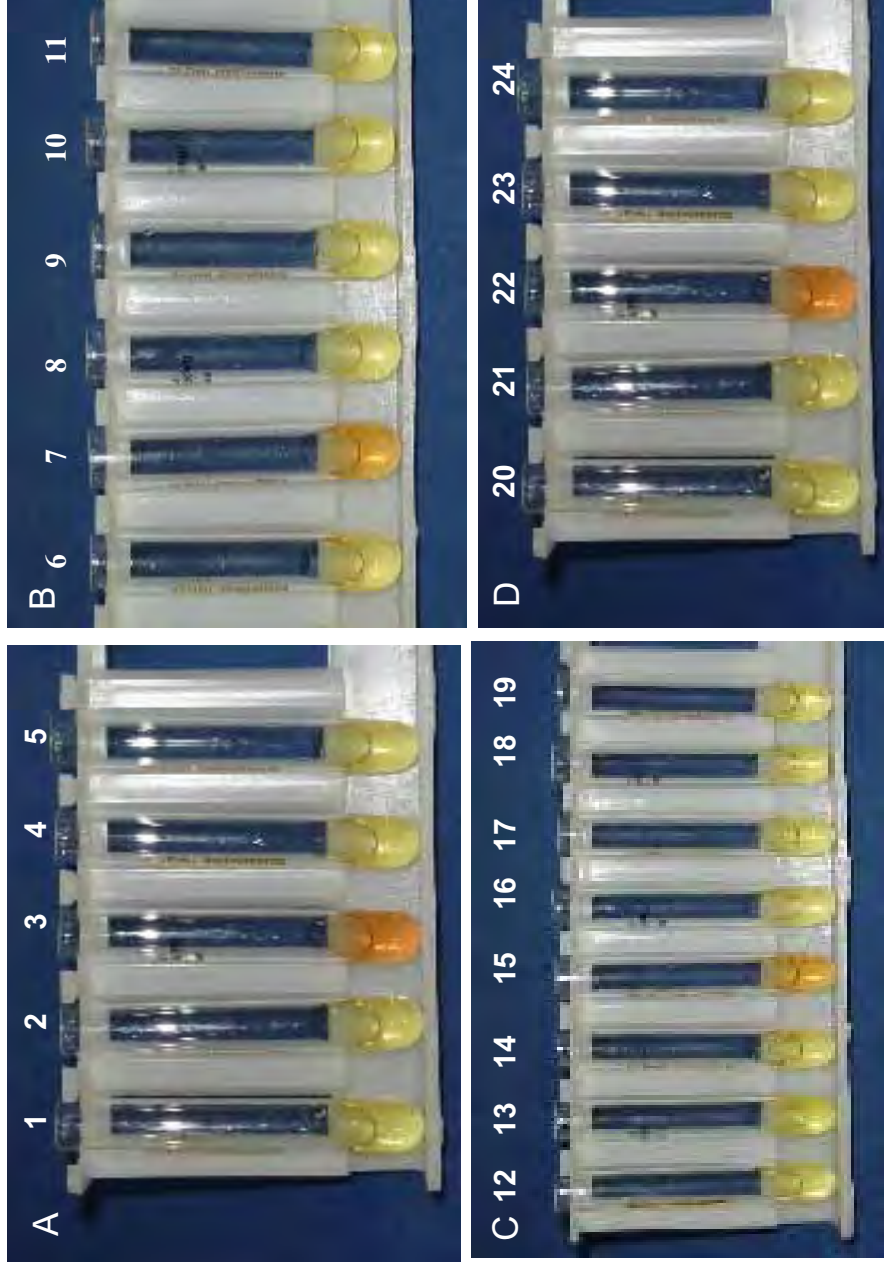


Figura 4. Teste colorimétrico de produção de AIA com as bactérias selvagens isoladas experimento neste trabalho cultivadas em meio de cultura DYGS suplementado com 100µg/mL de triptofano. O cultivo atingiu DO_{600} (Densidade ótica 600 nm) de 3,5. Figuras A, B e C isolados de Irga 144, tubos (1, 6 e 12) controle negativo (2) S3;(3) RPP3;(4)S7; (5)S8; (7) E4-10;(8)E4-09; (9)END3; (10) END8;(11) END8;(13) RZ 01; (14)RZ03-J; (15)RZ03; (16) RZ6; (17)RZ13; (18)RZ14; (19)RZ16 e a Figura D isolados do cultivar Maravilha (21) MT6; (22) MT8; (23) MT10; (24)MT14.

Tabela 5. Produção de AIA por bactérias provenientes da Fepagro, Embrapa e cultivares IRGA 144 e Maravilha em diferentes períodos de cultivo.

	Número isolado	Cultivar/localização	D.O. 08 UFC	AIA µg/mL	D.O. 1.5 UFC	AIA µg/mL	D.O. 3.5 UFC	AIA µg/mL
1.	SEMIA 2050	<i>T. vesiculosum/Endofítico</i>	1,3x10 ⁹	2,88	9x10 ¹⁰	9,84	2x10 ¹³	21,73
2	SEMIA 2051	<i>T. vesiculosum/Endofítico</i>	4x10 ⁸	7,38	5x10 ¹⁰	9,04	8x10 ¹²	91,56
3	SEMIA 384	<i>V. sativa/Endofítico</i>	2x10 ⁸	2,90	0,7x10 ¹⁰	7,22	4x10 ¹²	30,08
4	SEMIA 265	<i>T. pratense/Endofítico</i>	3x10 ⁷	2,41	7x10 ¹⁰	14,27	5x10 ¹²	19,94
5	SEMIA 235	<i>T. repens/Endofítico</i>	3x10 ⁸	4,00	5x10 ¹⁰	8,86	7x10 ¹²	68,30
6	BR 11417	<i>O. sativa/ Endofítico</i>	3x10 ⁸	2,41	0,02x10 ¹⁰	2,86	5x10 ¹²	123,33
7	BR 11175	<i>O. sativa/ Endofítico</i>	4x10 ⁸	3,13	0,03x10 ¹⁰	8,32	2x10 ¹²	106,17
8	MT6	Maravilha/Endofítico	0,1x10 ⁸	2,08	5x10 ¹⁰	6,90	2x10 ¹²	17,53
9	MT8	Maravilha/Endofítico	0,1x10 ⁸	1,99	5x10 ¹⁰	7,40	2x10 ¹²	19,06
10	MT10	Maravilha/Endofítico	3,5x10 ⁸	6,34	5x10 ¹⁰	5,35	0,1x10 ¹²	18,40
11	MT14	Maravilha/ Endofítico	3,8x10 ⁸	2,08	5x10 ¹⁰	6,08	0,7x10 ¹²	13,73
12	S3	Irga 144/Solo	11x10 ⁸	2,23	0,5x10 ¹⁰	5,31	2x10 ¹²	20,96
13	S7	Irga 144/Solo	6x10 ⁸	4,56	0,3x10 ¹⁰	5,23	4x10 ¹²	20,01
14	S8	Irga 144/Solo	7x10 ⁸	4,39	0,7x10 ¹⁰	5,95	2x10 ¹²	19,33
15	RZ01	Irga 144/Rizosfera	1x10 ⁸	2,80	5x10 ¹⁰	14,34	5x10 ¹²	29,36
16	RZ 03 Y	Irga 144/Rizosfera	5x10 ⁸	2,64	5x10 ¹⁰	7,80	0,5x10 ¹²	20,50
17	RZ03 J	Irga 144/Rizosfera	7x10 ⁸	2,78	8x10 ¹⁰	8,45	0,3x10 ¹²	21,78
18	RZ06	Irga 144/Rizosfera	0,7x10 ⁸	3,15	5x10 ¹⁰	6,17	2x10 ¹²	19,16
19	RZ13	Irga 144/Rizosfera	0,7x10 ⁸	17,53	9x10 ¹⁰	19,60	0,1x10 ¹²	20,50
20	RZ 14	Irga 144/Rizosfera	3x10 ⁸	3,87	2x10 ¹⁰	10,15	1x10 ¹²	17,17
21	RZ16	Irga 144/Rizosfera	2x10 ⁸	3,90	3x10 ¹⁰	7,80	2x10 ¹²	14,42
22	RP03	Irga 144/Rizoplano	4x10 ⁸	5,89	5x10 ¹⁰	9,65	4x10 ¹²	13,20
23	END 03	Irga 144/Endofítico	0,3x10 ⁸	2,30	0,07x10 ¹⁰	5,17	0,8x10 ¹²	9,80
24	END 08	Irga 144/Endofítico	0,2x10 ⁸	3,67	0,05x10 ¹⁰	4,21	2x10 ¹²	10,45
25	E4-09	Irga 144/Endofítico	4x10 ⁸	5,23	15x10 ¹⁰	10,12	2x10 ¹²	15,50
26	E4-10	Irga 144/Endofítico	6x10 ⁸	4,79	15x10 ¹⁰	16,30	2x10 ¹²	25,27

IV. 2 Identificação dos isolados selvagens por técnica de seqüenciamento do 16 S rDNA.

O método de extração do DNA para todos isolados positivos para AIA foi considerado adequado e gerou material genético com alta qualidade e rendimento (Figuras 5 e 6). O material obtido apresentou fragmentos com tamanho molecular acima de 10 Kb (dados não apresentados) com relação 260/280 nm de 1,9 e concentrações médias de 400 ng/mL. Os DNAs obtidos foram utilizados para a reação da PCR com oligonucleotídeos específicos para o 16S rDNA e resultaram na amplificação de um fragmento em 1500 pb e rendimento adequado para o seqüenciamento deste gene (Figura 7).

Após o seqüenciamento parcial das amostras, a análise pelo “Blast”, demonstrou um alto índice de diversidade entre as bactérias que puderam ser classificadas taxonomicamente. Os resultados entre as seqüências obtidas e as do banco de dados mostraram similaridade acima de 94% o que indica confiabilidade para os resultados (Tabela 6). Segundo BORNEMAN, et al (1996) a alta diversidade de microrganismos é devido a composição heterogênea do solo.

O solo constitui-se num dos principais reservatórios de carbono orgânico da Terra e um dos mais importantes habitats para os microrganismos, principalmente os procaríotos. A abundância do carbono procariótico e de outros elementos sugere que cerca da metade do protoplasma vivo da Terra seja de origem microbiana (WHITMAN et al.,1998).

O seqüenciamento parcial do 16S rDNA conseguiu identificar 13 OTUS (Unidade Taxonômica Operacional) de seqüências bacterianas das 21 produtoras de AIA neste trabalho, sendo que 06 pertencem a gêneros diferentes, dos quais 5 agruparam-se com o filo *Proteobacteria*. Este filo possui uma grande diversidade de morfologia celular e fisiologia, diferentes estratégias de obtenção de energia são várias, incluindo metabolismo quimiolitotróficos, quimiorganotróficos, fototrófico, além de outras vias metabólicas especializadas em microrganismos adaptados a nichos ecológicos diversos. (CANHOS et al.,1997) que são geralmente encontrados em solos de florestas tropicais, campos cultiváveis, áridos, estações experimentais (GARRITY 2005).

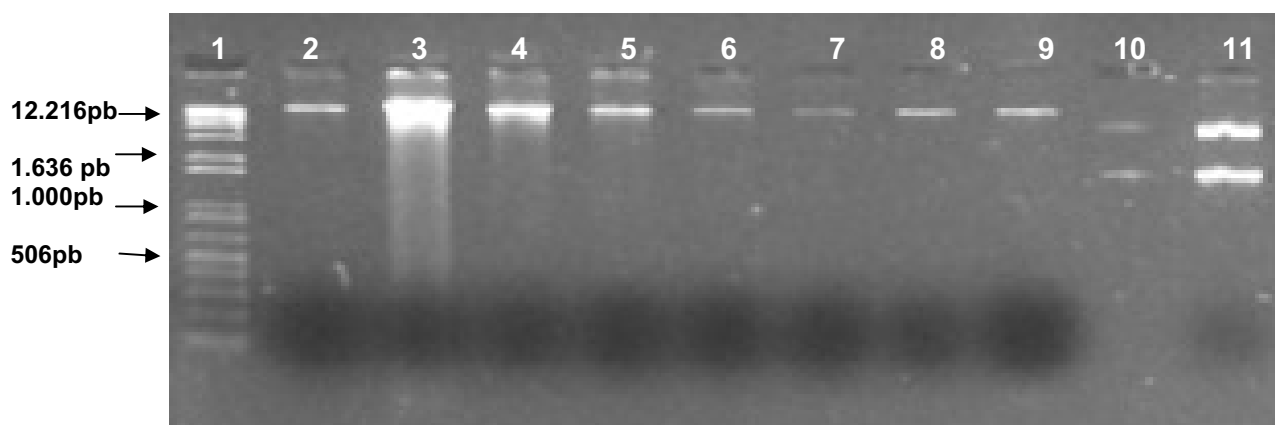


FIGURA 5. Perfil eletroforético da extração de DNA dos isolados selvagens de arroz Maravilha e Irga 144 em gel de agarose 1,5% contendo Brometo de etídeo (0,5mg/ μ l). Canaletas: (1) padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder -Gibco Molecular- N^o catálogo- 15615-016), (2)MT6; (3) (MT8), (4) MT10; (6)MT14; (7) S3; (8)S8; (9)RZ01; (10 E 11) padrão de concentração pGEM (Applied Biosystems) 100ng e 200 ng respectivamente.

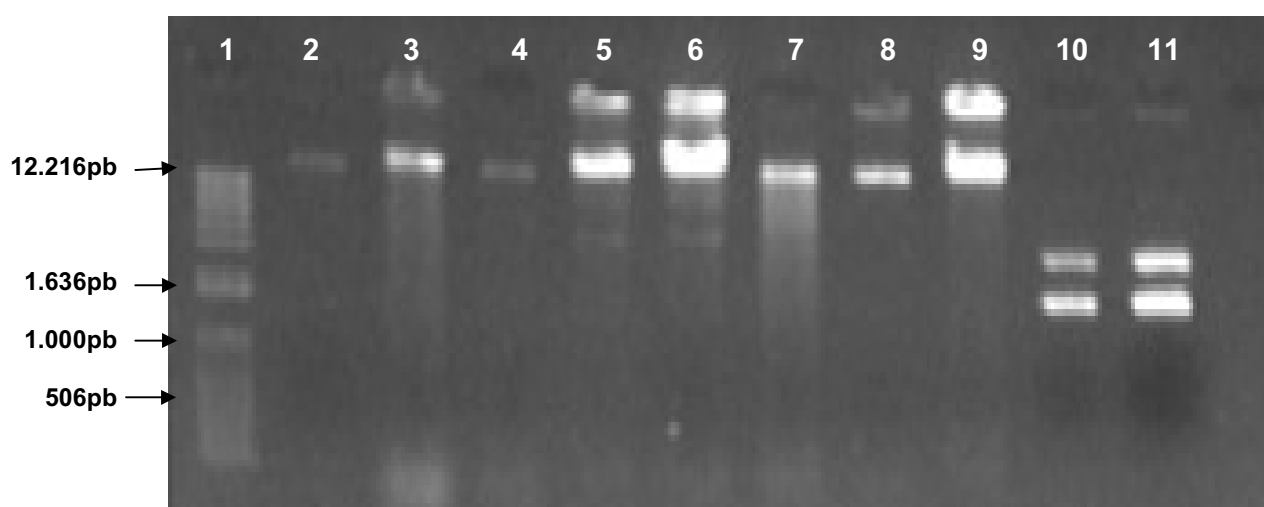


FIGURA 6. Perfil eletroforético de DNA dos isolados selvagens de arroz maravilha e Irga 144 em gel de agarose 1,5% contendo Brometo de etídeo (0,5mg/ μ l). Canaletas: (1) padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder -Gibco Molecular- N^o catálogo- 15615-016), (2)MT6; (3) (MT8), (4) MT10; (6)MT14; (7) S3; (8)S8; (9)RZ01; (10 e 11) padrão de concentração pGEM (Applied Biosystems) 100ng e 200 ng respectivamente.

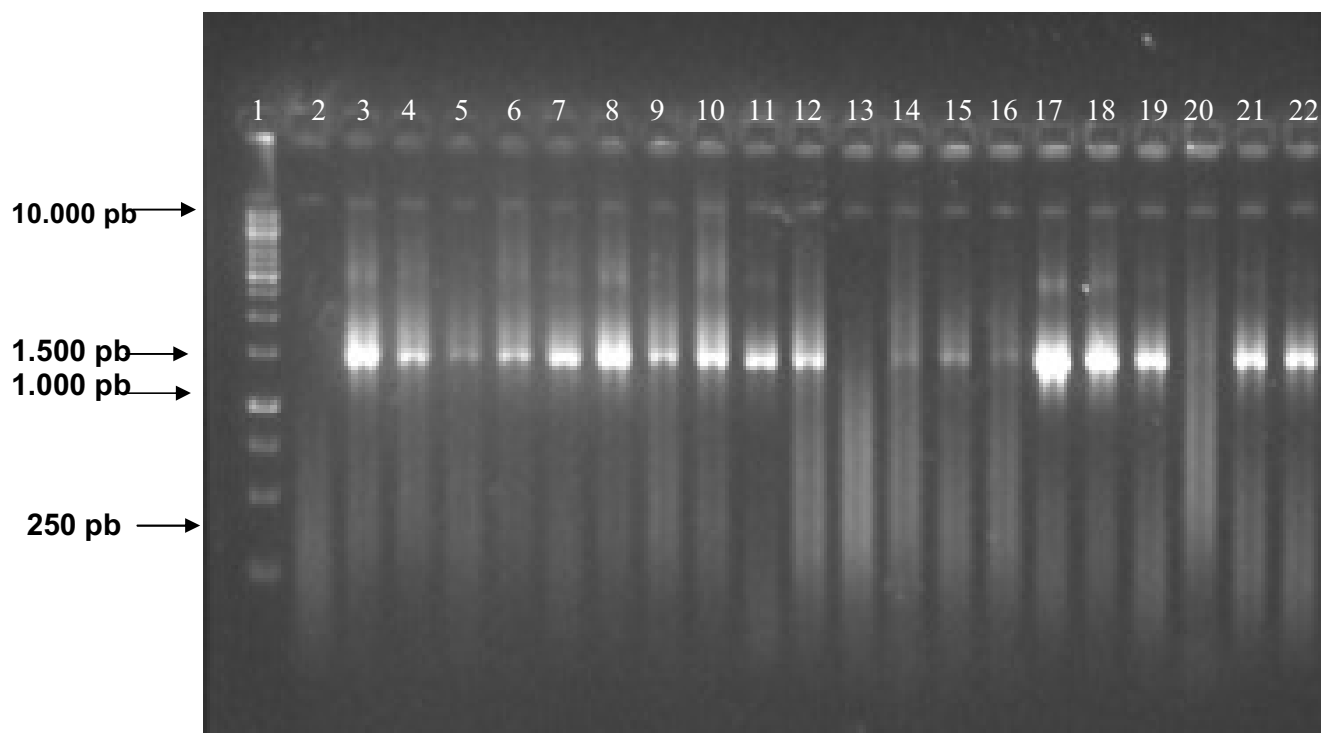


FIGURA 7. Perfil eletroforético de fragmentos de DNA gerados pela amplificação do DNA dos isolados bacterianos dos cultivares IRGA 144 e Maravilha através do conjunto de oligonucleotídeos iniciadores Fd1/Rd1 em gel de Agarose 1% contendo Brometo de etídeo (0,5 mg/μl). Canaletas: (1) – Padrão de tamanho molecular (1 Kb Gene Ruler DNA Ladder - Fermentas); Canaletas (2, 13 e 20) – controles negativos; (3)MT6; (4)MT8; (5)MT10; (6)MT14; (7)S3; (8) S7; (9)S8; (10)RZ01; (11)RZ03Y; (12)RZ06; (14)RZ13; (15)RZ14; (16)RZ16; (17)RP03; (18)END3; (19)END8; (21)E4-9; (22) E4-10.

Resultados semelhantes foram obtidos por SUN et al. (2008) que identificaram uma diversidade abundante e complexa de endofíticos de arroz irrigados na China, através da extração total do DNA de cultivar do arroz variedade 90-3, e analisados posteriormente por enzimas de restrição (ARDRA), em amplicons do 16S rDNA dos clones obtidos. Desta forma, em um total de 192 clones, os autores conseguiram identificar 52 OTUs, e as análises filogenéticas revelaram que a maioria dos clones se afiliou ao filo Proteobactéria (59, 2%), e os demais filios não chegaram a representar 25% das análises obtidas, impressionando os autores quanto a proporção de microrganismos não cultiváveis ou ainda não catalogados. Este resultado pode ser explicado já que apenas 1 a 10% das bactérias existentes na biosfera são classificadas e o restante ainda não se encontrou uma metodologia adequada para o cultivo em laboratório.

Isolados selvagens de variedades de arroz inundado da Coreia, demonstrados por MUTHUKUMARASAMY et al. (2006), foram identificadas através de testes bioquímicos e seqüenciamento do 16S rDNA como pertencentes ao filo *Proteobacteria*. Foram encontrados outros gêneros bacterianos, como *Burkholderia* sp., *Herbaspirillum* sp., *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp e *Gluconacetobacter* sp., isto deve-se que o objetivo do trabalho era a diversidade e a identificação de diazotróficos em variedades de arroz irrigado. Estes autores concluíram que as bactérias encontradas podem contribuir para o crescimento de variedades de arroz inundado através de testes laboratoriais com a produção de hormônios necessários para o crescimento vegetal.

Neste trabalho foram encontrados os gêneros *Pseudomonas* sp, *Burkholderia* sp., *Agrobacterium* sp. *Rhizobium* sp., *Enterobacter* sp., pertencentes ao filo *Proteobacteria* e citados na literatura como promotores de crescimento em gramíneas (BALDANI, 2000; PERRINE et al 2001; GRAY & SMITH, 2005). Estes mesmos gêneros também já foram encontrados em outras plantas como mandioca e soja, com propriedades de promover o crescimento diretamente ou indiretamente da planta. (TEIXEIRA et al., 2007).

Bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp., já foram citada na literatura com um enorme potencial de RPCP como inoculantes em gramíneas. O trabalho realizado por MIRZA et al (2006) detectou que este microrganismo provocou

um efeito significativo na promoção de crescimento de 55%, e no aumento na produção de grãos de 93% em duas variedades de arroz do Paquistão sob condições de casa de vegetação. Um outro trabalho interessante com este gênero foi realizado por SHAHAROONA et al. (2006), que concluíram que três isolados provocaram um aumento significativos no tamanho da plantas e produção de grãos em experimentos de casa de vegetação com milho em relação ao controle sem inoculo, principalmente em vasos onde não existia doses de aplicação de fertilizantes, estes microrganismos produziram taxas de 1-aminocilopropano-1-carboxylato (ACC) que é um precursor do etileno, e que é um hormônio importante para estimular o crescimento de diversas plantas, dependendo da concentração contida no vegetal, esta bactéria já foi citada na literatura com enorme potencial para biocontrole de doenças de plantas (TEIXEIRA et al, 2007).

Uma outra bactéria isolada neste trabalho foi o gênero *Enterobacter* sp. com similaridade 99% com *Enterobacter asburiae* (EU554444.1), este microrganismo é encontrado em vários trabalhos como endofítico de diversas culturas (TEIXEIRA et al, 2007; SUN et al., 2008), representantes deste gênero podem provocar tanto efeitos indiretos na promoção de plantas agindo como antagonista no combate da podridão do pepino ou direto como reduzindo o nitrogênio atmosférico e transferindo para os cereais e conseqüentemente um aumento substancial da planta em relação ao controle (VERNA et al., 2001)

A única seqüência não pertencente ao filo *Proteobacteria* foi o isolado RZ 3 J, que apresentou alta similaridade com bactéria do filo Firmicutes atingindo 100% similaridade com seqüências do banco de dados. Este filo apresenta como características bactérias em forma de bacilos, que formam endospóros e freqüentemente são encontradas em solo. Foi encontrado neste trabalho apenas um representante deste grupo pertencente ao gênero *Bacillus*.

Isolados pertencentes ao filo *Firmicutes* tem sido recentemente analisados em experimentos para as práticas agrícolas. Sabe-se que bactérias deste grupo possuem propriedades de RPCP em diversas plantas, e já foram desenvolvidos alguns produtos inoculantes comerciais como agentes de biocontrole com propriedades de fungicidas, inseticidas e nematicidas para aplicar em diversas culturas (GARDENER, 2004), o que demonstra o seu grande potencial para utilização

na agropecuária, mas em arroz testes com efeitos diretos precisam ser melhor avaliados.

Trabalho realizado por BERNEDUZI et al. (2008) isolaram um representante selvagem dos campos de cultivo de arroz irrigado do Rio Grande do Sul (SVPR30) que apresentava uma alta similaridade com o gênero *Bacillus* e verificaram que esta bactéria possuía algumas habilidades de RCPP através de testes laboratoriais e testes de inóculos nas sementes em casa de vegetação e perceberam que este microrganismo produz uma alta taxa de produção de Ácido indolácetico e também como produtor de sideróforos e fixador denitrogênio. Além de promover um aumento significativo nas raízes e partes áreas e conseqüentemente um aumento substancial em relação à massa seca, chegando a níveis de 30% do cultivar em relação ao controle.

Tabela 6. Resultados das classificações taxômicas através do sequenciamento parcial do 16S rDNA dos isolados selvagens positivos para produção de AIA.

	Código isolado	Cultivar/localização	Blast 16SrDNA	(%)
1.	MT6	Maravilha/ Endofítico	<i>Rhizobium</i> sp. Kus-8 (AF155100.1)	94
2.	MT8	Maravilha/ Endofítico	<i>Enterobacter asburiae</i> (EU554444.1)	99
3.	MT10	Maravilha/ Endofítico	<i>Pseudomonas</i> sp.(DQ854817.1)	95
4.	MT14	Maravilha/ Endofítico	N.I.*	----
5.	S3	Irga 144/ Solo	<i>Acinetobacter</i> sp.(EU447183.1)	94
6.	S7	Irga 144/ Solo	<i>Acinetobacter</i> sp.(EU447183.1)	94
7.	S8	Irga 144/ Solo	<i>Acinetobacter</i> sp.(EU447183.1)	94
8.	RZ01	Irga 144/ Rizosfera	N.I.*	----
9.	RZ03 Y	. Irga 144/ Rizosfera	N.I.*	----
10.	RZ03 J	Irga 144/ Rizosfera	<i>Bacillus subtilis</i> (EU624435)	96
11.	RZ 06	Irga 144/ Rizosfera	<i>Acinetobacter</i> sp.(EU447183.1)	94
12.	RZ13	Irga 144/ Rizosfera	N.I.*	----
13.	RZ14	Irga 144/ Rizosfera	N.I.*	----
14.	RZ16	Irga 144/ Rizosfera	<i>Massilia aerolata</i> (EF688526.1)	99
15.	RP03	Irga 144/ Rizoplano	N.I.*	----
16.	END3	Irga 144/ Endofítico	<i>Burkholderia</i> sp. Ellin135 (EU554444.1)	94
17.	END8	Irga 144/ Endofítico	<i>Burkholderia</i> sp. Ellin135 (EU554444.1)	94
18.	E4-09	Irga 144/ Endofítico	N.I.*	----
19.	E4-10	Irga 144/ Endofítico	<i>Agrobacterium</i> sp. ZY072 (EU652867.1)	100

*N.I. – Sequências não identificadas. % Similaridade em relação ao Blast.

IV.3 Atividade da redução de acetileno em etileno in vitro

As estirpes que foram capazes de reduzir o acetileno nas condições experimentais foram os rizóbios SEMIA 384, 2050 e 2051 e o *Herbaspirillum* BR 11417, com taxa de produção após 120 horas de cultivo entre 0,8 e 2,44 nmol C₂H₄ cultura⁻¹h⁻¹. As estirpes SEMIA 235, 265 e a BR 11175 apesar do cultivo nos tubos de ensaios analisadas posteriormente através de densidade ótica, não foram capazes de reduzir o acetileno, mesmo que os valores de turbidez foram maiores que as SEMIA 2050 e 2051. A taxa de produção de etileno para estirpes de rizóbios e BR 11417 positivas ARA, foi aumentando conforme o tempo de cultivo nos tubos de ensaio (Tabela 7). Por exemplo, nas primeiras 48 horas de cultivo a SEMIA 2050 não conseguiu reduzir o acetileno e após 120 dias de cultivo a taxa ficou em 1,44 nmol C₂H₄ cultura⁻¹h⁻¹. Isto deve-se principalmente de adaptação ao meio de cultura (fase lag) sendo um mais longa que os demais bactérias utilizadas neste estudo.

Os isolados selvagens que conseguiram reduzir o acetileno foram a RZ06, End8, END3, S3, S7 E S8, o que caracteriza essas bactérias como fixadores de nitrogênio demonstraram que possuem mais uma característica de promotor de crescimento em planta, a produção de ARA ficou entre 0.1 a 0,64 nmol C₂H₄ cultura⁻¹h⁻¹ após 120 horas de cultivo em tubos de ensaio (Tabela 7). Desta forma, estes resultados demonstraram que estes microrganismos isolados de arroz irrigado produziram taxas aquém das bactérias que foram cedidas pelas outras instituições. Os isolados do cultivar Maravilha positivos para AIA, com exceção a estirpe MT6 não conseguiram reduzir o acetileno neste experimento.

Os isolados provenientes do cultivar Irga 144 positivos para AIA, que não conseguiram reduzir acetileno foram RZ01,RZ03-Y,RZ13,RZ14,RZ16, RP3, E4-09. Todos os resultados positivos da atividade da nitrogenase deste trabalho foram muito abaixo apresentados por GOVINDARAJAN et al. (2008). Estes autores testaram atividade de ARA em duas estirpes *Burkholderia vietnamensis* (MGK3 e TVV75) isoladas de cana-de-açúcar no Brasil, e produziram 112,94 e 241,17 nmol C₂H₄ cultura⁻¹h⁻¹ respectivamente no mesmo meio de cultura utilizado neste experimento. A diferença entre a taxa de atividade da nitrogenase nos dois ensaios

pode ser explicada por dois fatores. Primeiro, os isolados utilizados neste trabalho foram purificados e cultivados por longo período em meio com fonte de nitrogênio, a enzima vai perdendo sua eficiência, pois o processo de fixação de nitrogênio demanda muita energia do metabolismo bacteriano, por outro lado os isolados de *Burkholderia* no trabalho citado eram isolados recentemente, e realizaram o teste imediatamente após o isolamento. Uma segunda explicação para a baixa redução do acetileno observada nesse trabalho seria a sensibilidade da enzima nitrogenase ao oxigênio. A enzima nitrogenase é sensível ao oxigênio e in “vitro” é o difícil realizar este tipo de ensaio uma vez que os rizóbios formam nódulos nas leguminosas que as protegem do oxigênio. Além disso, o meio BMGM não seja o mais apropriado para o cultivo de rizóbios, *H. seropedicae* e as estirpes de selvagens nos testes de ARA, talvez a utilização de outro meio de cultura livre de nitrogênio mas que proporcionasse melhor proliferação bacteriana dos isolados, pudesse induzir uma maior produção de etileno pelas bactérias estudadas.

Resultados similares aos isolados positivos de ARA (Maravilha e Irga 144) , foram encontrados por MUTHUKUMARASAY et al. (2006) que isolaram diversos gêneros bacterianos em diferentes variedades de arroz irrigado na Coreia do Sul, como *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* sp., *Burkholderia* sp, e *Pseudomonas* sp., e detectaram a presença da nitrogenase através do gene nif e controles positivos visíveis como películas existentes nos meios de cultura semi sólido utilizados. Todos estes isolados foram testados posteriormente em casa de vegetação e promoveram um aumento significativo em uma variedade de arroz (IR36) após 30 dias de cultivo em condições assépticas. Entretanto, as taxas de ARA detectadas por cromatografia gasosa ficaram entre 0,12 a 1,83 nmol C₂H₄ cultura⁻¹h⁻¹ em 24 horas de cultivos em tubos.

XIE et al.(2003) isolaram diversos gêneros bacterianos como *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Agrobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp. de oito províncias diferentes da China que continham plantações de arroz irrigado e identificaram 30 estirpes como possíveis promotores de crescimento em arroz, devido a atividade para enzima nitrogenase detectada por CLAE, as taxas de produção esteve entre 0.9 a 537,8 nmol C₂H₄ cultura⁻¹h⁻¹. Uma característica

marcante deste trabalho foi que a produção de etileno dos isolados apresentava diferenças distintas dependendo da região da coleta da cultura.

Trabalho realizado por PIAO et al. (2005) isolaram 60 amostras de diferentes cultivares de arroz na China e verificaram que 16 isolados foram capazes de reduzir o acetileno *in vitro*, as taxas de todas amostras não foram equivalentes, inclusive e duas espécies do gênero *Azobacter* que produziram as maiores concentrações de etileno com taxas de 818,9 e 548,7 nmol C₂H₄ cultura⁻¹h⁻¹, por exemplo *A. armeniacus* e *A. nigricans* respectivamente . Além disso, promoveram um aumento significativo no cultivar de arroz quando inoculadas com suspensões bacterianas em consorcios a semente. Estas bactérias e as demais positivas para o teste do ARA quando eram inoculadas separadamente a semente do cultivar não apresentavam resultados significativos a testemunha. Um outro resultado interessante que espécies diferentes do mesmo gênero produziram resultados discrepantes como *Bacillus subtilis* e *Bacillus azotoformans* com taxas de 4,12 e 357,5 C₂H₄ cultura⁻¹h⁻¹.

Todos os resultados citados anteriormente sobre a técnica do ARA demonstraram que as taxas de atividade da nitrogenase *in vitro* são muito diferentes de um gênero bacteriano ao outro, e que os promotores de crescimento repassam o nitrogênio reduzido para planta dependendo do genótipo do vegetal ou dos procedimentos adotados no experimento, sendo o fator ambiental como temperatura, clima, solo sendo fatores fundamentais para o sucesso do experimento, e não apenas pela quantidade de nitrogênio reduzido produzido por estes microrganismos.

Tabela 7. Atividade de redução de acetileno (ARA) dos isolados positivos para AIA.

Estirpe	72 horas/ cultivo		96 horas/cultivo		120 horas/ cultivo	
	ARA*	D.O. ⁻⁶⁰⁰	ARA*	D.O. ⁻⁶⁰⁰	ARA*	D.O. ⁻⁶⁰⁰
<i>R. leguminosarum</i> (SEMIA 235)	0	0,17	0	0,18	0	0,45
<i>R. leguminosarum</i> (SEMIA 265)	0	0,07	0	0,07	0	0,60
<i>R. leguminosarum</i> (SEMIA 384)	0,24	0,02	0,62	0,03	0,81	1,11
<i>R. leguminosarum</i> (SEMIA 2050)	0	0	1,44	0,07	1,52	0,19
<i>R. leguminosarum</i> (SEMIA 2051)	1,38	0,06	1,77	0,12	2,44	0,23
<i>H. seropedicae</i> (BR 11417)	0,32	0,03	1,38	2,10	1,44	2,33
<i>H. seropedicae</i> (BR 11175)	0	0,05	0	0,07	0	0,60
<i>Acinetobacter</i> sp. ** (S3/S7/S8/RZ06)	0,19	0,87	0,29	1,04	0,22	1,40
<i>Burkholderia</i> sp. ** (End3/End8)	0,19	0,52	0,35	0,57	0,64	1,71
<i>Rhizobium</i> sp. ** (MT6)	0,15	0,51	0,21	0,77	0,53	1,76
<i>E. asburiae</i> ** (MT8)	0	0,49	0	0,53	0	0,77
<i>Pseudomonas</i> sp. ** (MT10)	0	0,99	0	1,12	0	1,15
MT14	0	0,48	0	0,56	0	0,76
RZ01	0	0,48	0	0,54	0	0,85
RZ 03 Y	0	0,96	0	1,01	0	1,09
<i>B. subtilis</i> ** (RZ03 J)	0,13	1,05	0,1	1,21	0,23	1,29
RZ13	0	0,48	0	0,77	0	0,88
RZ 14	0	0,65	0	0,89	0	0,96
<i>M. aerolata</i> ** (RZ16)	0	0,46	0	0,56	0	0,76
RP03	0	0,03	0	0,09	0	0,28
E4-09	0	0,23	0	0,86	0	0,93
<i>Agrobacterium</i> sp. ** (E4-10)	0,1	0,48	0,1	1,23	0,1	1,86

*A unidade de ARA nmol C₂H₄ cultura⁻¹h⁻¹

** Identificação pelo seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA

IV.4 Promoção de crescimento em arroz por *R. leguminosarum*

Todas as amostras bacterianas que foram submetidas ao experimento de cultivo de arroz irrigado em solução nutritiva foram produtoras de AIA em meio líquido YM em uma densidade ótica de 0.8, com as taxas entre 0.96 e 29.45 µg/mL, para as bactérias *Acinetobacter* sp. (S8) e a SEMIA 384 respectivamente. Todos os cultivos bacterianos, no momento dos tratamentos com das sementes de arroz apresentavam as Unidade formadora de colônias se encontravam acima de 10^7 . (Tabela 8).

A peletização das sementes com o inóculo contendo amido de milho 3% (tratamento nº 2) aumentou a aderência das bactérias às sementes em relação aos tratamentos 1, 3 e 4, sem prejudicar a germinação, desenvolvimento ou a interação dos isolados com as plantas (dados não demonstrados). Este processo precisa ser melhor avaliado, mas é um processo que não gera grandes custos aos agricultores ao desenvolvimento de futuros inoculantes.

Quando se avaliou o efeito dos diferentes tratamentos com relação à massa seca das plantas (Tabela 9A) observou-se que o cultivo do arroz em solução nutritiva com a inoculação de estirpes de rizóbio se mostrou significativos quando as sementes foram inoculadas com as SEMIA 235 (tratamento 2) e SEMIA 2050 (tratamentos 3 e 4). Nestes três tratamentos as estirpes proporcionaram um aumento mais de 100% em relação à testemunha (sem a bactéria). As concentrações de AIA destas estirpes com estes tratamentos mencionados ficaram em concentrações menores em relação às demais estirpes isto pode ser a chave para o desenvolvimento das plântulas no início destes tratamentos (Tabela 8).

Por outro lado o número de raízes laterais aumentou em relação à testemunha quando se utilizou inoculações em sementes com as SEMIAs 2050 (tratamentos 1 e 4), e 2051 (tratamento 1) e 235 (tratamento 2) (Tabela 9D).

Estes resultados são similares aos apresentados por KUSS et al., (2007a) que realizaram experimentos de inoculações de *A. lipoferum* e do isolado UFSM-BD-54-06 em plântulas de arroz (IRGA 420) em solução nutritiva. Esses autores observaram que com 25 dias de germinação deste cutlivar, as bactérias inoculadas

provocaram aumento significativos de massa seca das plântulas (68%) em relação à testemunha. Além disso, foi possível observar também o aumento e desenvolvimento do número e comprimento das raízes laterais e pelos absorventes.

GUIMARÃES et al (1999) também demonstraram através de ensaios em laboratório (condições assépticas), que quando as sementes de arroz foram inoculadas com a estirpe BR 11417 (ZAE 94) ocorreu um aumento significativo na massa seca da variedade IR 42 (64%) e Guarani (130%) em relação a testemunha.

Este último trabalho citado difere dos resultados obtidos neste trabalho, pois as estirpes de *H. seropedicae* BR11175 e BR11417 não se destacaram em nenhum dos parâmetros analisados nesse ensaio de cultivo sob solução nutritiva do arroz. Além disso, a adição de sobrenadante de cultura após o cultivo destas bactérias também não demonstrou exercer aumento significativo no desenvolvimento das plântulas. Esses resultados sugerem que provavelmente as estirpes de *Herbaspirillum*, principalmente a BR 11417 não se adaptaram ao ensaio proposto e ao cultivar de arroz utilizado. Isso pode ser confirmado porque essa bactéria se destacou em outros experimentos, utilizando outros cultivares e em outras condições de cultivo, como casa de vegetação e campos (BALDANI et al., 2000; FERREIRA 2003; GUIMARÃES, 2003). Diferentes resultados demonstram que a resposta de inoculação de bactérias diazotróficas as gramíneas, não é dependente apenas da presença das mesmas, mas sim da interação destas com os genótipo das plantas.

O uso da peletização das sementes com um inóculo contendo amido de milho 3% proporcionou resposta positiva de desenvolvimento das plantulas quando a bactéria utilizada foi a SEMIA 235. Resultados demonstrados por este tratamento foram muito promissores para futuras utilização desta prática em novos ensaios como casa de vegetação e campos de cultivos, pois ele apresentou capacidade de aumentar a massa seca das plantas em torno de 130 % com relação à testemunha.

Dados obtidos sobre número de raízes laterais nas plântulas demonstraram que as SEMIAs 235, 2050 e 2051 provocaram um aumento substancial nesta estrutura, sob diferentes tratamentos em solução nutritiva (Figura 8). Uma vez que não foi observado aumento significativo na parte aérea das plântulas, as maiores taxas de massa seca foram atribuídas ao aumento no número de raízes laterais.

Os resultados obtidos quanto à extensões da parte aérea e raízes das plântulas (Tabela 9B e 9C) não se mostraram significativos em relação à testemunha, mesmo assim, as plântulas que foram submetidas a inoculação com as Semias 235 (tratamento nº 1), 2050 (tratamentos nº 3) e 2051 (tratamento nº 1) apresentaram aparência sadia em relação à testemunha e os dados absolutos destes tratamentos ficaram com valores acima em relação à testemunha, conforme observado (Figura 8).

Algumas estirpes de *R. leguminosarum* utilizadas neste estudo como as Semias 265 e a 384 não promoveram um aumento na massa seca, parte aérea, raiz em relação a testemunha, nos dos diferentes tratamentos utilizados, em alguns casos houve efeitos que inibiram o desenvolvimento e da planta, apesar que a estirpe 384 possuir fatores importantes para ser considerada RPCP como de ser produtora de AIA e de reduzir “in vitro” o acetileno a etileno, para mensurar a atividade da nitrogenase, um fator pode ser explicado pela biologia molecular pelo trabalho realizado por Menna et al., 2005 que por sequenciamento completo do gene 16S rRNA propôs uma mudança de taxonomia para este isolado para *Mesorhizobium ciceri*, mas ainda precisa ser realizados novos experimentos para aprovar esta mudança taxonômica.

Foram realizados testes estatísticos dos setes tratamentos comparando sempre com mesmo isolado e observou-se inicialmente que os controles negativos dos tratamentos não apresentaram resultados significativos entre eles, os valores absolutos estavam muito próximos não se destacando nenhum tratamento sem o microrganismo ou ou produtos de metabolitos presentes nos ensaios, ou seja, com exceção ao tratamento nº 07 o meio de cultura YM não alterava o desenvolvimento das plântulas (Tabelas 9 e 10). Não existia também uma nenhuma correlação do tratamento aplicado em conjunto com a presença qualquer microorganismo. Desta forma teria que existir determinada estirpe bacteriana para estimular ou inibir o desenvolvimento da plântula.

As interações de solo-planta-microrganismos são complexas e seus efeitos difíceis de serem interpretados, pois os mecanismos que os microrganismos podem aumentar o crescimento ainda são obscuros. Autilização de bactérias produtoras de AIA ou com potencial para fixação de N, é uma forma inicial de seleção de estirpes

promissoras para aumento da produtividade do arroz, entretanto deve-se considerar que tais características exigem condições adequadas para se expressarem (TEIXEIRA et al. 2007).

Tabela 8. Condições em que foram submetidas os experimentos com suspensões bacterianas (YM) em relação às sementes para o cultivo do IAC 103 em solução nutritiva.

Estirpe	UFC/mL	Tratamentos * 1, 3 e 4	Tratamento 2 *	Tratamento 7 *	AIA µg/ML
SEMIA 2050	0,4x10 ⁸	0,1x10 ⁸	0,2x10 ⁸	0,003x10 ⁵	1,94
SEMIA 2051	1,9x10 ⁸	0,01x10 ⁸	0,4x10 ⁸	0,001x10 ⁵	9,40
SEMIA 384	5x10 ⁸	0,03x10 ⁸	0,06x10 ⁸	0,000,04x10 ⁵	29,45
SEMIA 265	5x10 ⁸	0,04x10 ⁸	0,4x10 ⁸	0,001x10 ⁵	1,15
SEMIA 235	0,3x10 ⁸	0,08x10 ⁸	0,2x10 ⁸	0,059x10 ⁵	7,09
BR 11417	0,6x10 ⁸	0,8x10 ⁸	0,4x10 ⁸	0,027x10 ⁵	8,17
BR 11175	0,2x10 ⁸	0,004x10 ⁸	0,2x10 ⁸	0,002x10 ⁵	4,09
MT6	2x10 ⁸	0,8x10 ⁸	1x10 ⁸	0,006x10 ⁵	1,30
S8	0,3x10 ⁸	0,03x10 ⁸	1x10 ⁸	0,001x10 ⁵	0,96
END8	0,4x10 ⁸	0,03x10 ⁸	0,7x10 ⁸	0,0001x10 ⁵	1,01

* Unidade formadora de colônia/ semente

Tabela 9. Efeito dos diferentes tratamentos no cultivo do cultivar IAC 103 em solução nutritiva. Métodos estatísticos foram realizados pelo método Tukey pelo programa Estat.

A	MASSA SECA (mg.planta ⁻¹)							
	TRATAMENTOS							
ESTIRPES	1**	2**	3**	4**	5 ^{NS}	6 ^{NS}	7*	Testemunha
SEMIA2050	21.01 ^{ABab}	13.52 ^{BCb}	33.87 ^{Aa}	33.92 ^{Aa}	14.73 ^{Ab}	8.06 ^{CDb}	19.52 ^{Aab}	15.42 ^b
SEMIA2051	20.92 ^{ABa}	14.07 ^{BCbc}	11.77 ^{Bbc}	8.86 ^{Bc}	15.75 ^{Aab}	17.33 ^{ABab}	16.00 ^{ABab}	15.42 ^{ab}
SEMIA384	13.16 ^{CDa}	12.59 ^{BCa}	14.45 ^{Ba}	18.20 ^{Ba}	9.46 ^{Aa}	6.06 ^{Da}	11.81 ^{BCa}	15.42 ^a
SEMIA265	6.85 ^{Dd}	13.62 ^{BCab}	9.68 ^{Bcd}	10.46 ^{Bbc}	8.95 ^{Acd}	11.50 ^{BCbc}	8.87 ^{Ccd}	15.42 ^a
SEMIA235	20.92 ^{ABab}	35.32 ^{Aa}	12.65 ^{Bc}	12.98 ^{Bc}	13.20 ^{Ac}	16.55 ^{Abc}	7.55 ^{Cc}	15.42 ^c
BR 11175	13.07 ^{CDc}	5.81 ^{Cd}	10.04 ^{Bbc}	7.70 ^{Bcd}	12.16 ^{Ab}	8.12 ^{CDcd}	10.50 ^{BCbc}	15.42 ^a
BR 11417	9.10 ^{CDa}	8.76 ^{Cb}	11.20 ^{Bab}	10.38 ^{Bb}	12.27 ^{Ab}	11.48 ^{BCab}	12.99 ^{BCab}	15.42 ^a
C.N.●	19.01 ^{ABa}	21.02 ^{Ba}	13.08 ^{Bab}	16.78 ^{Bab}	12.95 ^{ab} ^A	16.28 ^{AB}	8.73 ^{cb}	15.42 ^{ab}
Testemunha■	15.42 ^{BC}	15.42 ^B	15.42 ^B	15.42 ^B	15.42 ^A	15.42 ^{AB}	15.42 ^{AB}	15.42
CV (%) =	27.53	25.36	40.54	32.42	15.15	19.73	18.23	
B	EXTENSÃO PARTE AÉREA (cm.planta ⁻¹)							
ESTIRPES	1**	2**	3**	4**	5 ^{NS}	6 ^{NS}	7*	Testemunha
SEMIA2050	19.78 ^{ABab}	19.75 ^{ABab}	25.20 ^{Aa}	25.15 ^{Aa}	18.38 ^{ABab}	21.50 ^{ABab}	15.45 ^{BCb}	15.42 ^{ab}
SEMIA2051	20.03 ^{ABab}	14.50 ^{BCbc}	14.62 ^{Cbc}	12.57 ^{Cc}	16.72 ^{ABabc}	19.41 ^{ABab}	17.00 ^{ABabc}	15.42 ^a
SEMIA384	20.15 ^{ABab}	15.29 ^{BCab}	22.54 ^{ABa}	24.43 ^{Aa}	12.34 ^{Bb}	12.00 ^{Db}	16.45 ^{ABab}	15.42 ^a
SEMIA265	13.31 ^{Cbc}	12.25 ^{Cc}	20.19 ^{ABCa}	19.12 ^{ABCab}	18.33 ^{ABab}	18.62 ^{ABCab}	10.00 ^{BCabc}	15.42 ^a
SEMIA235	22.04 ^{ABa}	23.22 ^{Aa}	15.33 ^{Cbc}	15.25 ^{BCbc}	15.90 ^{ABbc}	20.00 ^{ABab}	11.66 ^{BCc}	15.42 ^a
BR 11175	16.50 ^{BCb}	12.50 ^{Cb}	15.12 ^{Cb}	12.43 ^{Ca}	11.75 ^{Bb}	13.00 ^{CDb}	14.25 ^{BCb}	15.42 ^a
BR 11417	12.43 ^{Cbc}	14.48 ^{BCbc}	16.49 ^{BCbc}	20.00 ^{ABab}	13.50 ^{ABc}	14.46 ^{BCDbc}	17.30 ^{AB}	15.42 ^a
C.N.●	21.43 ^{ABa}	19.05 ^{ABa}	20.21 ^{ABCa}	22.33 ^{Aa}	19.68 ^{ABa}	21.85 ^{Aa}	11.18 ^{BCb}	15.42 ^a
Testemunha■	22.62 ^A	22.62 ^A	22.62 ^{AB}	22.62 ^A	22.62 ^A	22.62 ^A	22.62 ^A	15.42 ^a
CV (%) =	12.96	15.84	14.47	14.81	19.68	14.48	17.20	

Continuação Tabela 9.

C	EXTENSÃO RAIZ (cm. planta ⁻¹)							CV(%)
	1 ^{**}	2 ^{**}	3 ^{**}	4 ^{**}	5 ^{NS}	6 ^{NS}	7 [*]	
SEMI A2050	8,57 ^{Ab}	4,48 ^{BCbc}	9,87 ^{Aa}	8,72 ^{Ab}	3,88 ^{ABCc}	2,62 ^{Cc}	4,87 ^{ABCbc}	29,56
SEMI A2051	8,32 ^{Aa}	8,00 ^{Aab}	5,12 ^{BCbc}	3,75 ^{Cdc}	6,56 ^{ABabc}	6,83 ^{Aabc}	5,00 ^{ABbc}	21,17
SEMI A384	5,36 ^{Aa}	5,16 ^{ABCab}	2,90 ^{Cbc}	4,86 ^{BCDab}	1,96 ^{Cc}	4,81 ^{ABCab}	4,25 ^{ABCabc}	21,84
SEMI A265	5,81 ^{Aab}	5,50 ^{ABCabc}	2,89 ^{Ccd}	2,79 ^{Dcd}	3,40 ^{BCbcd}	3,26 ^{BCbcd}	1,72 ^{Cd}	30,60
SEMI A235	7,94 ^{Aa}	6,90 ^{ABab}	7,33 ^{ABab}	8,00 ^{ABa}	6,06 ^{ABab}	5,33 ^{ABCab}	4,25 ^{ABCb}	20,65
BR 11175	5,37 ^{Aa}	2,87 ^{Cbc}	4,03 ^{BCbc}	5,00 ^{BCDab}	3,62 ^{ABCbc}	2,62 ^{Cc}	3,50 ^{BCbc}	30,94
BR 11417	5,00 ^{Aab}	4,66 ^{BCab}	5,03 ^{BCab}	6,87 ^{ABCa}	4,00 ^{ABCb}	4,21 ^{ABCab}	5,50 ^{Abab}	20,52
C.N.●	8,32 ^{Aa}	7,47 ^{ABa}	6,00 ^{BCa}	5,85 ^{ABCDa}	7,50 ^{Aa}	5,85 ^{ABCa}	5,25 ^{ABa}	30,94
Testemunha [■]	6,74 ^A	6,74 ^{AB}	6,74 ^{AB}	6,74 ^{ABC}	6,74 ^{AB}	6,74 ^A	6,74 ^A	
CV(%)	23,24	22,28	27,06	24,62	35,31	24,94	29,10	
D	RAÍZES LATERAIS (número de raiz laterais . radícula ⁻¹)							CV(%)
	1 ^{**}	2 ^{**}	3 ^{**}	4 ^{**}	5 ^{NS}	6 ^{NS}	7 [*]	
SEMI A2050	98 ^{Aa}	31,50 ^{DEb}	92 ^{Aa}	99 ^{Aa}	22,50 ^{Cb}	9,07 ^{DE}	66 ^{Abab}	12,05
SEMI A2051	96 ^{Aa}	50,50 ^{BCDc}	50,75 ^{Cc}	18,50 ^{CD}	19,50 ^{Cd}	18,50 ^{CDd}	46,75 ^c	9,64
SEMI A384	67,50 ^{BCa}	56,25 ^{BCab}	14,75 ^{Ec}	2,50 ^{Eb}	11,00 ^{Cec}	2,50 ^{Ec}	71 ^{Aa}	18,99
SEMI A265	22,50 ^{Dcde}	41,75 ^{CDEbcd}	52 ^{Cab}	21,00 ^{BCbc}	12,25 ^C	21 ^{BCde}	39,50 ^{CDbc}	24,03
SEMI A235	74,50 ^{Bb}	117 ^{Aa}	28,75 ^D	24,5 ^{BCc}	21,75 ^{Cb}	24,50 ^{BCc}	59,5 ^{ABCb}	17,37
BR 11175	57,25 ^{Cc}	20,00 ^{DEd}	46,25 ^{Cbc}	29,50 ^{Bc}	20,50 ^{Cd}	29,50 ^{Bc}	36,75 ^{Dc}	9,87
BR 11417	34,25 ^{Dcd}	31 ^{Ecd}	46,25 ^{Cbc}	30 ^{Bbc}	22,00 ^{Cd}	30,00 ^{Bcd}	60,75 ^{ABCa}	20,60
C.N.●	66,25 ^{BCb}	66,25 ^b	90 ^{Aa}	31 ^{Bc}	35 ^{Ac}	31,00 ^{Bc}	44,25 ^{BCDc}	11,01
Testemunha [■]	72,62 ^{BC}	72,62	72,62 ^B	72,62 ^A	72,62 ^B	72,62 ^A	72,62 ^A	
CV(%) =	10,90	12,16	10,58	21,76	15,92	17,15	16,72	

● Controle negativo do tratamento; ■ Neste não houve nenhum tratamento apenas foi aplicado solução nutritiva para desenvolvimento da plântula; ** Teste significativo ($P \leq 0,01$) e * Teste significativo ($P \leq 0,05$); NS Teste não significativo em relação a testemunha, C.V.= coeficiente de variância. As letras maiúsculas indicam o experimento com estirpes distintas com o mesmo tratamento. As letras minúsculas indicam os experimentos com a mesma estirpe com diferentes tratamentos.

Em trabalho com RPCPs em arroz em cultivo de hidroponia, sob condições de laboratório, EL-KHAMAS & ADACHI (1999) utilizando diversas concentrações de sobrenadante (2 a 8%) de caldo bacterianos de *A. brasilense* e *K. pneumoniae*, observaram alongação de raízes e proliferação de raízes laterais das plântulas. Conseqüentemente esses efeitos levam a um aumento substancial da plântula decorrente do aumento na eficiência de retirada de nutrientes de necessários para o crescimento após 21 dias de cultivo de hidroponia.

Experimentos de RPCPs com estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* foram realizados por BIWAS et al. (2000) em casa de vegetação e observaram em seus resultados que duas estirpes E11 e IRBG74 promoveram e estimularam o desenvolvimento de plantas de 20 a 40% no tamanho das raízes e também um aumento de nos grãos após 60 dias de cultivo.

O sucesso destes resultados podem se explicado por PRAYTINO, (1999) que certas amostras de *R. leguminosarum* colonizam intercelularmente, multiplicando e migrando nas raízes laterais do arroz de forma muito rápida e fixando o atmosférico e repassando para a planta.

Estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* foram isoladas por YANNI et al., (1997) e realizaram estudos em campos de cultivo e confirmaram que além de contribuir para o termo a FBN, reduziram a aplicação de produtos a base de N e aumentaram de produção de grãos de 25 a 33% em relação ao controle.

Apesar de que ainda faltam muitas informações entre as interações *Rhizobium*-arroz (YANNI et al., 1997), os resultados significativos deste trabalho podem ser explicados por CHI et al. (2005), PERINE et al. (2001) e PERINE-WALKER ET AL. (2007). Estes autores demonstraram por microscopia eletrônica, através de marcações com genes fluorescentes, que a interação *Rhizobium*-arroz é uma interação complexa e dinâmica. Este microrganismo não utiliza somente como porta de entrada as raízes laterais, quebras ou lesões de tecido da raiz em cabelereira ("root hairs"), mas pode penetrar ativamente na planta, pois existe emissão de flavonóides e enxudatos emitidas pelo vegetal que auxilia processo de quimiotaxia.

Todos os tratamentos utilizando somente o sobrenadante do meio de cultura (tratamentos 5 e 6), não foram significativos à testemunha em peso seco, extensão

de parte área e raíz. Resultados similares foram relatados por EL-KHAMAS & ADACHI, 1999 que perceberam que concentrações acima de 10% sobrenadante com bactérias produtoras de AIA inibiram a elongação das raízes e raízes laterais.

Células de raízes e da parte área são sensíveis a adição de auxinas, e que a elevada produção de indóis reduz o comprimento das mesmas na presença de triptofano (RADWAN et al., 2004).

Resultados positivos e negativos da utilização de *R. leguminosarum* deste trabalho corrobora com PERRINI et al., (2000) que utilizaram estirpes de mesma espécie no cultivar Pelde em condições laboratoriais. Os autores observaram resultados positivos e negativos quanto ao desenvolvimento das plântulas e concluíram que além do genótipo do vegetal, as bactérias estudadas inibem o crescimento do vegetal por possuírem genes nos plasmídeos pSym que originam produtos que afetam o crescimento, o desenvolvimento e a morfologia da raiz. Além disso, PERRINI e seus colaboradores verificaram o envolvimento do fitohormônio auxina como um ponto chave nesta complexa interação bactéria-planta.

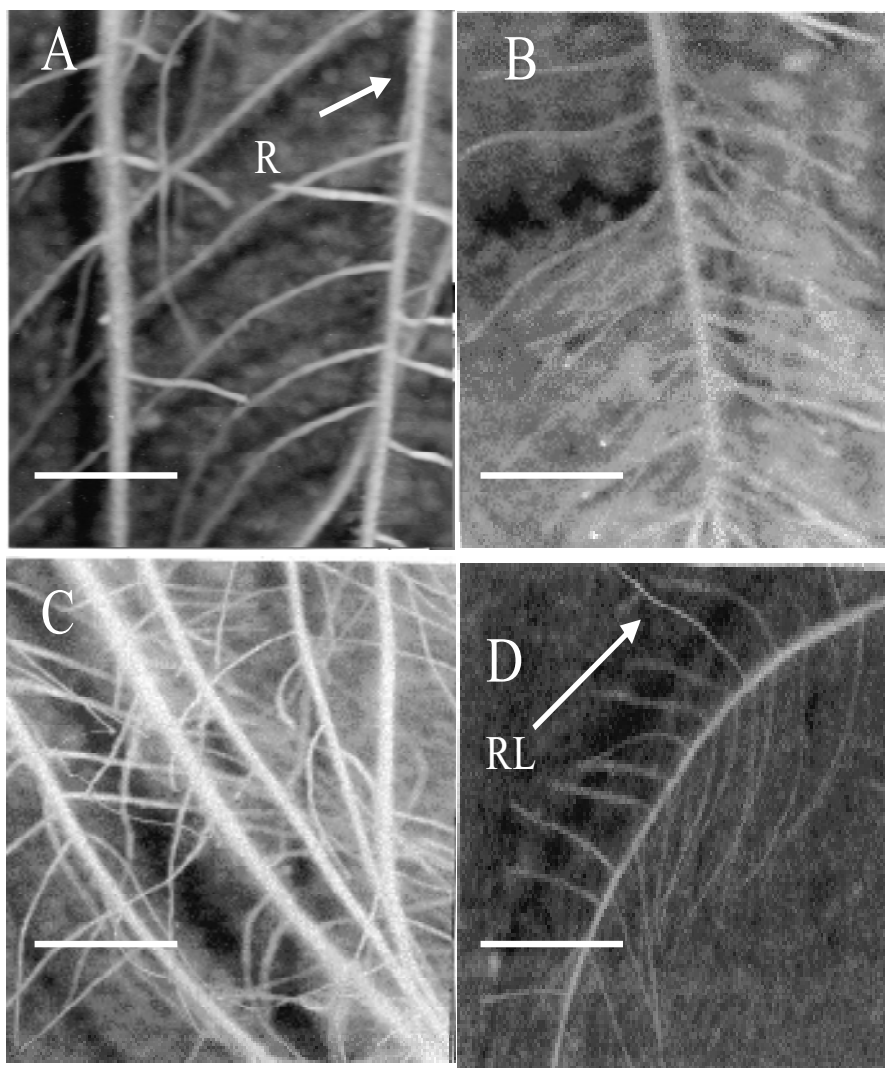


Figura 8. Morfologia das raízes de plântulas de arroz cultivado em solução nutritiva por 30 dias sob diferentes condições de tratamentos com a inoculação de *R.leguminosarum*: (A) testemunha – aumento 8X; (B) SEMIA 235 com tratamento nº 2; (C) SEMIA 2050 com tratamento nº 3; (D) SEMIA 2051 com tratamento nº 1. As barras representam escala de 2mm. B, C e D estão com aumento 6,3X. R representa a radícula (raiz principal) e RL (representa as raízes laterais).

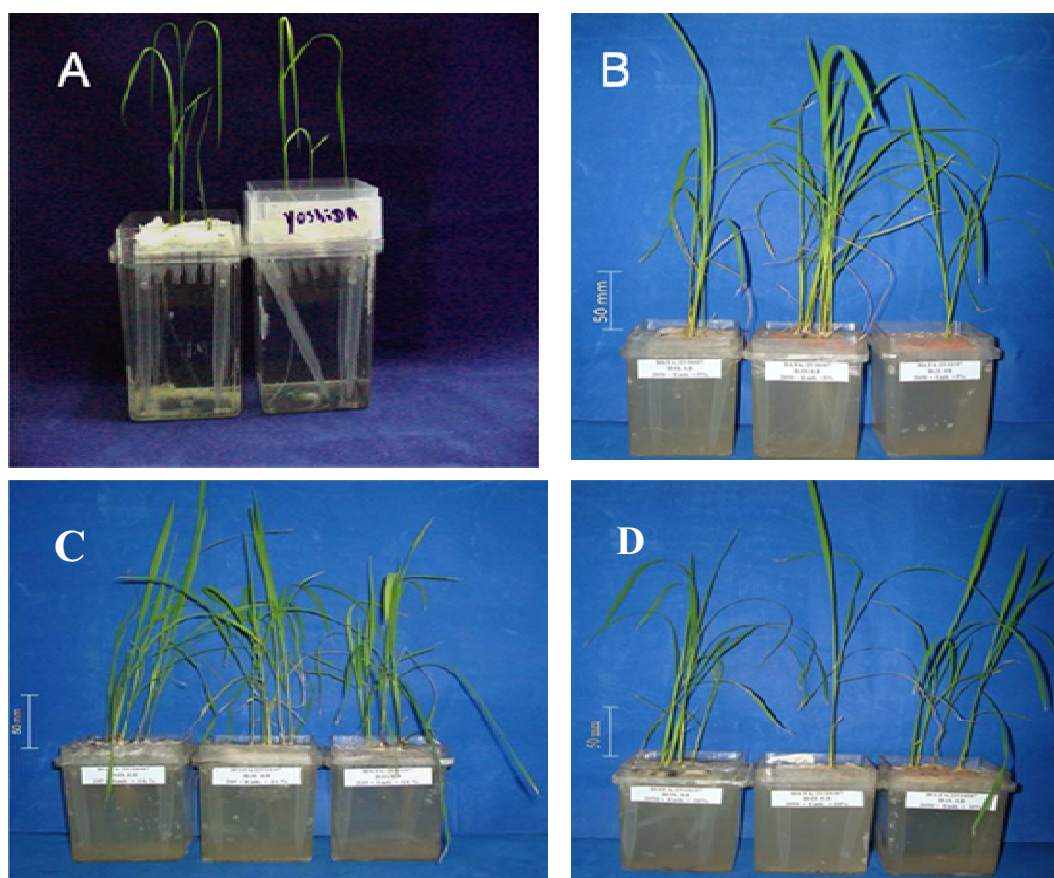


Figura 9. Ilustração demonstrando o experimento de plântulas de arroz IAC 103 cultivado em solução nutritiva por 30 dias sob diferentes condições de tratamento com a inoculação de *R. leguminosarum*: (A) testemunha, (B) SEMIA 235 com tratamento nº 2; (C) SEMIA 2050 com tratamento nº 3; (D) SEMIA 2051 com tratamento nº 1. As barras representam escala de 50 mm.

IV.5. Resultados das inoculações de bactérias isoladas de cultivares Maravilha e Irga 144

A inoculação do cultivar IAC 103 com as bactérias selvagens selecionadas para o experimento em cultivo resultou em diversas situações (Figuras 10, 11 e Tabela 10). Foram selecionadas estas três bactérias porque elas foram positivas para a produção de ácido indolacético e também apresentarem características positivas para a atividade da nitrogenase. Inoculações com as bactérias 8 (*Acinetobacter* sp.), End8 (*Burkholderia* sp.) nos diferentes tratamentos não implicaram em diferenças significativas tanto no acúmulo de massa seca, quanto no desenvolvimento da raiz e na parte aérea em relação à testemunha. Além disso, a inoculação das sementes com o isolado End 8 (*Burkholderia* sp.) foi prejudicial ao desenvolvimento das plantas de arroz em todos os tratamentos (Tabela 10). Essa bactéria impediu a germinação das sementes, em 06 tratamentos e apenas as suspensões bacterianas inoculadas as sementes promoveram a germinação com o tratamento 1 embebição (Figuras 10D, 11). Mesmo que esta estirpe, por ensaios anteriores, tenha demonstrado produzir ácido indolacético e ser um fixador de nitrogênio, não se adaptou ao ensaio ou até mesmo ao cultivar. Esses resultados observados podem ser explicados através de observações e proposições feitas por KUSS et al (2007), estes autores afirmaram que podem existir diferenças quanto à fixação de N₂ entre os cultivares analisados, ou seja, pode ocorrer uma alta FBN “in vitro” mas isto não se implica conseqüentemente em transferência total do N fixado para a planta.

Utilizando suspensões bacterianas do isolado MT6 para inoculação de sementes do cultivar IAC 103 observou-se resultados significativos nos tratamentos n^{os} 3 e 4 (Tabela 10A) que provocaram um aumento substancial na massa seca das plântulas em relação à testemunha (21%) (Figuras 10B e C) . Nestes mesmos tratamentos citados os resultados referentes da extensão a parte aérea das plantas foram satisfatórios, mesmo que estes não sejam estatisticamente significativos, os números absolutos ficaram 12% e 14% acima dos valores da testemunha (Tabela 9B). Parece que o acréscimo do sobrenadante (5 e 10%) do meio onde a MT6 foi

cultivada corroborou uma aparência sadia do IAC 103 em relação à testemunha (Figura 11A e B), propondo seu uso como base para formulações futuras de inoculantes.. Aumento na massa seca não foi devido a extensão de raízes e raízes laterais e pela extensão da parte área conforme demonstrado nas (Figuras 11 B e C) em relação ao controle Figura (8A).

O isolado S8 (*Acinetobacter* sp.) não estimulou, mas também não inibiu o crescimento vegetativo da plântula, na maioria dos tratamentos utilizados neste trabalho. Apenas um tratamento o resultado foi benéfico ao crescimento da plântula de arroz irrigado. Mesmo que o tratamento nº 1 não estimulou um crescimento em valores significativos em relação a testemunha, os valores absolutos da parte área foram de 25% acima em relação a testemunha (Tabela 10A). Os resultados desta estirpe em relação ao cultivar IAC 103 já era esperado devido a falta de informações sobre este gênero e sobre sua possível atuação na estimulação de crescimento em arroz ou outro vegetal ,

Deve-se ressaltar que os experimentos desse trabalho foram realizados condições em que não houve qualquer interferência ambiental, ou seja, os microrganismos não ficaram expostos a diversos fatores existentes no solo ou competições com outros organismos, entretanto as estirpes SEMIAs 235, 2050 e 2051 e o isolado MT6 (*Rhizobium* sp.) podem ser consideradas estirpes candidatas a RPCPs e serem usadas futuramente como inoculantes para arroz. Outros trabalhos devem ser realizados observando o comportamento dessas bactérias com outros cultivares de arroz. Além disso, ensaios devem ser realizados tanto em vasos como ou campo para se avaliar não apenas o efeito de tais bactérias no desenvolvimento do arroz mas também na sua produtividade.

Tabela 10. Efeito dos diferentes tratamentos no cultivo do cultivar IAC 103 em solução nutritiva, com isolados obtidos dos cultivares Maravilha e Iriga 144. Métodos estatísticos foram realizados pelo método Tukey pelo programa Estat.

A	MASSA SECA (mg .planta ⁻¹)								
	TRATAMENTOS								
ESTIRPES	1**	2**	3**	4**	5 ^{NS}	6 ^{NS}	7*	Testemunha	CV(%)
<i>Rhizobium</i> sp	14.90 ^{Cab}	13.15 ^{Bab}	19.00 ^{Aa}	20.02 ^{Aa}	15.45 ^{Aab}	8.05 ^{Bb}	16.35 ^{Aab}	15.42 ^{ab}	29.30
<i>Acinetobacter</i> sp	20.60 ^{ABab}	13.67 ^{Bab}	12.17 ^{Bab}	18.72 ^{Ba}	11.07 ^{Ab}	11.72 ^{ABab}	16.47 ^{Aab}	15.42 ^{ab}	23.62
<i>Burkholderia</i> sp	9.22 ^D	I.C.	I.C.	I.C.	I.C.	I.C.	I.C.	15.42	-----
C.N. •	19.01 ^{Aab}	21.02 ^{Aa}	13.05 ^{Bcd}	16.78 ^{Babc}	12.95 ^{ACd}	16.28 ^{ABcd}	8.73 ^{Ad}	15.42 ^{bc}	16.41
Testemunha [■]	15.42 ^{BC}	15.42 ^{BC}	15.42 ^B	15.42 ^B	15.42 ^A	15.42 ^A	15.42 ^A	-----	-----
CV (%) =	14.97	16.83	14.72	17.64	26.57	22.03	27.33		
B	EXTENSÃO PARTE AÉREA (cm .planta ⁻¹)								
ESTIRPES	1**	2**	3**	4**	5 ^{NS}	6 ^{NS}	7*	Testemunha	CV(%)
<i>Rhizobium</i> sp	22.07 ^{Aab}	22.50 ^{Aab}	25.20 ^{Aa}	25.95 ^{Aa}	21.95 ^{Aab}	22.25 ^{Aab}	15.37 ^{BCb}	22.62 ^{ab}	15.68
<i>Acinetobacter</i> sp	27.22 ^{Aa}	23.62 ^{Aa}	14.62 ^{Ca}	24.07 ^{Ca}	24.27 ^{Aa}	20.96 ^{Aa}	19.42 ^{ABa}	22.62 ^a	15.13
<i>Burkholderia</i> sp	13.00 ^B	I.C.	22.54 ^{AB}	I.C. ^A	I.C.	I.C.	I.C.	22.62	-----
C.N. •	21.43 ^{Aa}	19.05 ^{Aa}	20.21 ^{ABCa}	22.33 ^{Aa}	19.68 ^{ABa}	21.85 ^{Aa}	11.18 ^{BCb}	22.62 ^a	13.24
Testemunha [■]	22.62 ^A	22.62 ^A	22.62 ^{AB}	22.62 ^A	22.62 ^A	22.62 ^A	22.62 ^A	-----	-----
CV (%) =	16.32	18.27	14.47	14.81	14.29	15.4	17.83		

Continuação Tabela 10

C	EXTENSÃO RAIZ (cm. planta ⁻¹)							CV(%)	
	1	2	3	4	5	6 ^{NS}	7		
<i>Rhizobium</i> sp	8.37 ^{Aa}	7.45 ^{Aa}	4.92 ^{Aa}	7.82 ^{Aa}	7.16 ^{Aa}	5.28 ^{Aa}	7.12 ^{Aa}	6,74 ^a	19.79
<i>Acinetobacter</i> sp	7.62 ^{Aa}	6.00 ^{Aa}	5.75 ^{BCa}	5.62 ^{Aa}	3.81 ^{Ba}	4.78 ^{Aa}	6.95 ^{Aa}	6,74 ^a	30.28
<i>Burkolderia</i> sp	2.00 ^B	I.C.	I.C.	I.C.	I.C.	I.C.	I.C.	6,74	
C.N. •	8,32 ^{Aa}	7,47 ^{Aa}	6,00 ^{BCa}	5,85 ^{Aa}	7,50 ^{Aa}	5,85 ^{Aa}	5,25 ^{Aa}	6,74 ^a	30.94
Testemunha [■]	6,74 ^A	6,74 ^A	6,74 ^{AB}	6,74 ^A	6,74 ^{AB}	6,74 ^A	6,74 ^A		
CV (%)=	31.11	21.1	13.88	27.29	23.98	27.36	29.76		
D	RAIZES LATERAIS (número de raiz laterais . radícula ⁻¹)							CV(%)	
	1	2	3	4	5 ^{NS}	6 ^{NS}	7		
<i>Rhizobium</i> sp	96.50 ^{Aa}	86.75 ^{Ab}	67.50 ^{Ab}	72.62 ^A	56 ^{Ccd}	12 ^{DEbc}	65 ^{ABd}	72,62 ^{ab}	23.45
<i>Acinetobacter</i> sp	73.00 ^{Ca}	35.00 ^B	60.25 ^{Cabc}	66.50 ^{Aab}	59 ^{Cc}	18 ^{CDc}	32 ^{Dbc}	72,62 ^a	23.02
<i>Burkolderia</i> sp	12.75 ^D	I.C.	I.C.	I.C.	I.C.	I.C.	I.C.	72,62	
C.N. •	66.25 ^{BCb}	66.25 ^{Ac}	90 ^{Aa}	31 ^{Bc}	95.25 ^{Aa}	31.00 ^{Bc}	44.25 ^{BCD}	72,62 ^b	11,01
Testemunha [■]	72,62 ^B	72,62 ^A	72,62 ^B	72,62 ^A	72,62 ^B	72,62 ^A	72,62 ^A		
CV(%) =	13.85	20.00	12.21	22,68	15.92	17.15	16.72		

• Controle negativo do tratamento; ■ Neste não houve nenhum tratamento apenas foi aplicado solução nutritiva para desenvolvimento da plântula; ^{NS} Teste significativo ($P \leq 0,01$) e ^{*} Teste significativo ($P \leq 0,05$); ^{NS} Teste não significativo em relação à testemunha, C.V.= coeficiente de variância . I.C inibiu o crescimento. As letras maiúsculas indicam o experimento com estripes distintas com o mesmo tratamento. As letras minúsculas indicam os experimentos com a mesma estripe com diferentes tratamentos.

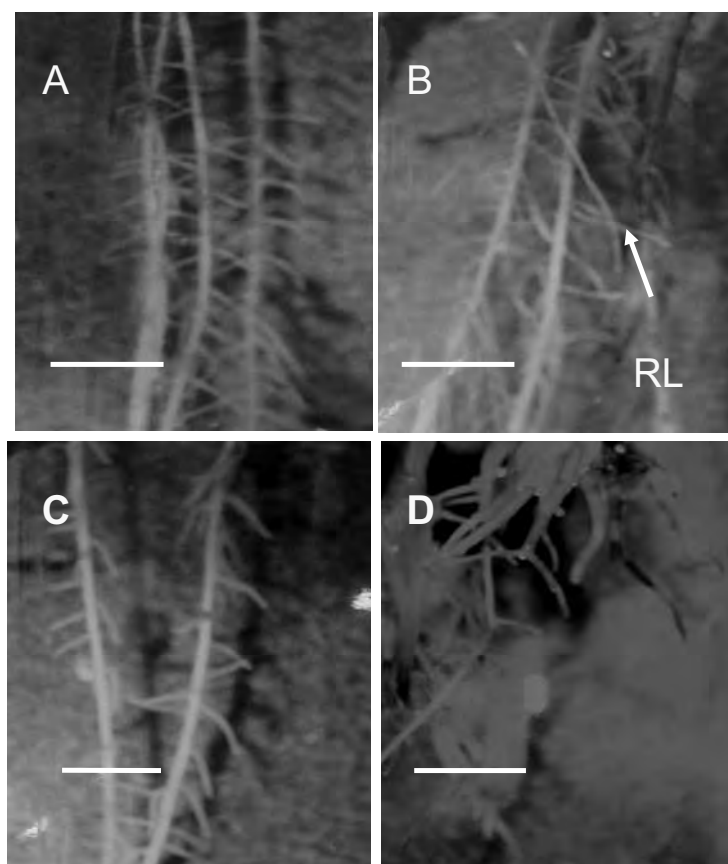


Figura 10. Morfologia das raízes de plântulas de arroz cultivado em solução nutritiva por 30 dias sob diferentes condições de tratamento com a inoculação de isolados obtidos dos cultivares Irga 144 e Maravilha: (A) S8 – com tratamento nº 1 aumento 8X; (B) MT6 com tratamento nº 3; (C) MT6 com tratamento nº 4; (D) END8 com tratamento nº 1. As barras representam escala de 2mm. B, C e D estão com aumento 6,3X. R representa a radícula (raiz principal) e RL (representa as raízes laterais).

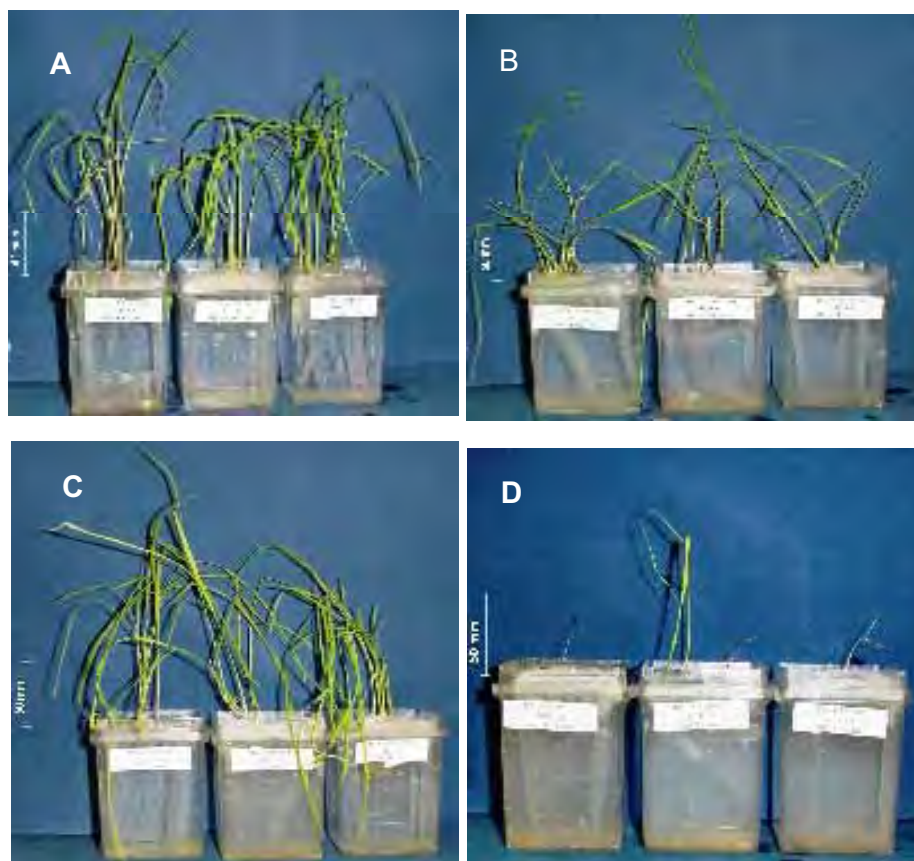


Figura 11. Ilustração demonstrando o experimento de plântulas de arroz IAC 103 cultivado em solução nutritiva por 30 dias sob diferentes condições de tratamento com a inoculação de isolados obtidos dos cultivares Irga 144 e Maravilha. (A) MT6 com tratamento nº 4, (B) MT6 com tratamento nº 3; (C) S8 com tratamento nº 1; (D) END8 com tratamento nº 1. As barras representam escala de 50 mm.

V. CONCLUSÕES

As análises dos resultados permitiram as seguintes conclusões:

1. Todas as estirpes de *R. leguminosarum* deste estudo foram capazes de produzir ácido indolacético *in vitro*.

2. Apenas as estirpes 384, 2050, 2051 e os isolados *Burkholderia* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Agrobacterium* sp. reduziram o acetileno *in vitro* em nas condições deste ensaio em meio de cultura BMGM.

3. As SEMIAs 2050 e 2051 e o isolado do cultivar Maravilha *Rhizobium* sp. (MT6) sob os tratamentos números 3 e 4 promoveram um acúmulo de massa seca, e raízes laterais no cultivar IAC 103 sob solução nutritiva em 30 dias de cultivo.

4. A SEMIA 235 promoveram sob o tratamento número 2 um acúmulo de massa seca, e raízes laterais no cultivar IAC 103 sob solução nutritiva em 30 dias de cultivo.

5. A estirpe diazotrófica *Burkholderia* sp. (END8) inibiu o crescimento do cultivar 103 em todos os tratamentos, sendo prejudicial sua utilização para o vegetal.

VI. REFERÊNCIAS

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review**, Washington, v. 59, p 143-169, 1995.

ARROZ BRASILEIRO – PROJETO DESENVOLVIDO PELA NATURAL SOLUÇÕES SETORIAIS. Disponível em : <http://www.arroz.agr.br>. Acesso em: 15/06/05.

ASGHAR, H. N. et al. Relationship in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v 35, p. 231-237, 2002.

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p. 3389-3402, 1997.

ANTOUN, H. et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on no-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 204, n.1, p. 57-67, 1998.

ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodeversity. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. **Microbial ecology**. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, 1008. P.27-57.

BALDANI, J.I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93.

BALDANI, J.I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology And Biochemistry**, Elmsford, v.29, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J.I.; BALDANI V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in

graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 549-579, 2005.

BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum spp.* **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 12, p.433-439, 1980.

BALDANI, V.L.D. **Efeito da Inoculação de *Herbaspirillum spp.* no processo de colonização e infecção de planta de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica seropédica.** 1996. 238p.Tese (Doutorado. Em Agronomia) Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro, Seropédica, 1996.

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

BARBOSA, J. C.; MALHEIROS, E. B.; BANZATTO, D. A. **ESTAT**: um sistema de análises estatísticas de ensaios agrônômicos: versão 2.0. Jaboticabal: Unesp, 1992.

BARRIUSO, J. et al. Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus*-*Pinus sp.* **Microbial Ecology**, Nova York, v. 50, p.82-89, 2005.

BASTIAN, F. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulatons**, Dordrecht ,v. 24, p. 7-11, 1998.

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

BENEDUZI, A. et al. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen- fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied**

Soil Ecology v.10, p. 318-314,2008.

BISWAS, C. et al. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of Lowland rice. **Soil Scientific Society American**, Madison, v. 64, p. 1644-1650, 2000.

BORNEMAN, J. et al. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n. 6, p. 935-43, 1996.

BORNEMAN, J. et al. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n. 7, p. 2647-53, 1997.

BROEK, A.V. Auxins upregulate expression of the indole-3- Pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 1338-1342, 1999.

CANHOS, V.P. et al. Diversidade no domínio bactéria. In: CANHOS, V.P. et al. **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo: FAPESP, 1997. P.1-13.

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

CHABOT, R. et al. Root colonization of Maize and Lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2767-2772, 1996.

CHI, F. et al. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and**

Environmental Microbiology, Washington, v.71, n. 11, p.7271-7278, 2005.

CHOUDHURY, A.T.M.A.; KENNEDY, I.R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production, **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 39, p. 219-227, 2004.

COOK, R.J. Management of resident plant growth-promoting rhizobacteria with the cropping system: a review of experience in the US Pacific Northwest. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 255-264, 2007.

CRAWFORD, N.M. et al., Nitrogen and sulfur. In: BUCHANAN, B.B; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of plants**. Rockville: Editora American Society of plant physiologists, 2000. p. 786-849.

CULLEN, D.W.; HIRSCH, P.R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 30, nº 8/9, p. 983-993, 1998.

DASHTI, N. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean (*Glycine max* L. Merr) under short season conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 200, p. 205-213, 1998.

DA SILVEIRA, E.L et al. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 9, p. 1505-1516, 2006.

DOJKA, M.A. Microbial diversity in a Hydrocarbon-and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.10, p. 3869-3877, 1998.

DOBEREINER J.; BALDANI, V.L.D; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI,

1995. 60p.

DROZDOWICZ, A. Bactérias de solo. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1997. p. 17-66.

EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiela* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v.28, p. 377-381, 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa) –Unidade Agrobiologia. Disponível em :.< <http://www.cnpab.embrapa.br> >. Acesso em: 15/06/05.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES,R.; BABALLERO-MELADO, J. Burkholderia a genu rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geografic distibution. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

FERREIRA , J. S. et al. Seleção de veiculos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Agronomia**, Rio de Janeiro, p.6-12, 2003.

FERREIRA, J. S. **Qualidade de inoculante, inoculação e reinoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz irrigado**. 2008. 83f. Tese de (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

GARDENER, B.B.M. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. In: Agricultural Systems Syposium: The Nature and Application of Biocontrol Microbes: *Bacillus* spp, **Phytopathology**, v. 94, pp. 1252-1258, 2004.

GARRITY, G. M. et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology*: The

Proteobacteria, Part C The *alpha*, *beta*, *delta* and *Epsilon* *Proteobacteria*. 2.ed Nova Iorque: Springer-Verlag: 2005. 1388p.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Rockville Pike, v. 26, p.192-195, 1951.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GOVINDARAJAN, M. et al. Effects on the inoculation on *Burkholderia vietnamiensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbial Ecology**, v.55, p. 21-37, 2008

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

GUIMARÃES, E.P.; SANT'ANA, E.P. Sistemáticas de cultivo. In: VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. (Ed). **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p.17-35.

GUIMARÃES, S. L.; et al. Efeito da inoculação de bactérias diazotrófica endofíticas em arroz de sequeiro. **Agronomia**, v. 37, p. 25-30, 2003.

GUIMARÃES, S.L. et al. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.42, n.3, p.393-398, 2007

GYANESHWAR et al. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.183, n.8, p. 2634-2645, 2001.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p.95–98, 1999.

HENTSCHEL, U. et al. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.09, p. 4431-4440, 2002.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969. p.21-132.

KENENDY I. R., et al. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KRAVECHENCKO, L.V. et al. Isolation and phenotypic characterization of plant growth-promoting rhizobacteria with antiphytopathogenic activity and root-colonizing ability. **Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 444-448, 2001.

KOKALIS-BURELLE N. et al. Plant growth promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous microorganisms. **Applied Soil Ecology**, Washington, v. 31, p.91-100, 2006.

KENT, A. D.; TRIPLETT, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.56, p. 211-36, 2002.

KUMAR, S. et al. Mega2: molecular evolutionary genetics analysis software **Bioinformatics**, Oxford, v.17, n.12, p. 1244-1245, 2001.

KUSKE, C. R. et al. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many Geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.09, p. 3614-3621,1997.

KUSS, A.V. et al. Inoculação de bactérias diazotróficas e desenvolvimento de plântulas de arroz irrigado em solução nutritiva e câmara de crescimento. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 14, n.2, . 23-33, 2007a.

KUSS, A.V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007b.

LEBUHN, M; HARTMANN, A. Method for the determination of índole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptohan catabolism in soils. **Journal of Chromatography**, Amisterdam, v.629, p.255-266, 1993.

LUDWIG, W. et al. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Lettles**, Amsterdam, v.153, n.1, p. 181-90, 1997.

LUZ, W. Evalution of Plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n. 3, p. 597-600, 2001.

MACRAE, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, p. 77-82, 2000.

MENNAS, S. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Aplied Microbiology**, v. 29, p. 110-117, 2006.

MIRZA, M. S. et al. Molecular characterization and PCR detection of nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. **Biology fertility Soils**, Exeter, v. 43, p. 163-170, 2006.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. p.449-542.

MUTHUKURAMASAMY, R. et al. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term application de N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. **Journal Applied Microbiology**, v. 102, p.981-991, 2007.

OLIVEIRA A.L.M. et al. The effect inoculating endophytic N₂ fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, p. 205-215, 2002.

ONA, O. et al. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **Fems Microbiology Letters**, Oxford, v.246, p. 125-132, 2005.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATS T. Plasmid vectors. In: SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATS T. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p.1.1-10.

PERRINE, F. M. et al. Rhizobium plasmids are involved in the inhibition or stimulation of rice growth and development . **Australian Journal of Plant Physiology**, Sidney, v.28, p. 923-937, 2001.

PERRINE-WALKER, F.M. et al Infection process and interaction of rice roots with rhizobia. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 3343-3350, 2007.

PRAYITNO, J. et al. Interactions of rice seedlings with bacteria isolated from rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Sidney, v. 26, p.521-535, 1999.

PIAO, Z. et al. Changes in acetylene reduction activities and effects of inoculated rhizosphere nitrogen-fixing bacteria on rice, **Biology Fertility Soils**, v. 41, p. 371-378, 2005.

RADWAN, T.E.E. et al. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p.997-1004, 2005.

RADWAN T. E. E.; et al. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p.987-994, 2007.

SAITOU, N.; NEI M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**, Chicago, v.4, p. 406-25, 1987.

SANDAA, R.A. et al. Rapid methods for fluorometric quantification of DNA in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 30, n. 2, p. 265-268, 1998.

SHAHAROONA, B. et al. Performance of *Pseudomonas* spp. Containing ACC-diaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 38, p. 2971-2975, 2006.

SOUZA, J.A.M. **Produção de anticorpos monoclonais, imunolocalização da proteína salt e análise do efeito da salinidade na estrutura e ultraestrutura de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2000. Dissertação (Mestrado em biociências e Biotecnologia). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goytacazes, 2000.

SUN, L. Et al. Endophytic Bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 415-424, 2008.

VALADARES-INGLIS, M.C.; MELO, I. S. Métodos de extração de DNA e sua aplicação em estudos genéticos e ecológicos. In: MELO, I. S; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, 1998. p. 187-204.

VERNAS, S.C. et al. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

TARRANT, J.J. et al. A taxonomic study of Spirillum lipoferum group with a description of a news genus, Azospirillum nov. gen and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) nov. sp. And *Azospirillum brasilense* nov. sp. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 967-980, 1978

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

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p 4876–4882, 1997.

YANG, J.H. et al. Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, p. 91-104, 2008.

XIE, G. T. et al., Cultivable heterotrophic N₂-fixing bacterial diversity in rice field in the Yangtze River Plain, **Biology and Fertility Soils**, Berlim, v.37, p. 29-38, 2003.

YANNI, Y.G. et al. Natural endophytic association between *Rhizobium*

leguminosarum bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, The Hague, v. 194, p. 99-114, 1997.

WEISBURG, W.G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p.697–703, 1991.

WU, S. C. et al. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**, Amsterdam, v. 125, p. 155-166, 2004.

ZAKHAROVA E.A. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v. 259, p. 572- 576, 1999.

VII. Apêndice 01

a. Meio DYG'S

Glicose	2g
Peptona	1,5g
Extrato de Levedura	2g
KH ₂ PO ₄ .7H ₂ O	0,5
Acido Glutâmico	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g

Completar para 1000mL com H₂O destilada

Ajustar o pH 6.8

Meio sólido colocar a quantidade 9g/L de ágar bacteriano

b. Meio Ym

Extrato de Levedura	0,5g
K ₂ HPO ₄	0,5g
Manitol	10g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g

Completar para 1000mL com H₂O destilada

Ajustar o pH 6.8

Meio sólido colocar a quantidade 9g/L de ágar bacteriano

c. Meio de cultura NFB

Ácido Málico	5g
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2 N de KOH	2mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02g
FeEDTA	0,61g
K ₂ HPO ₄	0,5g
KOH	4,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Solução de Micronutrientes	2mL
Solução de vitaminas	1mL

Completar para 1000mL com H₂O destilada

Ajustar o pH 5.8

Meio sólido colocar a quantidade 9g/L de ágar bacteriano

d.Meio de cultura JNFB

Ácido Málico	5g
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2 N de KOH	2mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02g
FeEDTA	0,61g
K ₂ HPO ₄	0,5g
KOH	4,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Solução de Micronutrientes	2mL
Solução de vitaminas	1mL
KH ₂ PO ₄	1,8g
Extrato de Levedura	0,2g

Completar para 1000mL com H₂O destilada

Ajustar o pH 5.8

Meio sólido colocar a quantidade 9g/L de ágar bacteriano

Micronutrientes para meios de cultura (NFB e JNFB)

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,200g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,235g
H ₃ BO ₃	0,280g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,008g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,024g

Completar o volume para 200mL com água destilada.

Vitamina para os meios de cultura (NFB e JNFB)

Biotina	10mg
Pyroridoxol	20mg
H ₂ O	100mL

Dissolver a banho maria (40° C)

e.Meio LB

extrato de levedura 5,0g;

triptona 10,0 g;

NaCl 10,0g

Completar para 1000mL com H₂O destilada

Ajustar o pH 7,0

Meio sólido colocar a quantidade 9g/L de ágar bacteriano

f. Solução nutritiva Yoshida**Estoque 1**

MnCl	1,14g
Molibdato de amônia	0,17g
H ₃ BO ₃	1,17g
ZnSO ₄	0,043g
CuSO ₄	0,038g
FeCl ₃	15,6g
Acido cítrico	14,6g
KI	0,036g

Por 1 litro de água destilada

Estoque 2

CaCl ₂	8,08g
-------------------	-------

Por 100 mL

Estoque 3

MgSO ₄	39,43g
-------------------	--------

Por 100mL de água destilada

Estoque 4

NH ₄ NO ₃	11,14g
NaHPO ₄	4,45g
K ₂ SO ₄	8,94g

Por 100 mL de água destilada

Cada estoque deve ser dissolvido em 1 litro de água destilada e ajustar o pH 5,8.