

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**Caracterização e Uso de Bactérias Diazotróficas
Isoladas de Diferentes Cultivares de Arroz
Originárias do Estado do Maranhão**

Antonio Edilson da Silva Araújo

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO E USO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ISOLADAS DE DIFERENTES CULTIVARES DE ARROZ
ORIGINÁRIAS DO ESTADO DO MARANHÃO**

ANTONIO EDILSON DA SILVA ARAÚJO

Sob a Orientação do Professor
José Ivo Baldani

e Co-orientação da Professora
Vera Lúcia Divan Baldani

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de Concentração em Agroecologia

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

ANTONIO EDILSON DA SILVA ARAÚJO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Agroecologia.

TESE APROVADA EM 19/02/2008

Jose Ivo Baldani. Dr. CNPAB
(Orientador)

Manlio Silvestre Fernandes. Dr. UFRRJ

Agostinho Dirceu Didonet. Dr. CNPAF

Norma Gouvêa Rumjanek. Dr. CNPAB

Altamiro Souza de Lima Ferraz Junior. Dr. UEMA

AGRADECIMENTOS

A DEUS.

Aos meus orientadores Jose Ivo Baldani e Vera Lúcia Divan Baldani, pela oportunidade, orientação, dedicação e pelo privilégio de fazer parte de sua equipe de pesquisa.

Ao Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia (CPGF), pela oportunidade concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado concedida.

À Embrapa Agrobiologia (CNPAB), pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.

À Professora Claudia Antonia Vieira Rossetto, pelo apoio, incentivo, atenção e ensinamentos.

À Embrapa Meio-Norte, na pessoa do Dr. José Almeida Pereira, pela contribuição na realização deste trabalho.

Aos amigos da Embrapa Agrobiologia, Liamara Perin, Daniele Cristina, Joilson Ferreira, Elisete Rodrigues, Ricardo Alexandre, Marinete Flores, Salomão Guimarães, Sandy Videira, pelo auxílio, momentos de alegria e agradável convívio.

Aos funcionários da Agrobiologia, Luis Carlos, Wilson Cabral, Antonio Lúcio, Geraldo Baeta, pela disponibilidade, atenção e boa vontade nos serviços prestados.

Aos meus pais, Francisco Matias Araújo e Maria Madalena da Silva Araújo, pelo esforço, apoio, incentivo, compreensão e por sempre valorizarem a educação.

Aos meus irmãos, em especial à Francisca e Ednaldo, pela confiança e por me ajudar a manter o equilíbrio emocional durante o curso.

Aos meus amigos do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela amizade e companheirismo.

A todos que me ajudaram ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Antonio Edilson da Silva Araújo; nasceu na cidade de Timbiras, MA, em 17 de julho de 1973, filho de Francisco Matias Araújo e Maria Madalena da Silva Araújo, tornou-se Técnico em Agropecuária, em 1995, após concluir o segundo grau na Escola Agrotécnica Federal de São Luiz. Em 1996, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo-o em setembro de 2001. Neste período, foi bolsista de Iniciação Científica no Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia. Em março de 2002, ingressou no Curso de Mestrado em Fitotecnia pela mesma Universidade. Defendeu sua dissertação intitulada “Avaliação da Qualidade Sanitária e Fisiológica em Sementes de Amendoim (*Arachis hypogaea* L.)” em fevereiro de 2004, no mesmo ano ingressou no curso de Doutorado em Fitotecnia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, desenvolvendo o seu projeto de tese nas dependências da Embrapa Agrobiologia.

RESUMO

ARAÚJO, Antonio Edilson da Silva. **Caracterização e uso de bactérias diazotróficas isoladas de diferentes cultivares de arroz originárias do estado do Maranhão**. 2008. 93p. Tese (Doutorado em Fitotecnia, Agroecologia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Diversos trabalhos têm mostrado que a cultura do arroz pode se beneficiar da associação com bactérias diazotróficas. Entretanto, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em arroz é dependente de uma interação complexa entre as plantas, os microrganismos e o ecossistema. Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a contribuição da FBN em variedades tradicionais de arroz do estado do Maranhão. Como objetivos específicos: a- isolar e caracterizar bactérias diazotróficas nativas de solo cultivado com arroz no estado do Maranhão; b- selecionar as bactérias mais eficientes quanto ao acúmulo de biomassa e produção de grãos; c- verificar se existe relação entre a FBN e o teor de proteínas nos grãos. Para o isolamento foi utilizada como “planta isca” as cultivares IR42 e Diamante e mais duas variedades tradicionais de arroz do Maranhão Zebu Branco e Manteiga, crescidas em amostras de solo, provenientes de três municípios do Maranhão, sendo uma de terras altas (Bacabal) e duas de área de baixada (Arari e Vitória do Mearim). Amostras de raízes, colmos e folhas foram maceradas e inoculadas em meios semi-sólidos semi-seletivos, NFB, JNFB, LGI, LGIP e JMV, sem adição de nitrogênio. Foram obtidos 304 isolados que foram classificados morfológicamente como pertencentes às espécies *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp., além de um grupo não identificado. A diversidade genética dos isolados foi avaliada por meio da amplificação da região 16S DNAr por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR) e da digestão dos produtos de amplificação com enzimas de restrição (ARDRA). O perfil de fragmentos de restrição confirmou o gênero da maioria dos isolados, além disso, mostrou alta diversidade, principalmente para os isolados bacterianos caracterizados morfológicamente como *Burkholderia*. Isolados representantes dos diferentes grupos foram testados em condições gnotobióticas, em vasos e em campo, em diferentes variedades procedentes do Maranhão utilizando-se também duas cultivares como controle. Foi observado que entre os isolados testados, AR1122 de *Herbaspirillum* sp. e AR3122 de *A. amazonense* apresentaram maior potencial para promover o crescimento das plantas e aumentar a produção de grãos na cultura do arroz.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, diversidade microbiana, isolamento.

ABSTRACT

ARAÚJO, Antonio Edilson da Silva. **Characterization and use of diazotrophic bacteria isolated from different rice cultivars originated from Maranhão State.** 2008. 93p. Thesis (Doctor in Fitotecny, Agrobiology). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Several works have shown that rice crop can benefit from the association with diazotrophic bacteria. However, the biological nitrogen fixation (BNF) in rice is dependent of a complex interaction among the plants, microorganisms and the ecosystem. The general objective of this work was to evaluate the contribution of BNF in varieties of rice originated from the State of Maranhão. The specific objectives were: a- To isolate and characterize native diazotrophic bacteria originated from soil cultivated with rice in Maranhão; b- to select the most efficient bacteria in relation to dry matter accumulation and grain yield; c- to study the relationship between FBN and the teor of proteins in the grains. For the isolation was used two rice varieties (IR42 and Diamante) and two traditional rice varieties of Maranhão (Zebu Branco and Manteiga), grown in soil samples originated from three districts of Maranhão, being one of high lands (Bacabal) and two of lowland area (Arari and Vitoria do Mearim). Samples of roots, stems and leaves were grounded and inoculated in nitrogen free semisolid semiselective media: NFB, JNFB, LGI, LGIP and JMV. Around 304 isolates were obtained and classified as belonging to the species *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum* spp. and *Burkholderia* spp and a non identified group that was clustered based only in the morphological characteristics. The genetic diversity of the isolates was evaluated through the amplification of 16S DNAr subunit using the Polymerize Chain Reaction (PCR) technique and digestion of the amplified products with restriction enzymes (ARDRA). Restriction fragment profiles confirmed the identity of most of the isolated and showed high diversity mainly for the bacterial isolates characterized as *Burkholderia*. Isolates representative from the different groups were tested in gnotobiotic conditions, in pots and in the field using different rice varieties originated from the Maranhão State. Two other cultivars were used as controls. It was observed that among the isolates tested, the *Azospirillum amazonense* AR3122 and *Herbaspirillum* sp AR1122 howed potential to promote growth of rice plants and to increase the grain yield of this crop.

Keys words: Biological nitrogen fixation, Microbial diversity, Isolation

LISTA DE ABREVIACOES

AIA	Ácido indol acético
ARDRA	Análise de Restrição da Região 16S DNAr AMplificada
ARA	Atividade da Redução de Acetileno
CNPAB	Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
DNAr	DNA ribossomal
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatados
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
NMP	Número Mais Provável
<i>nif</i>	Gene que codifica a nitrogenase
PCR	Reação em Cadeia da Plomerase
r.p.m.	Rotações por minuto
TAE	Tris, Acetato, EDTA
TE	Tampão Tris, EDTA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Arroz: Importância Econômica	1
1.2 O Arroz no Estado do Maranhão	2
1.3 Diversidade de Bactérias Diazotróficas Associadas às Plantas de Arroz	3
1.3.1 O gênero <i>Azospirillum</i>	4
1.3.2 O gênero <i>Herbaspirillum</i>	4
1.3.3 O gênero <i>Burkholderia</i>	5
1.4 Colonização e Estabelecimento Endofítico de Bactérias Diazotróficas em Arroz	5
1.4.1 Colonização por <i>Azospirillum</i> spp.	6
1.4.2 Colonização por <i>Herbaspirillum</i> spp.	6
1.4.3 Colonização por <i>Burkholderia</i> spp.	7
1.4.4 Colonização por <i>Azoarcus</i> spp.	7
1.4.5 Colonização por <i>Rizobium</i> spp.	8
1.5 Fixação Biológica de Nitrogênio Atmosférico (FBN) em Arroz	8
1.6 Fatores que Influenciam a Fixação Biológica de Nitrogênio na Cultura do Arroz	8
1.7 Avaliação da Fixação Biológica de Nitrogênio	10
2 CAPÍTULO I. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NATIVAS DO ESTADO DO MARANHÃO	13
2.1 Resumo	14
2.2 Abstract	15
2.3 Introdução	16
2.4 Material e Métodos	17
2.4.1 Isolamento e contagem de bactérias diazotróficas	17
2.4.2 Caracterização morfológica	18
2.4.3 Caracterização molecular	18
2.4.4 Determinação da atividade de redução do acetileno (ARA)	19
2.4.5 Produção de compostos indólicos	19
2.5 Resultados e Discussão	20
2.5.1 Isolamento e contagem de bactérias diazotróficas em arroz	20
2.5.2 Determinação da atividade de redução do acetileno (ARA) de culturas bacterianas <i>in vitro</i>	23
2.5.3 Determinação da Produção de Ácido Indol- Acético (AIA) <i>in vitro</i>	23
2.5.4 Diversidade genética dos isolados	24
2.5.4.1 Isolados caracterizados morfológicamente como <i>Herbaspirillum</i> spp.	24
2.5.4.2 Isolados caracterizados morfológicamente como <i>Azospirillum</i> spp.	28
2.5.4.3 Isolados caracterizados morfológicamente como <i>Azospirillum amazonense</i>	30
2.5.4.4 Isolados caracterizados morfológicamente como <i>Burkholderia</i> spp.	32
2.5.4.5 Isolados caracterizados morfológicamente como não identificados	36
2.6 Conclusões	39
3 CAPÍTULO II. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZÓTROFICAS NA PRODUÇÃO DE GRÃOS EM DIFERENTES CULTIVARES DE ARROZ TRADICIONAIS	40
3.1 Resumo	41
3.2 Abstract	42
3.3 Introdução	43

3.4	Material e Métodos	44
3.4.1	Avaliação preliminar das variedades e cultivares utilizadas para seleção de estirpes ...	44
3.4.2	Seleção de estirpes em condições gnotobióticas	45
3.4.3	Seleção de estirpes em condições de vasos e em campo	46
3.4.3.1	Experimento em vasos	46
3.4.3.2	Experimento em campo	47
3.5	Resultados e Discussão	48
3.5.1	Avaliação de características agronômicas das variedades e cultivares utilizadas para a seleção de estirpes	48
3.5.2	Avaliação e seleção de isolados de bactérias diazotróficas em associação com diferentes variedades de arroz crescidas em condições gnotobióticas	50
3.5.3	Experimento de arroz cultivado em vasos com terra e inoculado com isolados previamente selecionados	51
3.5.4	Avaliação do efeito da inoculação com bactérias diazotróficas em diferentes variedades de arroz cultivadas em condições de campo	56
3.6	Conclusões	57
4	CAPÍTULO III. EFEITO DA INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA GERMINAÇÃO E VIGOR DE SEMENTES ARROZ	58
4.1	Resumo	59
4.2	Abstract	60
4.3	Introdução	61
4.4	Material e Métodos	61
4.5	Resultados e Discussão	63
4.6	Conclusões	66
5	CONCLUSÕES GERAIS	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	80

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Arroz: Importância Econômica

O gênero *Oryza*, pertence à família Poaceae (gramineae) e engloba cerca de 23 espécies. Duas formas silvestres são apontadas na literatura como precursoras do arroz cultivado: a espécie *Oryza rufipogon*, procedente da Ásia, originando a espécie *Oryza sativa*; e a espécie *Oryza barthii* (= *Oryza breviligulata*), derivada da África Ocidental, dando origem à espécie *Oryza glaberrima*. A espécie *O. glaberrima* caracteriza-se por não apresentar ramificações na panícula, pericarpo vermelho e lígulas mais curtas. Já a espécie *O. sativa* caracteriza-se por apresentar ramificações secundárias nas panículas, espiguetas persistentes no pedicelo e lígulas com até 10 mm de comprimento (PEREIRA, 2002).

A espécie *O. sativa*, devido a sua grande aceitação como alimento se dispersou pelo mundo todo, e é considerada uma espécie polifilética resultante do cruzamento de formas espontâneas variadas. Ao longo do tempo, foram surgindo inúmeros tipos geneticamente divergentes que foram se adaptando às mais variadas condições agroecológicas. Atualmente esta espécie encontra-se subdividida em três subespécies *indica*, *japonica* e *javanica* (PEREIRA, 2002).

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o principal alimento para mais da metade da população mundial (YOKOYAMA et al., 1999). É o segundo cereal mais consumido no mundo, atendendo a grande parte da necessidade protéica e calórica da população (DE DATTA et al., 1987). Atualmente, cerca de 90% do volume mundial deste cereal é produzido e consumido na Ásia. É considerado pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) como o alimento mais importante para a segurança alimentar do mundo, por ser uma cultura muito rústica e adaptada às mais diversas condições edafoclimáticas. É o único cereal que pode ser cultivado em solos inundados, sendo considerada a espécie com maior potencial de aumento de produção para o combate da fome no mundo. Além disso, contem um excelente balanceamento nutricional, e pode fornecer 20% da energia e 15% das proteínas necessárias ao homem e se destaca pela sua fácil digestão.

O Brasil se destaca como o principal produtor de arroz entre os países ocidentais. Apesar das reduções de produção em algumas safras nos últimos anos, devido às adversidades climáticas, a produção brasileira de arroz vem apresentando uma tendência de crescimento, em função, principalmente, do constante incremento de produtividade (FAO, 2006). De acordo com dados da CONAB (2008), na safra 2006/07, o arroz foi plantado em aproximadamente 2.976 milhões de hectares no país, produzindo cerca de 11,1 milhões de toneladas com uma produtividade média de 3.865 quilos por hectare.

Durante muitos anos o Brasil foi um país exportador de arroz, na década de 80 passou a importar pequenas quantidades e, a partir de 1990, se tornou um dos principais importadores deste cereal, importando principalmente do Uruguai e da Argentina, que responderam por cerca de 85 a 90% das importações brasileiras (EMBRAPA, 2007). Nos últimos anos, o consumo brasileiro de arroz vem aumentando num ritmo bem inferior ao crescimento da produção devido a uma gradual redução do consumo *per capita* do cereal, como consequência de uma série de modificações nos padrões e hábitos de consumo de alimentos da população brasileira. No entanto, CASSUCE et al. (2006) estudando a oferta e a demanda de produtos agrícolas no Brasil e considerando três cenários econômicos entre 2008 e 2012, observaram que a demanda de arroz será maior que a oferta nesse período.

1.2 O Arroz no Estado do Maranhão

O arroz é uma das plantas cultivadas mais antigas do mundo, e sua história se confunde com a própria trajetória humana. Originário do sudeste da Ásia foi, provavelmente, a primeira planta cultivada na Ásia. O arroz se dispersou pelo mundo inteiro. Foram, provavelmente, os portugueses que introduziram esse cereal na África Ocidental, e os espanhóis, os responsáveis pela sua disseminação nas Américas (EMBRAPA, 2007).

No Brasil, a história do arroz remonta a época do descobrimento, entretanto, naquela época já ocorriam no país algumas espécies silvestres. No Maranhão, a introdução do arroz ocorreu no século XVII. Entretanto não é possível se determinar com precisão o ano em que o arroz foi introduzido no Maranhão. Neste estado, o arroz vermelho foi a única variedade cultivada até 1766 quando foi substituída pelo arroz branco da Carolina. Entre os anos de 1768 e 1777, o arroz era o único cereal exportado pelo Brasil, sendo o Maranhão o maior produtor colonial (PEREIRA, 2002). Até o final do século XIX, a produção de arroz no estado sofreu oscilações. A partir da primeira metade do século XX, houve uma elevação na produção do arroz e em 1945 o Maranhão era o nono estado maior produtor (PEREIRA, 2002). As regiões mais produtoras eram a Baixada Maranhense e na região de Bacabal, onde o cultivo era realizado por pequenos produtores espalhados pelas inúmeras roças na região (CANEDO, 1993). De 1945 até 1982, a cultura do arroz experimentou um crescimento constante e atingiu seu ápice em 1982, com a expansão da fronteira agrícola do Estado por meio da abertura de áreas agrícolas ao Sul. Nesta ocasião, o Maranhão foi o terceiro maior produtor, perdendo somente para o Rio Grande do Sul e para Goiás. Porém, a partir deste ano, as áreas tradicionais de cultivo de arroz nos vales dos principais rios, além da baixada maranhense foram sendo substituídas pela pecuária bovina, passando a cultura do arroz a ocupar áreas marginais (PEREIRA, 2002).

Há 20 anos, a produção de arroz no Maranhão vem diminuindo a uma taxa de 2,7% ao ano (MENDEZ DEL VILLAR et al., 2001). Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra 2006/07, com a segunda maior área plantada do país, o Maranhão ocupa a quarta posição entre os maiores produtores de arroz do país, atrás do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso. A produtividade de arroz no Maranhão foi sempre considerada muito baixa, atualmente em torno de 1.390 kg ha⁻¹ (CONAB, 2008). A baixa produtividade é atribuída ao fato do arroz ser produzido por pequenos agricultores, cujas propriedades rurais, cerca de 85%, têm menos de 100 hectares. 52% da produção é oriunda de lavouras destas propriedades que têm como característica um forte auto-abastecimento e baixo emprego de tecnologia, utilizando técnicas rudimentares de cultivo, a chamada roça em toco, sem preparo do solo nem adubação (MENDEZ DEL VILLAR et al., 2001).

Os ecossistemas de cultivo de arroz no Brasil estão classificados em “de várzea” e “de terras altas”, os quais, se subdividem em: a) sistema irrigado por inundação; b) sistema com irrigação não controlada; c) sistema de várzea úmida; d) sistema de sequeiro tradicional; e, e) sistema de sequeiro sob irrigação suplementar por aspersão (GUIMARÃES e SANTANA, 1999). Dentre estes sistemas, o sistema irrigado por inundação, predominante nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, respondem por 60% da produção nacional, embora não seja o que ocupa a maior área plantada no país. Por outro lado, o sistema de sequeiro tradicional, caracterizado pela total dependência de água das chuvas, ocupa a maior área anualmente plantada com arroz no país, no entanto, tem menor expressão em termos de volume de produção (PEREIRA, 2002).

No Maranhão se encontram todos os sistemas de cultivo, no centro-norte predomina a roça no toco, sistema de sequeiro tradicional, que é praticado pela maioria dos pequenos produtores. Na microrregião baixada maranhense, também se encontra, em menor escala, o

cultivo do arroz em sistema irrigado, possuindo associações de produtores que utilizam mão-de-obra familiar e também médios produtores. Os custos de produção mais elevados são compensados pela maior produtividade e preço de comercialização mais alto. A colheita é mecanizada ou manual, dependendo da extensão da propriedade (MENDEZ DEL VILLAR et al., 2001).

Já no Sul do Maranhão, em algumas fazendas o sistema de produção se assemelha mais ao do Centro-Oeste do país. São extensas áreas plantadas, 80 a 3.500 ha, com uso intensivo de tecnologia e mecanização em todas as fases do cultivo e pós-colheita, tratores, implementos, colheitadeiras, secadores, variedades de maior aceitação pelo mercado e grande utilização de insumos. A produção atende ao mercado local e, também é vendida para outros estados (MENDEZ DEL VILLAR et al., 2001).

No Maranhão, as cultivares utilizadas variam segundo o tipo de cultivo. Os grandes produtores utilizam cultivares com grãos do tipo longo que as mesmas cultivares recomendadas para o Centro Oeste que tem melhor aceitação pelo mercado consumidor e adquirem suas sementes no Mato Grosso e Goiás. Esses genótipos não são obrigatoriamente adaptados às condições técnicas e nem às condições do mercado local, enquanto que os pequenos produtores geralmente utilizam as sementes produzidas na safra anterior.

Os pequenos produtores, que não utilizam mecanização, plantam variedades comuns da região que apresentam grãos redondos e curtos. Visando mudar o costume de reutilizar as sementes do ano anterior, o governo do estado tem comprado variedades testadas pela pesquisa dos estados de Mato Grosso e Goiás. No entanto, essas cultivares se mostraram inadequadas às condições de cultivo, pois necessitam de fertilizantes que não são usados pelos pequenos produtores o que resulta em rendimentos muito baixos. Além disso, as plantas de menor porte dificultam a colheita manual (MENDEZ DEL VILLAR et al., 2001). Em função do costume do agricultor de guardar sua própria semente, no estado do Maranhão se encontra o maior número de variedades tradicionais de arroz do Brasil. Essas variedades, conservadas pelo agricultor tradicional, geração após geração, representam um patrimônio genético de importância fundamental para o futuro do melhoramento da cultura do arroz (FONSECA et al., 1982).

1.3 Diversidade de Bactérias Diazotróficas Associadas às Plantas de Arroz

Uma diversa comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio tem sido isolada de plantas de arroz, principalmente, àquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (BALDANI e DOBEREINER, 1980; BALDANI et al., 1986, 2000; ENGELHARD et al., 2000). Outros gêneros bacterianos, embora menos comuns, têm sido constatados em associação com plantas de arroz tais como *Clostridium* (KENNEDY e TCHAN, 1992), *Azotobacter* (KAMUNGO et al., 1997), *Azoarcus*, *Klebsiella*, *Sphingomonas* e *Azorhizobium* (ENGELHARD et al., 2000), *Corynebacterium flavescens* e *Bacillus pumilus* (BACILIO-JIMÉNEZ et al., 2001), *Serratia marcescens* (GYANESHWAR et al., 2001) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (MUTHUKUMARASAMY et al., 2005).

As bactérias que colonizam plantas não leguminosas podem ser divididas em três grupos: bactérias de rizosfera e de vida livre, que inclui todos os microrganismos que colonizam as raízes superficialmente, tais como, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia* e *Paenebacillus*; bactérias associativas, capazes de colonizar as raízes externa e internamente que são as do gênero *Azospirillum*; e, bactérias endofíticas, que colonizam o interior dos tecidos das raízes e da parte aérea e que não causam prejuízo visível nas plantas que são, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus* e *Burkholderia* (BALDANI et al., 1997). Em geral a diversidade de bactérias encontrada na superfície e no interior das raízes de arroz é maior do que aquela do não rizosférico devido a uma variedade de compostos orgânicos

liberados pelas raízes que podem ser utilizados como fonte de energia e carbono (MUTHUKUMARASAMY et al., 2007).

Nos sistemas agrícolas, as bactérias de vida livre são limitadas pela disponibilidade de fontes de carbono no solo. MUTHUKUMARASAMY et al. (2007) observaram que a aplicação contínua de matéria orgânica em solo cultivado com arroz, aumenta a população de bactérias diazotróficas no solo, além de reduzir o efeito inibitório da aplicação de altas doses de nitrogênio no solo na população destas bactérias. Acredita-se que bactérias diazotróficas endofíticas por não sofrerem limitação de substâncias ricas em carbono, estarem livres de competição com outros microrganismos e poderem transferir mais eficientemente os compostos nitrogenados produzidos, possam ser responsáveis por disponibilizar uma quantidade significativa de nitrogênio fixado para a planta (BALDANI et al., 2002). A associação de bactérias endofíticas com arroz e não específica e a dentro dos tecidos vegetal é baixa (MALARVIZHI e LADHA, 1999). Dentre essas bactérias as mais estudadas para a cultura de arroz são *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp.

1.3.1 O gênero *Azospirillum*

Bactérias do gênero *Azospirillum* são heterotróficas capazes de fixar nitrogênio atmosférico. Dentre as bactérias diazotróficas as do gênero *Azospirillum* são as mais estudadas, as espécies desse gênero são do tipo bastonete móvel, aeróbicas heterotróficas que fixam nitrogênio em condições microaerófilas (KENNEDY et al., 2004). Nove espécies estão atualmente descritas: *Azospirillum largimobile*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum halopraeferans*, *Azospirillum irakense*, *Azospirillum doebereineriae*, *Azospirillum oryzae*, *Azospirillum melinis*, *Azospirillum canadense* (DÖBEREINER et al., 1995; XIE e YOKOTA, 2005; PENG et al., 2006; MEHNAZ et al., 2007). São usualmente consideradas rizosféricas, colonizando predominantemente a superfície das raízes, sendo que algumas estirpes são capazes de infectar e colonizar o interior dos tecidos de muitos cereais (BALDANI et al., 1997). A distribuição ecológica de *Azospirillum* spp. é ampla podendo ser encontrada colonizando plantas em todo o mundo, tanto em clima tropical quanto em clima temperado (PATRIQUIN et al., 1983).

Bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* apresentam motilidade e quimiotaxia para ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos e compostos aromáticos bem como para exudados de raízes, o que torna essas bactérias capazes de se mover para condições favoráveis de nutrientes na rizosfera da planta, onde se beneficiam dos exudados da planta como fonte de carbono e energia para multiplicação e colonização da planta (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Dentre as espécies de *Azospirillum*, *A. lipoferum*, e *A. brasilense* são as mais estudadas, e as que têm sido isoladas da raiz e da parte aérea de plantas de arroz (JAMES, 2000).

1.3.2 O gênero *Herbaspirillum*

Bactérias do gênero *Herbaspirillum* são bastonetes curvos, gram negativas, em forma de espiral, geralmente vibróides, algumas vezes helicoidais. Em placas de meio JNFB as colônias são inicialmente pequenas e brancas, tornando-se azulada no centro após uma semana de incubação. Membro da subdivisão β das Proteobactérias, estes organismos são aeróbios, não fermentam açúcares e fixam nitrogênio em condições microaerófilas e foram primeiramente isoladas de milho, arroz e sorgo (BALDANI et al., 1986). Posteriormente foram também isoladas de outras gramíneas (OLIVARES et al. 1996, JAMES, 2000) e de plantas não leguminosas, como abacaxizeiros e bananeiras (CRUZ et al., 2001). Bactérias do

gênero *Herbaspirillum* apresentam baixa capacidade de sobrevivência no solo, não podendo ser re-isoladas do solo após 30 dias, confirmando sua natureza endofítica, no entanto, podem permanecer no solo em um estado de latência, não podendo ser cultivadas em meio de cultura (OLIVARES et al., 1996). Este gênero possui nove espécies descritas, sendo que, apenas *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *H. frisingense* fixam nitrogênio em associação com plantas não leguminosas.

1.3.3 O gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* compreende mais de 50 espécies, sendo que poucas delas são capazes de fixar nitrogênio como *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia kururiensis*, *Burkholderia tuberum*, *Burkholderia phynatum*, *Burkholderia tropica*, *Burkholderia unamae*, *Burkholderia xenovorans*, *Burkholderia phytofirmans* e *Burkholderia terrae* (ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2001; VANDAMME et al., 2002; REIS JUNIOR et al., 2004). O gênero *Burkholderia* apresenta características endofíticas, apresenta ampla distribuição geográfica e coloniza diversas plantas como arroz, cana-de-açúcar, sorgo, milho, trigo. *B. vietnamiensis*, foi isolada da rizosfera de raízes de plantas de arroz cultivadas no Vietnã e é, provavelmente, a espécie predominante entre as espécies de *Burkholderia* em arroz. RODRIGUES et al. (2006) observaram maior número de bactérias diazotróficas endofíticas, do gênero *Burkholderia* do que do gênero *Herbaspirillum* isoladas de duas variedades de arroz, IR42 e IAC4440, sendo que a *B. vietnamiensis* foi a espécie predominante.

1.4 Colonização e Estabelecimento Endofítico de Bactérias Diazotróficas em Arroz

A infecção das raízes por bactérias diazotróficas é uma condição essencial para o estabelecimento de uma associação eficiente entre as bactérias e as plantas hospedeiras. Conhecimentos básicos em colonização das raízes pelos microrganismos são importantes para manipular a microflora da raiz com o objetivo de obter benefícios para a cultura, já que estes benefícios dependem de uma colonização efetiva, infecção e estabelecimento das bactérias nos tecidos das plantas e expressão de genes (JAMES et al., 2002; RONCATO-MACCARI et al., 2003b).

Bactérias diazotróficas têm a capacidade de infectar e colonizar plantas de arroz e se estabelecer nos espaços intercelulares do córtex, xilema e aerênquima (KENNEDY et al., 2004). A infecção e colonização das plantas é um processo dinâmico que envolve a movimentação das bactérias em direção a planta hospedeira, sua adesão à superfície das plantas e posterior penetração e multiplicação no seu interior (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

A movimentação dos microrganismos em direção às raízes ocorre quando existe um reconhecimento químico, quimiotaxia. Inicialmente ocorre uma adsorção reversível, e em seguida uma ancoramento irreversível, controlado por proteínas extracelulares de origem bacteriana. Esta etapa é comandada por sinais moleculares emitidos pelas raízes da planta hospedeira, e a sobrevivência do microrganismo depende de fatores bióticos e abióticos (DOBBELAERE et al., 2003).

Progressos consideráveis foram alcançados nos últimos anos, no sentido de determinar como as bactérias diazotróficas invadem os tecidos das plantas. Porém, os exatos mecanismos como estas bactérias interagem com as plantas ainda não são completamente entendidos, pois bactérias diazotróficas não simbióticas apresentam uma grande diversidade genética, o que reflete em uma larga gama de habitats onde elas podem ser encontradas. Além disso, apresentam mecanismos específicos de interação com as plantas, o que limita o conhecimento destas interações principalmente em função da dificuldade em estudar um grande número de

estirpes interagindo com diversos genótipos de plantas (JAMES, 2000; KENNEDY et al., 2004). Os possíveis sítios de infecção por bactérias diazotróficas em plantas de arroz são por meio de feridas na epiderme devido a abração com o solo durante o crescimento radicular, por fissuras causadas durante a emergência das raízes laterais, entre os pelos radiculares e as células da epiderme e processos enzimáticos envolvendo degradação das paredes celulares (BALDANI, 1996; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; BACILIO-JIMÉNEZ et al., 2001).

1.4.1 Colonização por *Azospirillum* spp.

O processo de colonização inicia-se pelo ancoramento das bactérias a superfície das plantas por meio de um material fibrilar. Os sítios primários de colonização são os pontos de emergência das raízes laterais e a zona de formação de pelos radiculares (BACILIO-JIMÉNEZ et al., 2001), ocorrendo a formação de pequenos agregados de células bacterianas na superfície destes pontos.

Azospirillum spp. tem sido considerada uma bactéria que coloniza principalmente a rizosfera (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). No entanto, pode colonizar os espaços intercelulares das células da epiderme e do córtex radicular, parênquima, aerênquima, o sistema vascular e interior dos pêlos radiculares (ZHU et al., 2002; FENG et al., 2004). A colonização de plantas por *Azospirillum* é um processo dependente da estirpe e da planta hospedeira (BACILIO-JIMÉNEZ et al., 2001; MOSTAJERAN et al., 2007). Utilizando a fusão de genes que codificam proteína verde fluorescente (gfp) para visualizar a colonização de raízes de arroz por *A. irakense* e *A. brasilense*, ZHU et al. (2002) observaram que estas duas espécies diferem quanto a modo de colonização de raízes de arroz, durante os primeiros estágios da associação planta bactéria, a colonização por *A. irakense* é muito mais rápida do que por *A. brasilense*. Em trigo, foi constatado que a Sp7 de *A. brasilense*, fica restrita à superfície das raízes enquanto que a estirpe Sp245 coloniza o interior das raízes (ROTHBALLER et al., 2003).

MOSTAJERAN et al. (2007) observaram que a parede celular exerce uma função importante na interação da planta com a bactéria e que o processo de infecção e colonização de plantas de trigo por *A. brasilense* pode envolver enzimas que degradam polímeros da parede celular. Após a infecção e colonização das raízes de arroz, *A. brasilense* migram para a bainha das folhas e para as folhas, provavelmente pelo espaço intercelular e pelo sistema vascular de modo simultâneo conforme relatado por FENG et al. (2004).

1.4.2 Colonização por *Herbaspirillum* spp.

A colonização de plantas de arroz por *Herbaspirillum* spp. ocorre através da adesão da bactéria à superfície da planta, seguida de proliferação nos pontos de emergência das raízes secundárias e ferimentos na superfície da raiz causados devido a abração com o solo durante o crescimento radicular. Uma vez no interior da planta, os microrganismos colonizam inicialmente as células da epiderme onde as bactérias se multiplicam e entram pelos espaços intercelulares colonizando a raiz e os tecidos da parte aérea (BALDANI et al., 1997; RONCATO-MACCARI et al., 2003b). Quanto ao estabelecimento endofítico, estas bactérias se localizam principalmente nos espaços intercelulares, nas células mortas, nas vesículas do xilema e no aerênquima (JAMES et al., 2002).

BALDANI (1996) utilizando as técnicas de microscopia ótica e eletrônica observou *Herbaspirillum* spp. colonizando os espaços intercelulares das raízes de arroz, localizando-se principalmente nos espaços intercelulares da camada de células, imediatamente abaixo da epiderme e raramente presente no interior das células do córtex. Já ELBELTAGY et al.

(2001) observaram que esta bactéria não coloniza a raiz e, sim a parte aérea da planta hospedeira, colonizando preferencialmente o apoplasto dos tecidos da parte aérea das plantas e não entra nos tecidos vasculares. Segundo RONCATO-MACCARI et al. (2003b) a colonização de plantas de arroz por *H. seropedicae* ocorre em três estágios. No primeiro, as bactérias colonizam a superfície das raízes, o segundo caracteriza-se pela infecção do tecido cortical e o terceiro pela colonização do tecido vascular. No entanto, a habilidade de infectar e colonizar plantas de arroz não é um processo universal para todas as estirpes de *Herbaspirillum* spp., depende da estirpe e do genótipo da planta (JAMES et al., 2002).

JAMES et al. (2002) estudando a infecção e colonização de duas variedades de arroz, IR42 e IR72, com *H. seropedicae* estirpe ZAE67, observaram que esta bactéria se multiplica na zona de emergência das raízes laterais e depois se movem para os tecidos mais internos, colonizando rapidamente o espaço intercelular, aerênquima e xilema da raiz e da parte aérea das duas cultivares. *Herbaspirillum* coloniza tecidos jovens, antes da diferenciação, sugerindo que esta bactéria aparece na parte aérea das plantas pelo espaço intercelular e que a motilidade e a produção de pectinases e celulases poderá estar envolvida neste processo de distribuição das bactérias pelos tecidos da planta (ELBELTAGY et al., 2001). Não há diferença entre as estirpes as Nif^+ e Nif^- de *H. seropedicae* quanto à habilidade de infecção e colonização de plântulas de arroz, havendo similaridade no tamanho da população das duas estirpes nos tecidos da planta, indicando que a colonização não é essencial para a fixação biológica de nitrogênio (RONCATO-MACCARI et al., 2003a).

1.4.3 Colonização por *Burkholderia* spp.

A distribuição ecológica deste gênero tem sido muito estudada. No entanto, poucos estudos foram realizados no sentido de entender o processo de infecção e colonização de plantas por estas bactérias. Resultados preliminares indicam que o processo de infecção e colonização das plantas de arroz por estirpes de *Burkholderia* ocorre primeiramente pela colonização da superfície da raiz e em seguida entra nas células pelos espaços intercelulares através de fendas na epiderme, particularmente nas pontas de emergência de raiz secundária (BALDANI et al. 1997). A estirpe M209 de *B. brasilensis* também infecta os estômatos dos folíolos de plântulas de arroz (SILVA et al., 2000).

1.4.4 Colonização por *Azoarcus* spp.

Até recentemente, as bactérias do gênero *Azoarcus* tinham sido isoladas somente das raízes e base do colmo da espécie *Kallar grass* (*Leptochloa fusca*) em solos salinos no Paquistão (REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998). Entretanto, estudos em condições gnotobióticas, mostraram que esta bactéria coloniza também plantas de arroz (HUREK et al., 1994; REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998). *Azoarcus* spp. expressa dois tipos de enzimas celulolíticas (exo e endo glucanase) e estas enzimas podem estar envolvidas no processo de infecção e colonização em raízes de *K. grass* (REINHOLD-HUREK et al., 1993).

A infecção em *K. grass* e arroz ocorre pela ponta das raízes e nos pontos de emergência das raízes laterais, entrando no xilema. Este processo de infecção é provavelmente um processo ativo que envolve atividade de enzimas que degradam os polímeros da parede celular, sendo que, dois tipos de enzimas celulolíticas foram detectadas em *Azoarcus* (REINHOLD-HUREK et al., 1993). Quanto ao estabelecimento endofítico, esta bactéria se localiza principalmente no parênquima e nas vesículas do xilema (HUREK e REINHOLD-HUREK, 2003). A descoberta de *Azoarcus* spp. em células do parênquima e vesículas do xilema, em *K. grass* e arroz, sugere que a dispersão desta bactéria no interior das plantas ocorre provavelmente pelo sistema vascular (HUREK et al., 1994).

1.4.5 Colonização por *Rizobium* spp.

Foi observado que *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* desenvolve uma associação natural com plantas de arroz em campos de produção deste cereal no delta do Nilo no Egito. No Oeste da África, *Bradyrhizobium* spp. tem sido encontrado colonizando plantas de arroz irrigado (CHARENTREUIL et al., 2000) e *Azorhizobium caulinodans* também foi isolado de raízes de arroz (ENGELHARD et al., 2000). SINGH et al. (2006) mostraram que estirpes de rizóbio infectam e colonizam os espaços intercelulares de raiz de arroz usando uma fusão *gusA* como gene repórter. A infecção das raízes de arroz ocorre por ferimentos na raiz e por fissuras criadas durante a emergência de raízes laterais, é independente de fatores Nod, não específica, embora exista diferença na interação entre as estirpes com as plantas, e não envolve a formação do cordão de infecção (REDDY et al., 1997). Também, WALKER et al. (2007) observaram que estirpes de *Rhizobium* spp. infectam raízes de arroz via pêlos radiculares, zona de emergência das raízes laterais e colonizam extensamente raízes.

1.5 Fixação Biológica de Nitrogênio Atmosférico (FBN) em Arroz

Diversos trabalhos têm mostrado que a cultura do arroz pode se beneficiar da associação com bactérias diazotróficas, obtendo significativa contribuição do nitrogênio fixado biologicamente (SHRESTHA e LADHA, 1996; BALDANI et al., 2000). No entanto, para JAMES (2000) é impossível dizer com certeza se os efeitos observados com a inoculação de uma bactéria diazotrófica em arroz são devido à fixação ou a outro fator. Como efeitos hormonais, aumentando a capacidade da planta de extrair N do solo em função do aumento do sistema radicular, e/ou em função de alteração no metabolismo da planta pela atividade da enzima nitrato redutase da bactéria.

RONCATO-MACCARI et al. (2003a) estudando a contribuição da fixação de nitrogênio para o crescimento de plântulas de arroz, 30 dias após a inoculação com *H. seropedicae* com estirpes Nif^+ e Nif^- , observaram aumento similar na produção de biomassa da parte aérea e da raiz das plântulas inoculadas com ambas as estirpes. Assim, os autores sugeriram que os efeitos observados com a inoculação de bactérias diazotróficas no crescimento de plantas podem ser parcialmente independentes da fixação biológica de nitrogênio (FBN), envolvendo outros fatores de promoção de crescimento de plantas.

Os exatos mecanismos envolvidos na promoção do crescimento de plantas não são bem conhecidos. No entanto, acredita-se que em sistemas naturais podem ocorrer tanto mecanismos de ação direta quanto indireta. Como exemplo dos primeiros, pode-se citar a FBN, produção de substâncias promotoras do crescimento de plantas e solubilização de fosfatos. Já para os de ação indireta tem sido sugerido a indução de resistência sistêmica, produção de sideróforos, diminuição de fatores de estresse e antagonismo a fitopatógenos seja por competição por nutrientes ou exclusão por nicho ecológico quando estes microorganismo possuem mecanismos comuns para infecção dos tecidos vegetais (CHEN et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2003).

1.6 Fatores que Influenciam a Fixação Biológica de Nitrogênio na Cultura do Arroz

Nos ecossistemas naturais ocorrem diversas bactérias fixadoras de nitrogênio (N_2), desde as de vida livre no solo, àquelas de rizosfera, como também as consideradas bactérias endofíticas, que colonizam o interior dos tecidos das plantas, em associação com uma vasta gama de plantas não leguminosas (BALDANI e BALDANI, 2005). Dentre estas, acredita-se que as bactérias endofíticas possuam maior potencial para a FBN devido a habilidade de se localizarem em espaços inter e intra-celulares, ocupando nichos onde há menor influência de

fatores ambientais, menor competição com outros microrganismos por compostos orgânicos e com baixa difusão de oxigênio (BALDANI et al., 1997). O incremento na produção de grãos, devido à fixação biológica de nitrogênio em arroz, é sensível a fatores químicos, biológicos e ambientais, ou seja, é dependente de uma interação complexa entre as plantas, os microrganismos e o ecossistema (RAO et al., 1998). Assim o conhecimento do genótipo da planta e do microrganismo envolvido na promoção de crescimento vegetal é de extrema importância, além da interação com a comunidade microbiana do solo.

Em arroz, é comum se observar diferença na FBN entre os genótipos avaliados (SHRESTHA e LADHA, 1996; BALDANI et al., 2000), sugerindo que a associação entre as plantas e as bactérias fixadoras é controlada pelas plantas. Também, RETHATI et al. (2000) estudando a associação de cultivares de arroz com *A. brasilense* e *H. seropedicae* observaram que a inoculação de ambas as bactérias aumentou a massa das raízes das plantas e que este efeito benéfico é altamente dependente da cultivar. MEHNAZ et al. (2001) quantificando a fixação biológica de nitrogênio por meio da técnica de diluição isotópica do ¹⁵N em duas variedades de arroz inoculadas com diferentes estirpes de duas espécies de bactérias, observaram que houve interação entre as variedades e as bactérias inoculadas.

A forma de inoculação de bactérias diazotróficas em arroz pode influenciar os resultados obtidos, no entanto, poucos trabalhos têm sido realizados no sentido de aprimorar o processo de inoculação. Inoculação é a uma técnica que consiste em colocar as sementes ou as plântulas em contato com as bactérias e inoculante é o veículo que contém estas bactérias. O veículo mais utilizado é a turfa, mas inoculante líquido também tem sido estudado principalmente para inoculação em plântulas.

Segundo ISLAM e BORA (1998) *Azospirillum* pode ser inoculado por três métodos: a) imersão das sementes em suspensão bacteriana por alguns minutos, seguida por secagem à sombra por duas a quatro horas; b) mergulhar as raízes de plântulas de arroz em suspensão bacteriana por alguns minutos antes do transplante e c) aplicar a suspensão bacteriana na rizosfera das plantas. O envolvimento das sementes com turfa também é uma forma de inoculação utilizada para bactérias diazotróficas em arroz (FEREIRA et al., 2003, GUIMARÃES et al., 2003).

FEREIRA et al. (2003), selecionando veículos para preparo de inoculante com bactérias diazotróficas, observaram que o caldo bacteriano mantém por pouco tempo a sobrevivência das células, o inoculante oleoso dificulta a germinação das sementes, sendo que o mais promissor é a turfa. Outras formas de inoculação utilizadas são a inoculação de plântula em meio de cultura (BALDANI et al. 2000, RONCATO-MACCARI et al., 2003a).

A forma de infecção e colonização das plantas pelas bactérias diazotróficas também influencia os benefícios que a planta pode ter desta associação. Quando a infecção ocorre de forma mais agressiva, estimula uma resposta de defesa da planta a esta invasão, tendo reflexos negativos no crescimento das plantas. JAMES et al. (2002) estudando a infecção e colonização de duas variedades de arroz com *H. seropedicae* estirpe ZAE67, observaram que esta bactéria entra por ferimentos na zona de emergência das raízes laterais e coloniza rapidamente o espaço intercelular. Os autores observaram diferença no grau de infecção. Na cultivar IR72 o processo de invasão envolveu um grande número de bactérias colonizando a zona de emergência das raízes secundárias, já na cultivar IR42 a invasão foi menos agressiva. A colonização agressiva, na cultivar IR72 provocou uma resposta defensiva da planta.

STOLTZFUS et al. (1997) observaram que entre isolados endofíticos, inoculados em plantas de arroz, certos isolados se apresentaram colonizando as plantas de forma mais agressiva, sendo que, esta colonização agressiva teve como consequência o retardamento do crescimento das plantas. Também RETHATI et al. (2000), observaram em cultivares de arroz, inoculadas com *A. brasilense* e *H. seropedicae* que o efeito benéfico da inoculação com estas bactérias estava associado a um número pequeno de bactérias nos tecidos das plantas. Embora

uma alta colonização de *A. brasilense* tenha sido bem tolerada pelas plantas, uma invasão drástica de *H. seropedicae* provocou efeito adverso no crescimento das plantas.

A diferença entre os genótipos em relação ao nitrogênio derivado da fixação biológica pode ser mais evidente em condições de baixo teor de nitrogênio no solo. PRADHAN e MOHAN (1998), observaram que inoculação de plantas de arroz com *A. brasilense*, quando se utilizou metade da dose recomendada de nitrogênio para essa cultura, proporcionou aumento no vigor das plantas, avaliado aos 30 e 60 dias após a semeadura, assim como, aumento na produção de matéria seca e na produção de grãos. NIEUWENHOVE et al. (2001), estudaram o efeito da inoculação de plantas de arroz com *A. caulinodans*, em combinação com diferentes níveis de sacarose e nitrogênio, em condições de casa de vegetação. Os autores observaram, pela técnica de diluição isotópica de ^{15}N , que houve incorporação de N fixado à biomassa das plantas inoculadas com *A. caulinodans*, reduzindo-se o nitrogênio derivado do fertilizante, em condições de baixo nível de nitrogênio (20 kg ha^{-1}) e que, nesta condição, a perda de nitrogênio foi menor que em condições de alto nível de nitrogênio (60 kg ha^{-1}). Os autores concluíram que a aplicação de 60 kg ha^{-1} de nitrogênio afeta negativamente a atividade da nitrogenase de *A. caulinodans* em associação com plantas de arroz.

A eficiência da fixação de N_2 pela associação de bactérias diazotróficas com arroz pode ser limitada quando há baixa disponibilidade de matéria orgânica no solo, pois a matéria orgânica pode ser fonte de carbono e energia tanto para fixação de N pela microflora de rizosfera quanto para outras atividades metabólicas. Estes efeitos são mais pronunciados em solos inundados que em solos não inundados. LADHA et al. (1987) observaram que a aplicação de palha de arroz antes do plantio aumentou a massa microbiana do solo e, também, a de bactérias diazotróficas no solo. Já a aplicação de 50% da dose recomendada de nitrogênio na forma de vermicomposto e 50% na forma de fertilizante mais a inoculação com *Azospirillum* e fosfobactérias, aumentou o número de perfilhos, o número de panículas e a produção em arroz comparado com aplicação de 100% da dose recomendada de nitrogênio na forma de fertilizante mineral (JEYABAL e KUPPUSWAMY, 2001; MUTHUKUMARASAMY et al., 2007).

O arroz é cultivado sob dois sistemas de cultivo: de sequeiro e irrigado, sendo que diferentes sistemas de cultivos têm potenciais distintos para suprir a necessidade de nitrogênio das plantas. Em arroz de sequeiro, a fixação ocorre em bactérias aeróbicas, já em arroz irrigado, a fixação ocorre tanto em bactérias aeróbicas quanto anaeróbicas e em geral maiores contribuições de FBN são obtidas em arroz irrigado, onde as condições ecológicas favoráveis à biota aquática favorecem também os microrganismos fixadores de nitrogênio de vida livre (OLIVEIRA, 1992).

1.7 Avaliação da Fixação Biológica de Nitrogênio

A quantificação de nitrogênio fixado biologicamente em gramíneas é fundamental para que se possa determinar o benefício global deste processo para os sistemas agrícolas. No entanto, os resultados, são muito variáveis em função de diferenças metodológicas, e da dependência do genótipo da planta e das condições ambientais em que são realizados, (JAMES, 2000). Além disso, a correlação dos resultados obtidos com a população de bactérias é limitada, pois é impossível se atribuir à fixação biológica a uma única espécie de bactéria e, ainda, a simples presença da bactéria colonizando os tecidos da planta não significa que esta esteja fixando nitrogênio e, nem que a planta esteja se beneficiando do nitrogênio fixado (BODDEY et al., 1995).

A inconsistência dos resultados dos experimentos, tanto em condições gnotobióticas, quanto em casa de vegetação e em campo, é um grande problema para pesquisa com bactérias diazotróficas e tem limitado o uso destas bactérias. O método de inoculação e as interações

entre o genótipo vegetal e da bactéria pode contribuir para o insucesso dos resultados. REIS JUNIOR et al. (2006) observaram que a interação entre *A. amazonense* e genótipos de braquiária é dependente da estirpe. Para se obter sucesso com a inoculação é necessário que a bactéria inoculada se estabeleça nas plantas e que não perca a capacidade competitiva em relação à comunidade nativa. Baixo pH, déficit hídrico e alta temperatura diminuem a colonização influenciando os resultados (DOBBELAERE et al., 2003). SALA et al. (2007) observaram efeito da inoculação de sementes de trigo com bactérias diazotróficas em Campinas, mas não em Mococa, SP, trabalhando com as mesmas estirpes e cultivar. Na Tabela 1 apresenta-se, resumidos, os resultados de trabalhos de inoculação com bactérias diazotróficas em plantas de arroz realizados nos últimos anos.

Tabela 1. Resposta de plantas de arroz à inoculação com bactérias diazotróficas em várias condições experimentais (continua).

Espécies de bactérias	Condições experimentais	Efeito observado	Referência
<i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azospirillum amazonense</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Campo	Não houve efeito no crescimento nem na produção de grãos	PEREIRA et al. (1988)
<i>Pseudomonas fluorescences</i>	Campo e em casa de vegetação	Aumento na emergência das plântulas, comprimento das raízes e altura e biomassa das plantas e na produção de grãos.	DILEEP et al. (1998)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Campo e casa de vegetação	Aumento no vigor, na produção de biomassa, e produção de grãos.	PRADHAN e MOHAN (1998)
<i>Azospirillum</i> spp.	Casa de vegetação, inundado, por 45 dias	Aumento na biomassa das raízes e da parte aérea e na extração de N	GUNARTO et al. (1999)
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Vasos	Aumento na biomassa, o número de perfilhos e produção de grãos.	ELBADRY et al. (1999)
<i>Nostoc muscorum</i> e <i>Tolypothrix tenuis</i>	Casa de vegetação por 25 dias	Aumento na biomassa, das raízes e no comprimento das plantas.	MULÉ et al. (1999)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Casa de vegetação	Aumento na altura das plantas avaliadas até a fase de iniciação das panículas, aumento na biomassa da parte aérea e na produção de grãos.	VALAZCO e CASTRO (1999)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> e <i>Burkholderia</i>	Casa de vegetação e em condições gnotobióticas	Aumento na biomassa e no nitrogênio derivado da fixação biológica (Ndfa)	BALDANI et al. (2000)
<i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Casa de vegetação por 28 dias	A inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> aumentou a biomassa das raízes e da parte aérea das plantas, já com <i>Herbaspirillum seropedicae</i> o efeito foi negativo	RETHATI et al. (2000)
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Condições de casa	A inoculação aumentou a biomassa das plantas, o número de perfilhos e a incorporação de N ₂ fixado na biomassa, avaliado pela técnica de diluição isotópica do ¹⁵ N	NIEUWENHOVE et al. (2001)

Tabela 1. Continuação

<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Condições gnotobióticas	Aumento na atividade da nitrogenase incorporação Ndfa após incubação com $^{15}\text{N}_2$ em plantas de <i>Oryza officinalis</i>	ELBELTAGY et al. (2001)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Condições gnotobióticas em solução de Hongland, por 15 dias	Inibição do crescimento das plantas, diminuindo a altura das plantas	BACILIO-JIMÉNEZ et al. (2001)
Espécies de bactérias	Condições experimentais	Efeito observado	Referência
<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Aeromonas</i> e <i>Enterobacter</i>	Condições gnotobióticas, por oito semanas	Todas as bactérias promoveram aumento a área das raízes e o Ndfa avaliado pela técnica isotópica ^{15}N	MEHNAZ et al. (2001)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Condições gnotobióticas	Aumento na atividade da nitrogenase aos 10 dias após a inoculação e da massa seca das cultivares IR42 e IR72 e somente a cultivar IR42 apresentou incorporação significativa de Ndfa após incubação com $^{15}\text{N}_2$	JAMES et al. (2002)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Condições gnotobióticas por 30 dias	Aumento na biomassa, na atividade da nitrogenase e na incorporação de $^{15}\text{N}_2$	GYANESHWAR et al. (2001)
<i>Azospirillum</i> sp. e <i>Azotobacter</i>	Casa de vegetação e campo	A inoculação com ambas as bactérias aumentou a atividade da nitrogenase (ARA) nas raízes das plantas inoculadas	DAS e SAHA (2003)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Condições gnotobióticas	Aumento na massa das raízes quando houve limitação de nitrogênio	RONCATO-MACCARI et al. (2003a)
<i>Burkholderia brasilensis</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Condições gnotobióticas, em casa de vegetação e campo	Em condições gnotobióticas, houve aumento na biomassa da variedade IAC 4440 e em condições de campo houve aumento na produção de grãos das duas variedades testadas	FERREIRA et al. (2003)
<i>Burkholderia brasilensis</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	Casa de vegetação e campo	Em casa de vegetação houve aumento na biomassa das plantas na avaliação realizada aos 40 dias após o transplantio. Já em campo houve aumento na biomassa das plantas aos 40, 45 e 130 dias após transplantio, e também houve aumento na produção de grãos	GUIMARÃES et al. (2003)
<i>Azospirillum amazonense</i>	Condições gnotobióticas e casa de vegetação	Em condições gnotobióticas houve efeito negativo, diminuindo a biomassa das plântulas, em casa de vegetação houve efeito positivo e negativo dependendo da estirpe inoculada	RODRIGUES et al. (2007)

2 CAPÍTULO I

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NATIVAS DO ESTADO DO MARANHÃO

2.1 Resumo

Com o aumento dos custos dos fertilizantes nitrogenados e a crescente preocupação com danos ambientais decorrentes do uso dos mesmos, o desenvolvimento de associações entre bactérias diazotróficas e genótipos de arroz mais eficientes quanto à fixação biológica de nitrogênio (FBN) pode ser uma alternativa para a redução de custos de produção e de impactos ambientais causados por esta cultura. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias diazotróficas nativas do estado do Maranhão com potencial para inoculação em variedades tradicionais de arroz da própria região. Foram coletadas amostras em três solos cultivados com arroz no Maranhão, sendo dois de baixada e um de terras altas. Para o isolamento destas bactérias diazotróficas foram utilizadas três variedades de arroz e a cultivar IR42 como “plantas isca”. As sementes de cada variedade foram plantadas em vasos com solo e após 45 dias foram coletadas. As bactérias obtidas de cada amostra foram caracterizadas morfológicamente e a sua capacidade fixar nitrogênio foi determinada pela atividade da nitrogenase por meio do método da redução do acetileno (ARA) e a produção de ácido indol-acético (AIA) pelo método colorimétrico. De acordo com a caracterização morfológica, os isolados foram classificados como pertencentes às espécies *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp. e um grupo desconhecido. A técnica da ARA mostrou que os isolados apresentaram capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Isolados de *A. amazonense* produziram maior quantidade de AIA quando comparados com os isolados de outras espécies. No caso dos isolados de *Burkholderia* spp., poucos produziram AIA e em pequena quantidade. Foram encontrados isolados bacterianos muito eficientes na produção de ácido indol-acético e fixação de N₂, sugerindo portanto potencial para promover o crescimento vegetal quando inoculado em arroz. O perfil de fragmentos de restrição gerados pela técnica de ARDRA, confirmou o gênero da maioria dos isolados, além disso mostrou alta diversidade, principalmente para os isolados bacterianos caracterizados morfológicamente como *Burkholderia* spp.

2.2 Abstract

The increased costs of nitrogen fertilisers and concerning of the human being with the current environmental damages caused by the excess of nitrogen application, opened new opportunity for the exploiting the associations between diazotrophs bacteria and genotypes of rice more efficient with respect to the biological nitrogen fixation (BNF). The aim of this study was isolate and characterise native diazotrophic bacteria from soil of the Maranhão State with potential for inoculation in traditional varieties of rice. Samples were collected from three soils cultivated with rice in Maranhão, being two of highland and one of lowland area. It two traditional cultivars of rice (Zebu Branco and Manteiga) and two comercial varieties (IR42 and Diamante) were used for isolation of these diazotrophic bacteria. The seeds of each variety or cultivar were planted in pots with soil and collected 45 days later. The obtained bacteria of each sample were morphological characterised and nitrogenase activity was determined by the acetylene reduction technique (ARA) and the auxin production by the colorimeter method. In agreement with the morphological characterisation, the isolates were classified as *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum* spp. and *Burkholderia* spp. The ARA showed that most of the isolated presented the ability to fix nitrogen. Isolates of *A. amazonense* produced larger amount of AIA as compared with the other species. In contrast, few isolates of *Burkholderia* spp. produced AIA and in small amounts. It was found bacterial isolates very efficient in the indol-acetic acid production and capability to reduce acetylene the ethylene, therefore with potential to be used as biofertilizers in rice plants. Restriction fragment profiles generated by the ARDRA technique confirmed the identity of most of the isolates and showed high diversity mainly for t bacterial isolates morphologically characterized as *Burkholderia*.

2.3 Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento de grande importância para população mundial, sendo o segundo cereal mais consumido no mundo, atendendo a grande parte da necessidade proteica e calórica da população mundial (DE DATTA et al., 1987). O estado do Maranhão é um grande produtor e consumidor de arroz no Brasil, sendo o quarto em produção e o terceiro em área plantada do País, no entanto, ocupa a 22^a posição entre as unidades da federação em termos de produtividade (CONAB, 2008), em decorrência do baixo nível de tecnologia empregado.

Um dos fatores que pode limitar a produção de arroz é a baixa disponibilidade de nitrogênio nos solos, principalmente nos trópicos, que apresentam solos altamente intemperizados e, geralmente, com baixo teor de matéria orgânica (DOBEREINER, 1997).

Embora o nitrogênio seja um elemento presente, abundante, na sua forma estável na atmosfera, para a fixação industrial do N₂, a quebra da tripla ligação requer grande quantidade de energia proveniente do petróleo ou gás natural, fontes de energia não renováveis (STOLTZFUS et al., 1997), tornando estes produtos custosos tanto do ponto de vista econômico como ecológico. Assim, a aplicação de fertilizantes nitrogenados aumenta o custo de produção e, além disso, causa impactos negativos ao meio ambiente como contaminação da água pelo nitrato e emissão de gases de efeito estufa como o óxido nitroso e gás amoníaco (STOLTZFUS et al., 1997).

As gramíneas são capazes de se associar com diversas bactérias que realizam o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico, como as pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* (TRAN VAN et al., 2000; LADHA e REDDY, 2003; KENNEDY et al., 2004). A procura por bactérias diazotróficas, capazes de converter nitrogênio gasoso em amônia, disponível para as plantas levou ao isolamento de várias bactérias (DOBBELAERE et al., 2003).

O desenvolvimento de meios de cultura semi-sólidos sem N possibilitou o isolamento destas bactérias em diversas culturas no decorrer dos anos (BALDANI e BALDANI, 2005). O uso destes meios oferece uma condição ideal para o crescimento de diazotróficos com caráter microaerofílico, que ocupam sítios onde a concentração de O₂ é limitada. As recentes pesquisas com bactérias diazotróficas têm mostrado que a cultura do arroz pode se beneficiar da associação com bactérias diazotróficas, obtendo significativa contribuição do nitrogênio fixado biologicamente ou por meio de substâncias promotoras de crescimento (GYANESHWAR et al., 2001; DOBBELAERE et al., 2003; RODRIGUES et al., 2007; GOVINDARAJAN et al., 2008).

Em experimentos de inoculação, em casa de vegetação, com a variedade de arroz Guarani, foi observado aumento de 22% na massa seca, 19% na produção de grãos das plantas inoculadas com a estirpe ZAE94, 27% na massa seca e de até 20% na produção de grãos para as plantas inoculadas com a estirpe M130. Além disso, foi observado um aumento do conteúdo de nitrogênio da planta, induzido pela fixação de nitrogênio realizada por *Herbaspirillum seropedicae* variando entre 17 e 19% do N incorporado à planta (BALDANI et al., 2000).

No entanto, o sucesso do sistema de fixação de nitrogênio em arroz, quanto ao aumento de produção, é dependente de uma interação complexa entre as plantas, os microrganismos e o ecossistema (RAO et al., 1998), sendo importante considerar em estudos de inoculação e quantificação da FBN fatores como ambiente, estirpes e genótipos (BALDANI et al., 1999). STOLTZFUS et al. (1997) isolando bactérias endofíticas de raízes e dos tecidos da parte aérea de diversas variedades de arroz crescidas em diferentes tipos de solo, observaram uma grande diversidade e um grupo destes isolados mostraram-se

cosmopolitas podendo ser isolados de diversos tipos de solos e colonizar um número grande de genótipos.

Variedades tradicionais de arroz podem abrigar populações de bactérias endofíticas diferentes das observadas em variedades modernas. ELBELTAGY et al. (2001) observaram mais bactérias endofíticas em arroz selvagem, *Oryza officinalis* e *Oryza rufipogon*, do que em cultivares modernas de *O. sativa*. No entanto, ENGELHARD et al. (2000) observaram que a diversidade de bactérias endofíticas culturáveis em arroz selvagem foi significativamente menor do que em cultivares de *O. sativa*. Os autores sugeriram que os genótipos ou as condições ecológicas possuem influência crucial na população de bactérias endofíticas.

No Maranhão se encontra o maior número de variedades locais de arroz do país. Estes genótipos são menos dependentes de fertilizantes nitrogenados e é possível que exerçam efeito seletivo sobre a população de bactérias diazotróficas, podendo abrigar bactérias diazotróficas com potencial para promover um aumento na produção de grãos sem aumentar os problemas ambientais decorrentes do uso de adubos nitrogenados. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias diazotróficas nativas do estado do Maranhão com potencial para inoculação em variedades tradicionais de arroz cultivadas neste estado.

2.4 Material e Métodos

2.4.1 Isolamento e contagem de bactérias diazotróficas

O isolamento de bactérias diazotróficas foi realizado em dois períodos. No primeiro se utilizou a variedade IR42 crescida por 45 dias, em três amostras de solo provenientes de três municípios do estado do Maranhão: Arari, Bacabal e Vitória do Mearim. No segundo, utilizou-se como “plantas isca”, as variedades Diamante, Zebu Branco e Manteiga, crescidas por 45 dias, em amostras de solo proveniente dos mesmos locais do isolamento anterior.

O isolamento das bactérias diazotróficas foi feito de acordo com a metodologia descrita por DOBEREINER et al. (1995), utilizando-se diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-7} de amostras de raízes, colmos e folhas das plantas. Foram empregados meios de cultura semi-sólidos semi-seletivos, sem adição de nitrogênio: LGIP para o isolamento de *Gluconacetobacter* spp., LGI para *Azospirillum amazonense*, NFB para *Azospirillum* spp., JNFB para *Herbaspirillum* spp. (DOBEREINER et al., 1995) e JMV para *Burkholderia* spp. (BALDANI, 1996).

Para o isolamento a partir das amostras de planta, foram retiradas amostras de 1 g de matéria fresca da parte aérea e da raiz. As raízes foram lavadas em água corrente e posteriormente lavadas em água destilada estéril e a da parte aérea lavada com álcool (70%) e água estéril. As amostras foram maceradas em 9 ml de solução salina (1/4 dos sais do meio NFB) e diluídas serialmente. De cada diluição foram retiradas alíquotas de 0,1 ml e inoculadas em frascos tipo penicilina contendo meio semi-sólido. Os frascos foram incubados a 30°C, de cinco a sete dias, após este período o crescimento bacteriano foi avaliado verificando-se o aparecimento de película características para cada bactéria alvo.

Os frascos com crescimento positivo nas duas últimas diluições, de cada um dos meios, foram utilizados para o isolamento, efetuando-se a repicagem das bactérias para um novo meio semi-sólido. Após a incubação por 48 horas foi feita a riscagem em placas com meio sólido, o mesmo do semi-sólido, acrescido de extrato de levedura. As colônias formadas nos meios sólidos foram repicadas para novo meio semi-sólido e, após a incubação por 48 horas, foram riscadas em meio rico, Batata ou Batata-P, para purificação final (DOBEREINER et al., 1995). As culturas puras foram preservadas em meio sólido inclinado com óleo mineral e em água.

2.4.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica e a motilidade celular foram determinadas durante o período de isolamento e após a purificação por meio de microscopia ótica com contraste de fase. A morfologia das colônias foi observada por meio do crescimento dos isolados em meios sólidos, semi-específicos (LGIP, LGI, NFB, JNFB e JMV) e em meio rico (batata), onde se observou as características morfológicas das colônias como forma, bordas, coloração e textura (DÖBEREINER et al., 1995).

2.4.3 Caracterização molecular

A extração do DNA dos isolados bacterianos para posterior amplificação foi realizada pelo método CTAB (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). 2 mL das culturas bacterianas, crescidas por 48 horas em meio Dygs líquido, pH 6,8 para isolados de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* e pH 6.0 para isolados de *Burkholderia* foram centrifugados a 14.000 rpm por cinco minutos. O precipitado foi lavado em 500 µL de TE e centrifugado a 14.000 rpm por cinco minutos. Após a lavagem o precipitado foi resuspendido em 567 µL de TE, adicionou-se 30 µL de SDS (10%) homogeneizado e, em seguida, foi adicionado 3 µL de proteinase K. Após homogeneizar bem, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por uma hora. Terminado este período foram adicionados 100 µL de NaCl (5 M) homogeneizando-se bem adicionou-se em seguida 80 µL de CTAB/NaCl. As amostras foram incubadas por dez minutos a 65°C em banho-maria e em seguida incubadas em agitador por cerca de 45 minutos a 30°C. Após a incubação, o DNA foi extraído adicionado um volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, homogeneizou-se bem, quando foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e, em seguida o sobrenadante foi transferido para um tubo novo. Ao sobrenadante foi adicionado 5 µL de RNase (5mg/µL) procedendo-se à incubação por cerca de 45 minutos em banho-maria a 37°C. Após o tratamento com RNase foi feita uma segunda extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico centrifugado a 14.000 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e precipitado com isopropanol (100%), o precipitado foi lavado com etanol (70%) e solubilizado em 50 µL de TE.

Após extraído, o DNA foi quantificado por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,0%, fundida em tampão TAE 1 X. O gel foi submerso em tampão de corrida TAE 1 X. Em cada canaleta do gel foi aplicado 1 µL de amostra, juntamente com dois µL de tampão de amostra, e aplicado voltagem constante de 100 volts por 30 minutos, para promover a migração das amostras. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (5 mg/L) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador marca Kodak, modelo EL Logic Imaging System.

A amplificação da região 16S dos isolados foi realizada utilizando os iniciadores Y1, complementar a sequência 5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3' e Y3, complementar à sequência 5'-CTAGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT-3' (YOUNG et al., 1991). A reação consistiu no preparo da mistura: 10% do volume final de tampão de PCR 10 X, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 0,12 µM de cada iniciador, uma unidade da enzima Taq DNA polimerase e de 50 a 150 ng de DNA, o volume final de reação de 50 µL. Em seguida, o material preparado foi colocado num termociclador e submetido ao programa de amplificação cujos ciclos determinados foram: um ciclo de desnaturação (93°C por dois minutos), seguido de 35 ciclos intermediários (93°C por 45 segundos, 62°C por 45 segundos e 72°C por dois minutos) e um ciclo final de extensão (72°C por cinco minutos) seguido por resfriamento (15°C por 15 minutos), para finalizar a reação. Após o término do programa,

uma amostra de 5 µL do produto amplificado foi submetida à eletroforese, para visualização dos produtos de amplificação e o restante guardado em freezer a temperatura de -20°C.

Os produtos de amplificação das regiões 16S DNAr foram digeridos com as endonucleases de restrição, AluI e MspI para *Herbaspirillum*; HinfI e AluI para *Burkholderia*; e, HaeIII e RsaI para *Azospirillum*. Os sítios de corte das enzimas estão apresentados na Tabela 2. Para cada reação, foram adicionados 8,5 µL de material amplificado, 1,0 µl de tampão de reação específico para cada enzima e cinco unidades da enzima de interesse. Os tubos foram agitados para homogeneizar os reagentes e incubados a 37°C em banho-maria por três horas.

Tabela 2. Sítios de restrição das endonucleases utilizadas.

Enzimas	Sítios de restrição
<i>AluI</i>	5'-AG - CT-3' 3'-TC - GA-5'
<i>HinfI</i>	5'- G - ANT C-3' 3'- C TNA - G-5'
<i>HaeIII</i>	5'-GG - CC-3' 3'-CC - GG-5'
<i>RsaI</i>	5'-GT - AC-3' 3'-CA - TG-5'
<i>MspI</i>	5'-C - CG G-3' 3'-G GC - C-5'

Todo o material, e mais 2 µL de tampão de amostra foi submetido à eletroforese em gel de agarose (3%), fundido em tampão TAE 1 X. As amostras foram distribuídas em poços do gel submerso em tampão de corrida TAE 1 X e submetido a 50 volts por quatro horas. Após a migração das amostras, o gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob iluminação ultravioleta conforme mencionado acima.

2.4.4 Determinação da atividade de redução do acetileno (ARA)

A determinação da atividade da nitrogenase em culturas puras foi realizada por meio da técnica de ARA (HAN e NEW, 1998). As culturas puras conservadas em óleo mineral foram crescidas em Dygs por 24 horas sob agitação de 200 rpm a 30°C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em solução salina para remover o nitrogênio do meio. Após a lavagem, foram inoculados 20 µL da suspensão em frascos de 10 mL contendo 5 mL de semi-sólido (o mesmo utilizado para o isolamento) sem biotina, sem azul de bromotimol e sem fonte de nitrogênio. Os frascos foram incubados por 48 horas a 30°C. Após este período, os frascos foram vedados e injetado 1 mL de acetileno resultando em uma atmosfera de incubação de 20%. Os frascos foram incubados a 30°C por uma hora, logo em seguida, 0,5 mL da atmosfera dos frascos foram retirados e injetados em cromatógrafo de gás Perkin Elmer para analisar a concentração de etileno na amostra.

2.4.5 Produção de compostos indólicos

A produção de AIA pelos isolados foi determinada em meio líquido e semi-sólido pelo método colorimétrico (SARVAR e KREMER, 1995). As culturas puras conservadas em óleo mineral foram crescidas em Dygs por 24 horas sob agitação de 200 rpm a 30°C. Após esse período a densidade ótica foi ajustada em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 620 nm. Uma vez padronizadas as amostras, alíquotas de 20 µl foram inoculadas em tubos de ensaios com meio líquido e em frascos de penicilina com meio semi-sólidos NFB, JNFB, LGI

e JMV (sem extrato de levedura, biotina e azul de bromotimol), com a adição de 100 µL/mL de D/L-triptofano. As amostras em meio líquido foram colocadas para incubar a 30°C por 48 h sob agitação de 200 rpm. Os frascos com as amostras em meio semi-sólido foram incubados 30°C por 48 h no escuro para os isolados de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* e 96 horas para os isolados de *Burkholderia*. Após esse período de crescimento as culturas foram centrifugadas a 7000 rpm por cinco minutos. Alíquotas de 150 µl do sobrenadante foram depositadas em microplaca de poliestireno seguida da adição de 100 µl do reagente de Salkowski. Após 30 minutos de reação no escuro à temperatura ambiente, a intensidade da cor foi medida a 540 nm em espectrofotômetro. A concentração de AIA foi determinada utilizando uma curva padrão com concentrações crescentes de AIA sintético. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A concentração de proteína das culturas utilizadas para análise de ARA e de produção de AIA foi determinada pelo método de (LOWRY et al., 1951), utilizando uma curva padrão feita a partir de concentrações crescentes de proteína (soro albumina bovina). Após a quantificação da auxina e de acetileno, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos a 4 °C, resuspendidas em água estéril e diluídas 1:5 (100 µl da amostra e 400 µl de água esterilizada). Em seguida, 0,5 mL da cultura diluída foi homogeneizada com 0,5 mL de NaOH 1 M em tubos de ensaio que foram colocados em banho-maria a 100 °C por 5 minutos. Após o resfriamento adicionou-se aos tubos 2,5 mL do reagente de Lowry e após reação no escuro à temperatura ambiente por 10 minutos adicionou-se 500 µl do reagente de Folin-Ciocalteu 1 M, seguida de rápida agitação. Após 30 minutos de incubação no escuro a intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro a 750 nm.

2.5 Resultados e Discussão

2.5.1 Isolamento e contagem de bactérias diazotróficas em arroz

Foi observada a formação de película característica indicadora de crescimento positivo em amostras de raiz lavada, raiz desinfestada e de parte aérea das plantas crescidas nos três solos em todos os meios semi-sólidos semi-seletivos utilizados (Tabela 3).

Tabela 3. Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas crescidas em meios semi-sólidos sem nitrogênio provenientes de diferentes partes da planta da cv IR42 cultivada em três amostras de solo provenientes do estado do Maranhão.

Meios de Cultivo	Número de células por grama de peso fresco (x10 ⁵)								
	Origem das amostras de solo								
	Arari			Bacabal			Vitória do Mearim		
	RL	RD	PA	RL	RD	PA	RL	RD	PA
NFB	119,0	5,7	5,0	415,0	0,3	3,8	91,7	150,0	0,0
JNFB	37,2	1,1	27,5	1140,0	0,0	0,1	35,0	0,0	0,6
LGI	1290,0	100,0	0,6	34,5	30,9	3,8	73,5	66,7	0,0
LGIP	1430,0	42,4	11,3	603,0	50,0	3,8	190,0	54,5	0,0
JMV	11,6	0,2	0,0	0,5	0,2	0,2	6,5	15,0	0,0

RL – Raiz lavada; RD – Raiz desinfestada; PA – Parte aérea.

Pode-se observar uma maior população de bactérias diazotróficas nas raízes das plantas, principalmente nas amostras de raiz lavada independentemente da origem da amostra

de solo em meio NFB, quando comparadas com a parte aérea (Tabela 3). De modo geral uma população maior de bactérias foi observada nos solos de Arari e Bacabal nos meios LGI, LGIP e NFB, enquanto que o solo de Vitória do Mearim foi o que mostrou tendência apresentar menor população de bactérias, principalmente na parte aérea das plantas. Independentemente do solo, uma menor população de bactérias diazotróficas foi observada no meio JMV.

Embora a contagem de células bacterianas, estimadas pela técnica do Número Mais Provável no meio LGIP, semi-específico para o isolamento de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, tenha sido alta, até 10^8 , os estudos morfológicos, das bactérias crescidas neste meio mostraram que as mesmas não apresentavam características de *Gluconacetobacter* spp., mas sim do gênero *Burkholderia*. No entanto, o gênero *Gluconacetobacter*, também pode ser encontrado colonizando plantas de arroz. MUTHUKUMARASAMY et al. (2005) observaram a ocorrência de *G. diazotrophicus* em diferentes cultivares de arroz irrigado na Índia. Segundo MUTHUKUMARASAMY et al. (2007), *G. diazotrophicus* apresenta uma grande distribuição geográfica em plantas de arroz em clima temperado. KUSS et al. (2007) observaram uma população expressiva de bactérias diazotróficas no meio LGIP em diferentes cultivares de arroz irrigado no Rio Grande do Sul. No entanto, não foi feita uma caracterização das bactérias isoladas deste meio para confirmar se pertenciam ao gênero *Gluconacetobacter*.

Nos meios de cultivo LGI e LGIP foi observado, tanto em meio semi-sólido quanto em meio sólido dois grupos de bactérias umas que acidificavam o meio e outras que alcalinizavam, tornando estes meios mais amarelo ou esverdeado respectivamente. RODRIGUES (2003) avaliando o crescimento de isolados de *Burkholderia* spp. em meio LGIP observou esta mesma característica, alguns isolados que alcalinizavam o meio e outros que o acidificaram e que isolados de *Burkholderia* spp. foram capazes de crescer em meio completado com 10% de açúcar.

Na primeira coleta foi obtido um total de 164 isolados. Porém, não foi observada a presença de bactérias com características do gênero *Herbaspirillum* ou *Azospirillum*. Os isolados obtidos apresentaram características morfológicas semelhantes e foram caracterizados como *Burkholderia* spp. Não foi possível identificar alguns isolados nesta fase e, portanto, foram agrupados como não identificados. Os isolados não identificados foram obtidos principalmente nos meios LGI e LGIP, sendo que alguns destes alcalinizaram o meio de cultivo (observado pela mudança de cor do indicador de pH do meio de cultivo) e outros, acidificaram. Quando riscadas nestes mesmos meios sólidos suplementados com extrato de levedura formaram colônias grandes e pequenas, brancas e amareladas e, também, gomosas. Já em meio NFB, sólido formaram-se colônias pequenas e azuis translúcida e em JNFB colônias maiores, azuladas e com centro o escuro. Em microscópio óptico estes isolados apresentaram células pequenas imóveis e em formato de gota. O número de isolados obtidos em cada meio semi-sólido e das diferentes partes da planta crescidas nas três amostras de solo encontram-se na Tabela 4. Como não foi obtido nenhum isolado dos gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum*, que são bactérias de ocorrência comum em arroz, julgou-se necessário fazer uma nova etapa de isolamento de bactérias utilizando-se as variedades locais.

Tabela 4. Número de isolados de bactérias diazotróficas obtido da cultivar IR42 crescida em amostras de solo proveniente de três municípios do estado do Maranhão.

Origem do solo	Parte da Planta	NFB	JNFB	LGI	LGIP	JMV	Total
Arari	RL*	8	2	12	11	8	41
	RD	3	1	8	5	4	21
	PA	3	0	0	0	1	4
Bacabal	RL	2	0	6	5	7	20
	RD	2	1	5	8	0	16
	PA	6	0	4	0	2	12
Vitória do Mearim	RL	2	0	5	16	6	29
	RD	1	1	3	7	1	13
	PA	3	0	1	3	1	8
Total		30	5	44	55	30	164

*RL – Raiz lavada; RD – Raiz desinfestada; PA – Parte aérea.

O segundo isolamento permitiu a obtenção de 138 isolados que foram classificados de acordo com a caracterização morfológica, como *A. amazonense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. (Tabela 5). Muitos dos isolados, principalmente oriundos dos meios de cultivo LGI e LGIP, também não foram identificados nesta fase e para fins de agrupamento permaneceram como não identificados. No entanto, apresentaram características semelhantes aos obtidos no primeiro isolamento sugerindo pertencer ao gênero *Burkholderia*. O maior número de isolados obtidos foi de *Burkholderia* spp., sendo 55 no primeiro isolamento e 35 no segundo, e de *A. amazonense*, 33 isolados. Estes resultados estão de acordo com BALDANI (1996) e RODRIGUES et al. (2006) que observaram números elevados destes gêneros em cultivares de arroz IR42 e IAC4440 cultivadas em solos provenientes do estado do Rio de Janeiro e de Goiás.

Tabela 5. Número de isolados de bactérias diazotróficas obtidas das variedades de arroz Diamante, Zebu Branco e Manteiga, crescidas em amostras de solo proveniente de três municípios do estado do Maranhão.

Origem dos Solos (Variedades)	<i>Azospirillum amazonense</i>		<i>Azospirillum brasilense</i>		<i>Azospirillum lipoferum</i>		<i>Herbaspirillum</i> spp.		<i>Burkholderia</i> spp.		<i>Azospirillum</i> spp.	
	R	PA	R	PA	R	PA	R	PA	R	PA	R	PA
Arari (Diamante)	11	4	2	1	2	3	4	3	8	5	12	14
Bacabal (Zebu Branco)	2	0	1	0	2	0	1	0	7	6	7	8
Vitória do Mearim (Manteiga)	12	4	1	0	0	0	2	2	7	2	3	3
Total	33		4		7		12		35		49	

R – Raiz; PA – Parte aérea.

O solo de baixada proveniente do município de Arari foi o que originou o maior número de isolados de bactérias diazotróficas tanto no primeiro como no segundo isolamento, sendo que a raiz apresentou maior número de bactérias isoladas. Uma população maior de

bactérias diazotróficas em raízes de arroz quando comparada com a do colmo e da folha de arroz, também, foi observada por RODRIGUES et al. (2006).

2.5.2 Determinação da atividade de redução do acetileno (ARA) de culturas bacterianas *in vitro*

A capacidade dos isolados em realizarem a fixação biológica de nitrogênio (FBN) determinada por meio da atividade da enzima nitrogenase medida pela técnica de redução do acetileno (ARA) demonstrou que a maioria dos isolados foram capazes de reduzir o acetileno a etileno, comprovando a capacidade destas bactérias de fixarem biologicamente o nitrogênio atmosférico.

Houve uma grande variabilidade entre os isolados quanto à capacidade de redução de acetileno, variando de 0,3 a 90,2 nmol mL⁻¹ após uma hora de incubação (dados não apresentados). É comum se observar uma alta variabilidade entre isolados quanto à capacidade de reduzir acetileno a etileno *in vitro*. HAN e NEW (1998) também, observaram grande variabilidade na capacidade de isolados em reduzir acetileno em meio de cultivo. Além disso, os autores observaram que a alta FBN em meio de cultivo não se relaciona com a alta FBN em campo. Uma variabilidade acentuada na capacidade de fixar N₂ também foi observada com outras bactérias isoladas de arroz (RODRIGUES et al., 2006; KUSS et al., 2007).

A técnica de ARA mostrou que a maioria dos isolados apresentou baixos valores de FBN, sendo que os isolados de *A. amazonense* foram aqueles que apresentaram maior capacidade de redução do acetileno quando comparados com os isolados de outras espécies. A técnica de redução do acetileno é um método indireto para avaliar a FBN e estirpes que apresentam alto potencial de FBN *in vitro* podem não apresentar uma associação eficiente com as plantas (HAN e NEW, 1998). Além disso, a alta fixação de nitrogênio pelas bactérias, não implica em transferência do N fixado para a planta (MANTELIN e TOURAINÉ, 2004). Em função dessa variabilidade a atividade de redução do acetileno é considerada apenas qualitativa por alguns autores. A estirpe M2, uma mutante natural não fixadora de nitrogênio, não foi capaz de reduzir acetileno a etileno nas condições testadas confirmando sua incapacidade de fixar nitrogênio (BALDANI et al., 1997).

2.5.3 Determinação da Produção de Ácido Indol-Acético (AIA) *in vitro*

Os isolados das bactérias estudadas apresentaram capacidade diferenciada de produzir AIA, avaliado pelo método colorimétrico de Salkowski e, sendo os do gênero *Azospirillum* aqueles que produziram maiores concentrações de compostos indólicos (Tabela 6). RADWAN et al. (2004) observaram que estirpes de *Azospirillum* spp. produzem de três a sete vezes mais compostos indólicos que estirpes de *Herbaspirillum*. Dentre os isolados de *Azospirillum* spp., os de *A. amazonense* produziram maior quantidade de AIA comparados com isolados de outras espécies (Tabela 7). A quantidade de AIA produzida pelos isolados de *A. amazonense*, variou de 7 a 303 µM mL⁻¹. Estes valores são superiores aos encontrados por REIS JUNIOR et al. (2004) para *A. amazonense* em isolados de braquiária.

Poucos isolados de *Burkholderia* spp. foram capazes de produzir compostos indólicos nas condições testadas, ou seja, em meio JMV líquido e em semi-sólido, variando de não detectado até 8 µM mL⁻¹ (dados não mostrados). Isolados do gênero *Burkholderia* podem apresentar capacidade de produzir compostos indólicos conforme indicado por KUKLINSKY-SOBRAL (2004). No entanto, MARCHIORO (2005) também observou que entre 17 estirpes de *Burkholderia* spp. avaliadas, apenas seis produziram compostos indólicos pelo método do reagente de Salkowski e em pequena quantidade quando comparados com

outros gêneros de bactérias diazotróficas. GOVINDARAJAN et al. (2008) observaram a produção de até $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA por isolados de *Burkholderia vietnamiensis* após uma semana de incubação em meio CCM e utilizando cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) que é um método mais sensível e preciso.

2.5.4 Diversidade genética dos isolados

2.5.4.1 Isolados caracterizados morfológicamente como *Herbaspirillum* spp.

Todos os isolados caracterizados morfológicamente como *Herbaspirillum* spp. foram utilizados para a análise da diversidade genética por meio da técnica de ARDRA. A origem de cada um dos isolados encontra-se na Tabela 8. Os produtos de amplificação da região 16S do DNAr dos isolados foram digeridos com as enzimas de restrição *AluI* e *MspI* que apresentam maior poder discriminatório para *Herbaspirillum* spp. (BRASIL, 2005). A restrição dos produtos de amplificação das estirpes padrões e dos isolados de *Herbaspirillum* spp. geraram seis perfis polimórficos para cada uma das enzimas (Figura 1). Dos 10 isolados avaliados, quatro formaram o mesmo tipo de perfil que a estirpe M4 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Os demais, formaram perfis distintos entre si e diferentes das estirpes padrões, sendo que nenhum dos isolados formou o mesmo tipo de perfil que as estirpes ZAE94 e ZAE67 de *H. seropedicae* (Tabela 9).

Tabela 6. Produção de compostos indólicos por isolados de *Azospirillum* spp. isolados de diferentes partes da planta de três variedades de arroz crescidas em amostras de solo provenientes de três localidades no Maranhão (A = Arari, B= Bacabal e V = Vitória do Mearim) e avaliados pelo método colorimétrico (média de 4 repetições).

Isolado	Solo	Parte da planta	$\mu\text{M}/\mu\text{g}$	$\mu\text{M}/\text{mL}$
VR2112	A	RD	1,20A	219A
AR3156	A	RD	0,77B	181B
AR1161	A	RL	0,72B	186B
AR1131	A	RD	0,66B	41C
AR2128	A	RD	0,56B	30C
AR1246	A	RD	0,54B	88B
VR1134	V	RD	0,51B	49C
BR1142	B	RD	0,43B	85B
AR215	A	RD	0,35C	28C
Cd			0,34C	142B
BF1358	B	PA	0,32C	75B
AR1135	A	RL	0,32C	36B
BR3159	B	RL	0,30C	75B
BF1360	B	PA	0,28C	73B
BR1139	B	RD	0,26C	48C
AR114	A	RD	0,25C	32C
BR2113	B	RD	0,21C	16C
BR1144	B	RD	0,18C	48C
BF2227	B	PA	0,18C	47C
AR1133	A	RD	0,18C	22C
BR2257	B	RD	0,14C	35C
AR1155	A	RL	0,14C	32C
AR2132	A	RD	0,12C	29C
AR211	A	RD	0,10C	19C
VR113	V	RD	0,095C	13C
AR2141	A	RD	0,092C	41C
AR319	A	RD	0,09C	27C
AR2140	A	RD	0,08C	30C
AR2247	A	RD	0,07C	13C
VR2236	V	PA	0,07C	13C
AR1249	B	PA	0,07C	15C
AR218	A	RD	0,06C	11C
AF3143	A	RL	0,06C	14C
BR112	A	RD	0,06C	15C
AR1148	B	RD	0,04C	9C
BR1145	B	RD	0,03C	7C
BR117	B	RD	0,01C	3C
BR2110	B	RD	0,00C	2C
AR2111	A	RD	0,00C	1C

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.
RL – Raiz lavada; RD – Raiz desinfestada; PA – Parte aérea.

Tabela 7. Produção de compostos indólicos por *Azospirillum amazonense* isolados da raiz (R) e da parte aérea (PA) de diferentes variedades de arroz crescidas em solo provenientes de três localidades no Maranhão (A = Arari e V = Vitória do Mearim) avaliados pelo método colorimétrico (média de 4 repetições).

Isolado	Local de coleta das amostras de solo	Parte da planta	$\mu\text{M}/\mu\text{g}$	$\mu\text{M}/\text{mL}$
VF2213	V	PA	1,44A	164D
AR3123	A	RD	1,42A	168D
VR2110	V	RD	1,39A	145D
VR219	V	RD	1,36A	175D
AR3122	A	RD	0,99B	186C
AR3124	A	RD	0,84B	174D
VR218	V	RD	0,83B	303A
VR3125	V	RD	0,83B	165D
AR214	A	RD	0,71B	159D
AR2128	A	RD	0,70B	147D
VR3126	V	RD	0,69B	167D
VR2114	V	RD	0,69B	166D
Y2			0,68B	154D
AR211	A	RD	0,67B	182C
AR213	A	RD	0,66B	159D
VF227	V	PA	0,65B	156D
AR3127	A	RD	0,62B	154D
VR2111	V	RD	0,60B	139D
VR3120	V	RD	0,59B	164D
AR215	A	RD	0,57B	165D
VR2112	V	RD	0,409C	168D
Ym69			0,37C	164D
VF2215	V	PA	0,36C	119E
AF226	A	PA	0,26C	62F
AR3118	A	RD	0,12C	22G
VR2116	V	RD	0,06C	21G
AR2117	V	RD	0,02C	8G
AF222	A	PA	0,02C	8G

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. RD – Raiz desinfestada; PA – Parte aérea.

Tabela 8. Origem dos isolados classificados previamente como *Herbaspirillum* spp. utilizados na análise caracterização genética.

Isolado	Parte da planta	Meio de cultivo	Local de coleta das amostras de solo
AR1123	RD	NFB	Arari
AR1121	RD	NFB	Arari
VR1119	RD	NFB	Vitória do Mearim
AR2120	RD	JNFB	Arari
VR2116	RD	JNFB	Vitória do Mearim
VR2117	RL	JNFB	Vitória do Mearim
AR1124	RD	NFB	Arari
AR1122	RL	NFB	Arari
AR1125	RL	NFB	Arari
BR2126	RD	JNFB	Bacabal

RL – Raiz lavada; RD – Raiz desinfestada; PA – Parte aérea.

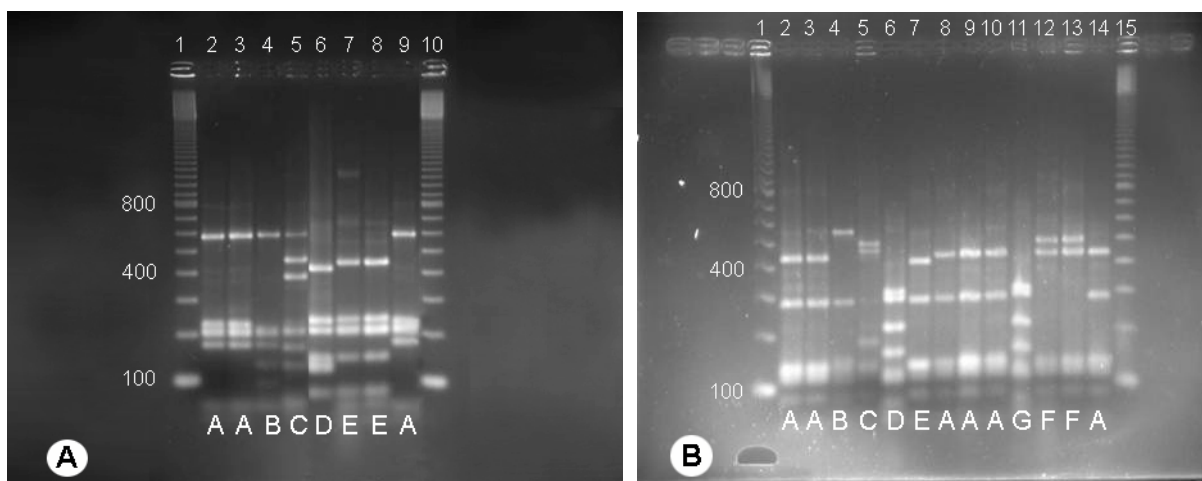


Figura 1. Perfil eletroforético de restrição dos fragmentos da região 16S DNAr de estirpes de referência *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e de novos isolados. Figura A. Restrição com *AluI*. Legenda: 1 (marcador de 100 pb), 2 (VR2116), 3 (VR2117), 4 (VR1119), 5 (AR1121), 6 (BR2126), 7 (ZAE94), 8 (ZAE67), 9 (M4), 10 (marcador de 100 pb). Figura B. Restrição com *MspI*. Legenda: 1 (marcador de 100 pb), 2 (VR2116), 3 (VR2117), 4 (VR1119), 5 (AR2120), 6 (AR1121), 7 (AR1122), 8 (AR1123), 9 (AR1224), 10 (AR1125), 11 (AR2126), 12 (ZAE94), 13 (ZAE67), 14 (M4), 15 (marcador de 100 pb).

Tabela 9. Perfil eletroforético de restrição dos fragmentos da região 16S DNAr de estirpes de referência *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e de novos isolados.

Estirpes e isolados	Perfis de restrição		
	<i>AluI</i>	<i>MspI</i>	Tipos de perfis
M4 (<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>)	A*	A	1
ZAE67, ZAE94 (<i>Herbaspirillum seropedicae</i>)	B	B	2
VR2116, VR2117, AR1224, AR1125	A	A	1
VR1119	E	F	3
AR2120	C	F	4
AR1121	C	C	5
AR1122	D	D	6
AR1123	F	E	7
BR2126	D	A	8

*As letras representam o tipo de perfil gerado por cada enzima.

A análise do dendograma (Figura 2) mostra que os quatros isolados que se agruparam com a estirpe M4 formaram o maior grupo com 100% de similaridade. O grupo I, com 77% de similaridade, englobando também as estirpes ZAE67 e ZAE94. Já o grupo II com apenas três isolados apresenta 70% de similaridade ao grupo anterior, os demais isolados apresentaram maior diversidade (Grupo III) apresentando apenas 50% de similaridade.

RODRIGUES (2003) observou por meio da técnica de ARDRA que a maioria das enzimas de restrição testadas para estudar a diversidade da população de isolados de *Herbaspirillum* spp. obtidos de arroz, não foi capaz de diferenciar entre estirpes padrões e diferentes isolados. No entanto, a restrição da 16S DNAr com as enzimas *AluI* e *MspI* foram capazes de diferenciar *H. seropedicae* e *Herbaspirillum frisingense* das outras espécies. BRASIL (2005) utilizando a técnica do ARDRA para estudar a diversidade da população de *Herbaspirillum* spp. isolada de arroz observaram a formação de três grupos distintos, embora tenha havido grande homogeneidade entre os isolados dentro de cada grupo. O autor observou

a formação de perfis de restrição diferentes para a espécie *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, mostrando que esta técnica pode ser utilizada para separar espécies de *Herbaspirillum*. CRUZ et al. (2001) também separaram isolados de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* pela técnica do ARDRA. Os isolados que apresentaram perfis polimórficos diferentes do gerado para *H. rubrisubalbicans* podem pertencer a outras espécies do gênero, porém estudos adicionais serão necessários para a confirmação.

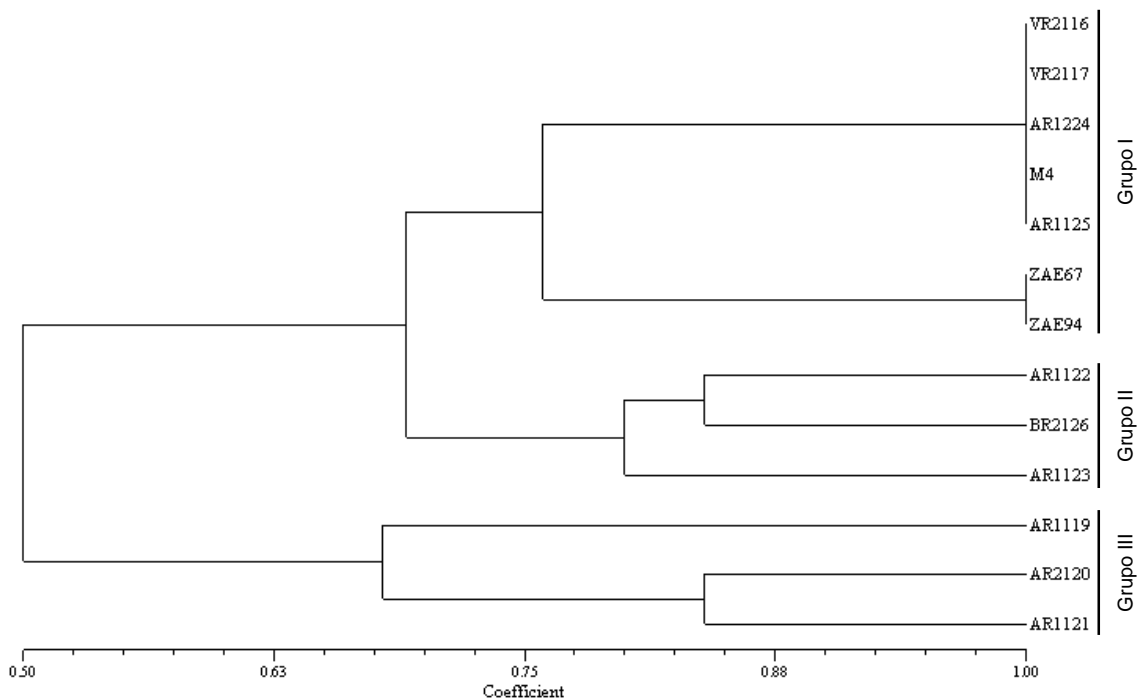


Figura 2. Dendrograma de similaridade de estirpes de referência *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e de novos isolados caracterizados morfológicamente como *Herbaspirillum* spp. Este dendrograma foi gerado pelo programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir dos perfis de restrição dos fragmentos da região 16S DNAr gerados pela técnica de ARDRA.

2.5.4.2 Isolados caracterizados morfológicamente como *Azospirillum* spp.

A origem dos isolados caracterizados morfológicamente como *A. brasilense* e *A. lipoferum* e de isolados similares a *Azospirillum* spp., utilizados para o estudo da diversidade genética, pode ser observada na Tabela 6. A restrição dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S DNAr foi realizada pelas enzimas *HaeIII* e *RsaI*, por apresentarem maior poder discriminatório para *Azospirillum* spp. (REIS JUNIOR et al., 2004). Estas enzimas geraram um total de 11 perfis polimórficos, sendo que a enzima *HaeIII* gerou seis perfis e a enzima *RsaI* cinco (Figura 3). De um total de 30 isolados analisados, 16 formaram o mesmo tipo de perfil que as estirpes CD, Sp7 de *A. brasilense* e Sp59 de *A. lipoferum*. Os demais isolados formaram oito tipos de perfis distintos, sendo que cinco destes com apenas um isolado (Tabela 10). Pela análise de agrupamento podemos observar formação de três grupos principais (Figura 4). No primeiro grupo, podemos observar um subgrupo que engloba mais de 50% dos isolados com 100% de similaridade com as estirpes de referência, os grupos II e III apresentaram maior diversidade e os isolados do grupo III apresentaram maior similaridade à *A. amazonense*, sendo que o isolado AR1128 apresentou mais de 90% de similaridade com a estirpe Y2 de *A. amazonense*.

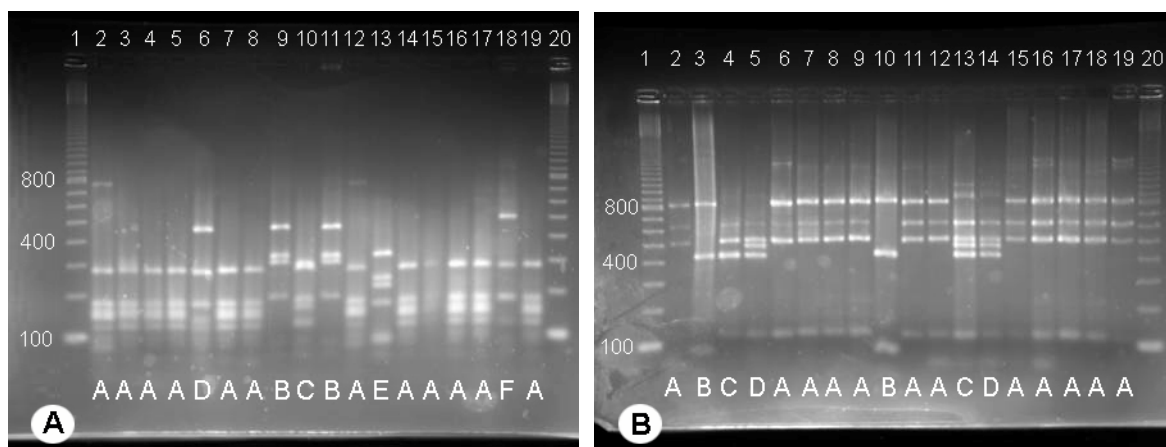


Figura 3. Perfil eletroforético de restrição dos fragmentos da região 16S DNAr de estirpes de referência *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum* e de novos isolados. Figura A. Restrição com *Hae* III. Legenda: 1 (marcador de 100 pb), 2 (CD), 3 (Sp7), 4 (Sp59), 5 (AR211), 6 (BR112), 7 (BR2110), 8 (BR2113), 9 (BF2227), 10 (AR2128), 11 (AR2130), 12 (AR2132), 13 (AR1133), 14 (VR1134), 15 (VR2236), 16 (BR2137), 17 (BR1138), 18 (BR1246), 19 (AR2247), 20 (marcador de 100 pb). Figura B. Restrição com *Rsa*I. Legenda: 1 (marcador de 100 pb), 2 (AR211), 3 (BR112), 4 (VR113), 5 (AR114), 6 (BR2110), 7 (BR2113), 8 (BF2214), 9 (BF2227), 10 (AR2128), 11 (AR2130), 12 (AR2132), 13 (AR1133), 14 (VR2236), 15 (BR1139), 16 (VR1142), 17 (CD), 18 (Sp7), 19 (Sp59), 20 (marcador de 100 pb).

Tabela 10. Perfil eletroforético de restrição dos fragmentos da região 16S DNAr de estirpes de referencia *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum* e de novos isolados.

Estirpes e isolados	Perfis de restrição		
	<i>Hae</i> III	<i>Rsa</i> I	Tipos de perfis
CD, Sp7 (<i>Azospirillum brasilense</i>), Sp59 (<i>Azospirillum lipoferum</i>)	A*	A	1
AR211, AR216, BR117, AR218, AR319, BR2110, BF2214, BF2227, AR2130, BR2137, BR1139, AR2141, VR1142, AR3143, AR1245, AR2247	A	A	1
AR2132, VR1134	A	E	2
BR112	B	B	3
AR2128	B	D	4
VR113	C	A	5
AR114, AR215, AR1135, VF2236	D	B	6
AR2129, AR2130, AR1131	E	A	7
BR1246	A	C	8
AR1133	F	B	9
AR2111	B	F	10
BR2113	A	D	11

*As letras representam o tipo de perfil gerado por cada enzima.

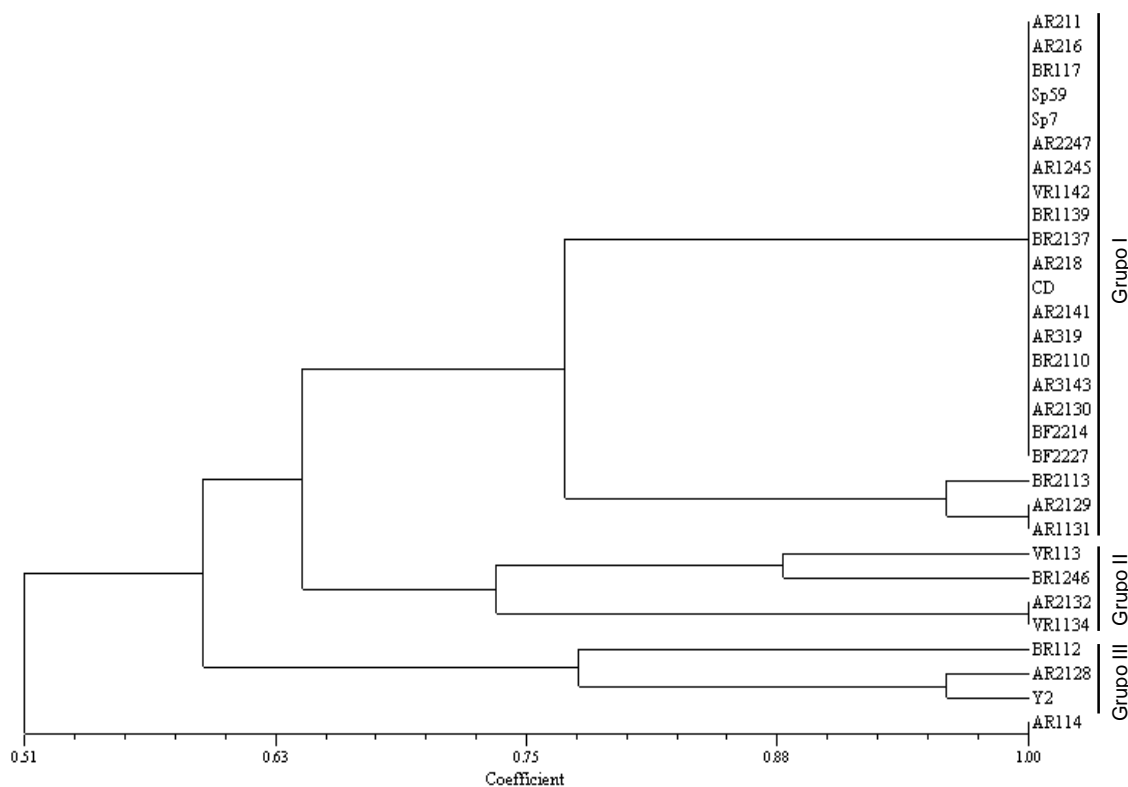


Figura 4. Dendrograma de similaridade de estirpes de referência de *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum amazonense* e de isolados caracterizados morfologicamente com *Azospirillum* spp. Este dendrograma foi gerado pelo programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir dos perfis de restrição gerados pela técnica de ARDRA.

Embora, as enzimas utilizadas não tenham separado as estirpes padrões de *A. brasilense* e *A. lipoferum*, metade dos isolados se agruparam com estas espécies confirmando que estes isolados pertencem ao gênero *Azospirillum*. Foi observada uma grande diversidade entre os isolados pela análise dos perfis polimórficos gerados, no entanto não foi observado efeito dos locais de coleta ou da parte da planta no agrupamento dos isolados. BRASIL et al. (2005) observaram, também, uma alta diversidade para isolados de *Azospirillum* spp. obtidos de arroz, porém, embora estes autores não tenham separado as espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum*, eles observaram a formação de dois grupos com 50% de similaridade entre estas espécies.

2.5.4.3 Isolados caracterizados morfologicamente como *Azospirillum amazonense*

A restrição dos fragmentos amplificados das estirpes e dos isolados de *A. amazonense* (Tabela 7) pelas enzimas *HaeIII* e *RsaI* gerou um total de sete perfis polimórficos, sendo que a enzima *HaeIII* gerou três perfis e a enzima *RsaI* quatro (Figura 5). De um total de 24 isolados analisados, 16 formaram o mesmo tipo de perfil que as estirpes Y2 e CBAMC de *A. amazonense*. Os demais isolados formaram seis tipos distintos de perfis, sendo, dois com dois isolados cada um e quatro com apenas um isolado (Tabela 11). Pela análise de agrupamento (Figura 6) pode-se observar que a maioria dos isolados (66%) se agruparam com as estirpes CBAMC e Y2 com 100% de similaridade. O grupo I, divide-se em dois subgrupos, sendo um com apenas dois isolados que apresentam 73% de similaridade com as estirpes de referência, o grupo II com três isolados apresenta 69% de similaridade com o grupo I, já o grupo III formado pelos isolados que apresentaram pouca similaridade com as estirpes de referência,

apenas 38%, e podem pertencer a gêneros ou a espécies diferentes, pois uma baixa diversidade entre isolados de *A. amazonense* pela técnica do ARDRA foi observada por REIS JUNIOR et al. (2004). É possível se verificar uma maior diversidade entre isolados de *A. amazonense* quando se utiliza a região intergênica 16S – 23S (REIS JUNIOR et al., 2006).

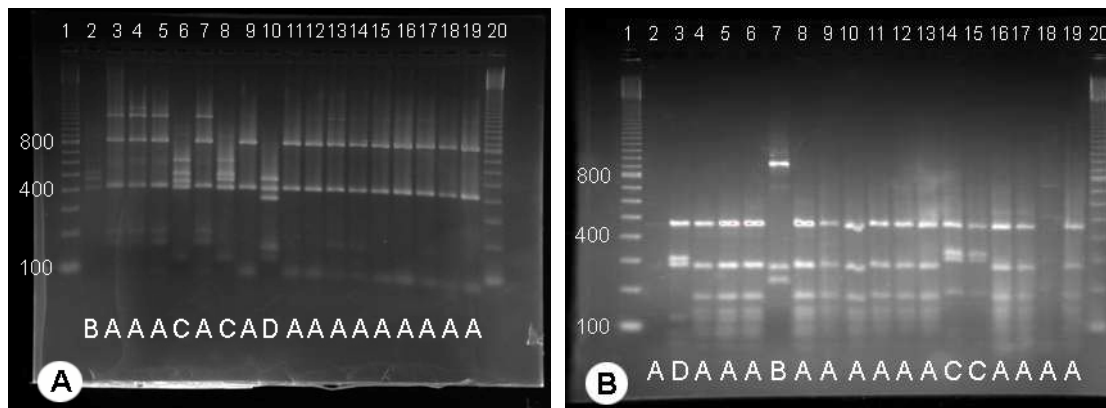


Figura 5. Perfil eletroforético de restrição dos fragmentos da região 16S DNAr de estirpes de referencia *Azospirillum amazonense* e de novos isolados. Figura A. Restrição com *RsaI*. Legenda: 1 (marcador de 100 pb), 2 (AR211), 3 (AR215), 4 (VF227), 5 (VR218), 6 (VR219), 7 (VR2112), 8 (VF2213), 9 (VR2114), 10 (VR2116), 11 (AR2117), 12 (VR3120), 13 (AR3121), 14 (AR3123), 15 (AR3124), 16 (VR3125), 17 (AR3127), 18 (Y2), 19 (CBAMC), 20 (marcador de 100 pb). Figura B. Restrição com *HaeIII*. Legenda: 1 (marcador de 100 pb), 2 (AR111), 3 (AF222), 4 (AR213), 5 (AR214), 6 (AR215), 7 (AF226), 8 (VF227), 9 (VR2110), 10 (VR2111), 11 (VR2114), 12 (VR2215), 13 (VR2116), 14 (AR3118), 15 (AR3121), 16 (AR3122), 17 (VR3126), 18 (Y2), 19 (CBAMC), 20 (marcador de 100 pb).

Tabela 11. Perfil eletroforético de restrição dos fragmentos da região 16S DNAr de estirpes de referencia *Azospirillum amazonense* e de novos isolados

Estirpes e isolados	Perfis de restrição		
	<i>HaeIII</i>	<i>RsaI</i>	Tipos de perfis
Y2, CBAMC (<i>Azospirillum amazonense</i>)	A*	A	1
AR111, AR213, AR214, AR215, VF227, VR218, VR2110, VR2112, VR2114, VR2116, VR3120, AR3122, AR3123, VR3125, VR3126, AR3127, AR2117.	A	A	1
VR2111, AR3124	A	B	2
VF2213, VR219	B	A	3
AR3118, AR3121	B	C	4
AF222	B	D	5
AR2128	C	A	6
AF226	C	C	7

*As letras representam o tipo de perfil gerado por cada enzima.

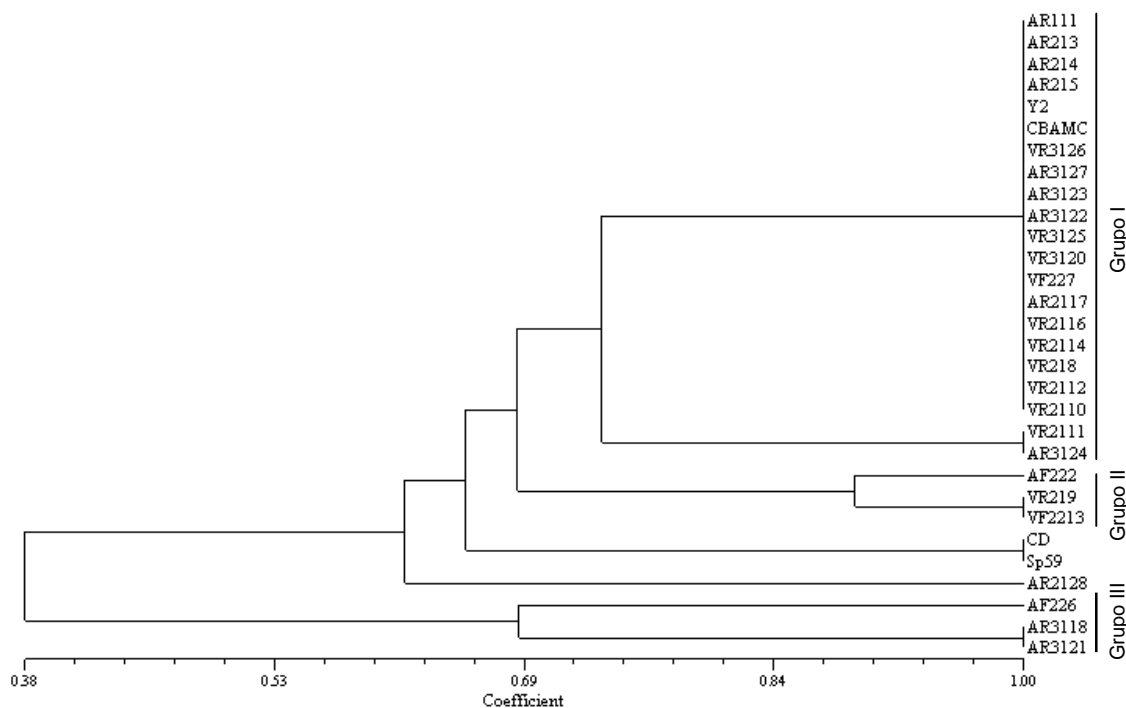


Figura 6. Dendrograma de similaridade de estirpes de referência de *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum amazonense* e de isolados caracterizados morfológicamente com *Azospirillum amazonense*. Este dendrograma foi gerado pelo programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir dos perfis de restrição gerados pela técnica de ARDRA.

2.5.4.4 Isolados caracterizados morfológicamente como *Burkholderia* spp.

A análise da diversidade genética dos isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Burkholderia* pela caracterização morfológica, foi realizada com 30 isolados representativos das diferentes partes da planta e das diferentes amostras de solo, todos obtidos do meio de cultivo JMV, a origem destes isolados encontram-se na Tabela 12. Foram utilizadas as enzimas *AluI* e *HinfI* que apresentam maior poder discriminatório para isolados de *Burkholderia* spp., segundo BRASIL (2005).

A restrição dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S DNAr pelas enzimas *AluI* e *HinfI* das estirpes de *Burkholderia brasilensis* (M130), *Burkholderia tropica* (Ppe8) e *B. vietnamiensis* (TVV75) e dos isolados caracterizados morfológicamente como *Burkholderia* spp. gerou um total de sete perfis polimórficos (Figura 7). A maioria dos isolados (54%) formaram o mesmo tipo de perfil que os das estirpes M130 de *B. brasilensis* e TVV75 de *B. vietnamiensis*. Os demais isolados formaram cinco tipos distintos de perfil, sendo, um com oito isolados e os demais com apenas um isolado cada (Tabela 13). Embora não tenha sido observada uma grande diversidade entre os isolados, pela técnica do ARDRA, foi observada influência do local de coleta da amostra de solo na diversidade dos isolados de *Burkholderia* spp (Tabela 13). O tipo de perfil 3 foi mais comum no solo de Bacabal, que é de terras altas, já o tipo de perfil 1 foi mais comum nos solos de Arari e Vitória do Mearim que são solos de baixada. Além disso, os tipos de perfil 5, 6 e 7 apareceram só no solo de Arari.

O dendrograma gerado pela análise de agrupamento dos isolados caracterizados como *Burkholderia* pela caracterização morfológica mostra a formação de dois grupos principais (Figura 8). O grupo I formado pelos isolados que apresentaram 100 % de similaridade com as estirpes de referência M130 e TVV75 e o grupo II com dois subgrupos apresentando mais de

90 % de similaridade com a estirpe Ppe8 de *B. tropica*. A técnica do ARDRA não foi suficiente para identificar espécies

Embora tenha sido observada grande diversidade entre os isolados, não foi observada influência da parte da planta ou do local de coleta da amostra de solo na diversidade dos isolados. Além disso, a técnica do ARDRA não foi suficiente para identificar espécies, sendo, portanto, necessário o uso de técnicas mais precisas para a identificação dos isolados como o sequenciamento da região 16S DNAr. PERIN (2007) observou grande variação entre isolados de *Burkholderia* spp. obtidos de cana-de-açúcar pela técnica do ARDRA, no entanto esta técnica foi capaz de identificar apenas cinco isolados, dois como *B. tropica* e dois como *Burkholderia unamed*. RODRIGUES et al. (2006) caracterizaram isolados de *Burkholderia* spp. obtidos de arroz e observaram que houve predominância das espécies *B. vietnamiensis* e *Burkholderia kururiansis*. BRASIL (2005) observou predominância de *B. vietnamiensis* entre isolados de *Burkholderia* spp. isolados de plantas de arroz.

Tabela 12. Origem dos isolados classificados previamente como *Burkholderia* spp. utilizados na análise de caracterização genética.

Isolados	Parte da planta	Local de coleta da amostra de solo
AR516	RL	Arari
AR5214	RD	Arari
AF5323	PA	Arari
AR5130	RL	Arari
AR5131	RL	Arari
AF5333	PA	Arari
AR5244	PA	Arari
AR5145	RL	Arari
AR5150	RL	Arari
AF5272	PA	Arari
AR5276	RD	Arari
BR514	RL	Bacabal
BR518	RL	Bacabal
BF5325	PA	Bacabal
BR5161	RL	Bacabal
BR5239	RD	Bacabal
BR5154	RL	Bacabal
BR5256	PA	Bacabal
BR5257	PA	Bacabal
BR5159	RD	Bacabal
VR521	RD	V. do Mearim
VR5135	RL	V. do Mearim
VR5138	RL	V. do Mearim
VR5140	RL	V. do Mearim
VR5165	RL	V. do Mearim
VR5166	RL	V. do Mearim
VR5168	RL	V. do Mearim
VR5169	RL	V. do Mearim
VR5171	RL	V. do Mearim
VF5120	PA	V. do Mearim
VR4175	RL	V. do Mearim

RL – Raiz lavada; RD – Raiz desinfestada; PA – Parte aérea.

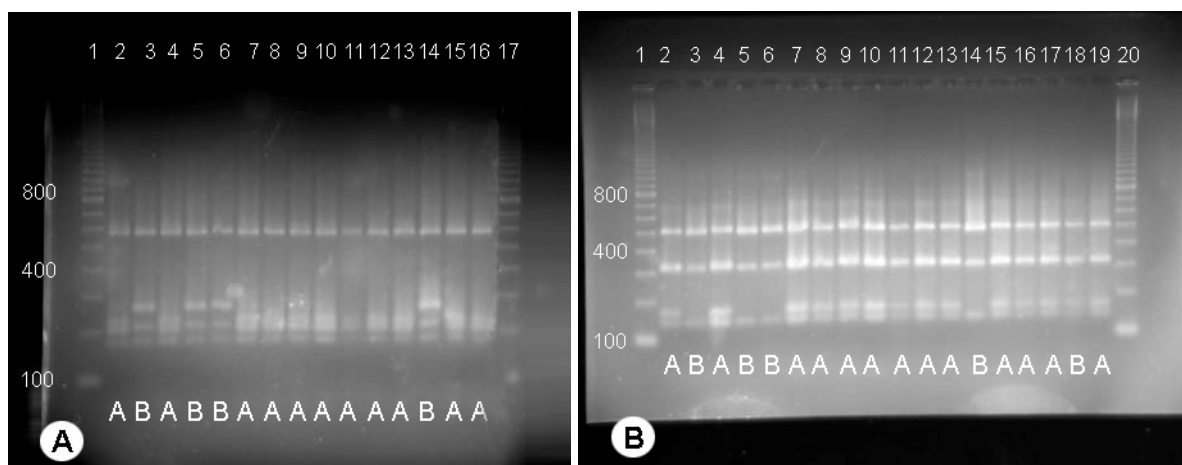


Figura 7. Perfil eletroforético de restrição dos fragmentos da região 16S DNAr de estirpes de referência *Burkholderia brasiliensis*, *Burkholderia tropica*, *Burkholderia vietnamiensis* e de novos isolados. Figura A. Restrição com *AluI*. Legenda: 1 (marcador de 100 pb), 2 (VR521), 3 (BR514), 4 (AR516), 5 (BR518), 6 (AR5214), 7 (VR5120), 8 (AF5323), 9 (BF5325), 10 (AR5130), 11 (AR5131), 12 (AR5132), 13 (AF5333), 14 (VR5135), 15 (VR5138), 16 (BR5239), 17 (marcador de 100 pb). Figura B. Restrição com *HinfI*. Legenda: 1 (marcador de 100 pb), 2 (BR514), 3 (AR516), 4 (BR518), 5 (AR5214), 6 (VR5120), 7 (AF5323), 8 (BF5325), 9 (AR5130), 10 (AR5131), 11 (AR5132), 12 (AF5333), 13 (VR5135), 14 (VR5138), 15 (BR5239), 16 (VR5140), 17 (TVV75), 18 (PPE8), 19 (M130), 20 (marcador de 100 pb).

Tabela 13. Perfil eletroforético de restrição dos fragmentos da região 16S DNAr de estirpes de referência *Burkholderia brasiliensis*, *Burkholderia tropica*, *Burkholderia vietnamiensis* e de novos isolados.

Estirpes e isolados	Perfis de restrição		
	<i>AluI</i>	<i>HinfI</i>	Tipos de perfis
M130 (<i>Burkholderia brasiliensis</i>), TVV75 (<i>Burkholderia vietnamiensis</i>)	A*	A	1
Ppe8 (<i>Burkholderia tropica</i>)	B	A	2
VR521, AR516, VR5120, AF5323, BF5325, AR5130, AR5131, VR5138, BR5239, AR5150, BR5256, AR1161, VR5168, VR5169, VF5271, AR5276	A	A	1
BR514, BR518, AR5214, VR5135, BR5154, BR5257, BR5159, VR5165	B	B	3
AR5145	B	C	5
AF5333	D	A	6
AR5244	E	D	7

*As letras representam o tipo de perfil gerado por cada enzima.

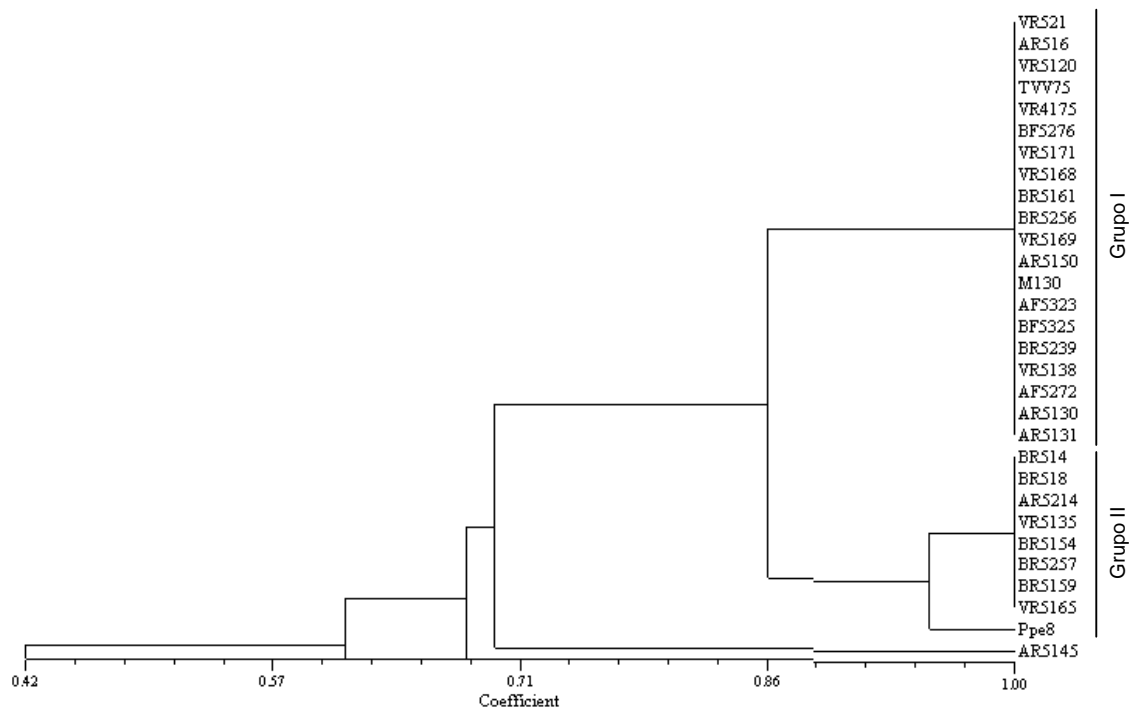


Figura 8. Dendrograma de similaridade de estirpes de referência de *Burkholderia brasiliensis*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia tropica* e de isolados caracterizados morfológicamente com *Burkholderia* spp. Este dendrograma foi gerado pelo programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir dos perfis de restrição gerados pela técnica de ARDRA.

2.5.4.5 Isolados caracterizados morfológicamente como não identificados

A análise da diversidade genética dos isolados denominados “não identificados” com base na caracterização morfológica, foi feita com 37 isolados representativos das diferentes partes da planta e das diferentes amostras de solo (Tabela 14). Estes isolados foram obtidos dos meios de cultivo NFB, LGI e LGIP. Os produtos de amplificação da região 16S do DNAr foram digeridos com as enzimas de restrição *AluI*, *RsaI* e *HinfI*. A restrição dos fragmentos amplificados por estas enzimas mostrou grande diversidade entre os isolados analisados, gerando um total de 11 perfis polimórficos (Figura 9). Na Tabela 15 encontram-se os padrões de restrição gerados por estas enzimas, onde pode se observar que o tipo de perfil 1 foi mais comum no solo de Bacabal e Arari e os tipos de perfil 4, 6 e 8 só apareceram no solo de Vitória do Mearim. Além disso, houve influência do meio de cultivo no qual estes isolados foram obtidos. Dentre os isolados avaliados, obtidos dos meios NFB e LGIP, mais da metade formou o mesmo perfil que o das estirpes M130 e TVV75, já os que foram obtidos do meio LGI mostraram-se mais diversos. Apenas quatro desses isolados analisados agruparam com as estirpes M130 e TVV75. Os demais formaram vários grupos, sendo três destes com apenas um isolado cada.

A análise de agrupamento mostrou que a maioria dos isolados (54%) dos isolados analisados se agruparam com as estirpes M130 de *B. brasiliensis* e TVV75 de *B. vietnamiensis* com 100% de similaridade (Grupo II). O grupo I foi formado por cinco isolados que apresentaram 92% de similaridade com as estirpes de referência M130 e TVV75, já o grupo III, foi formado por isolados que apresentaram maior similaridade (96%) com a estirpe Ppe8 de *B. tropica*. (Figura 10).

Tabela 14. Origem dos isolados classificados pertencentes ao grupo “não identificados” e utilizados para a caracterização genética.

Isolados	Parte da planta	Meio de cultivo	Solo
AR111	RL	NFB	Arari
AR112	RL	NFB	Arari
AR223	RD	NFB	Arari
AF134	PA	NFB	Arari
BR115	RL	NFB	Bacabal
BR116	RL	NFB	Bacabal
BF137	PA	NFB	Bacabal
BF138	PA	NFB	Bacabal
BR129	RL	NFB	Bacabal
AR1210	RD	NFB	Arari
AR1111	RL	NFB	Arari
BR1212	RL	NFB	Bacabal
AR4213	RD	LGIP	Arari
AF4214	PA	LGIP	Arari
AR4115	RL	LGIP	Arari
AR4116	RL	LGIP	Arari
BR4217	RD	LGIP	Bacabal
BF4218	PA	LGIP	Bacabal
BR4119	RL	LGIP	Bacabal
BR4120	RL	LGIP	Bacabal
VF4321	PA	LGIP	V. do Mearim
VR4122	RL	LGIP	V. do Mearim
VR4123	RL	LGIP	V. do Mearim
VR4124	RL	LGIP	V. do Mearim
BR4225	RD	LGIP	Bacabal
AR3226	RD	LGI	Arari
AR3127	RL	LGI	Arari
AR3128	RL	LGI	Arari
AR3229	RL	LGI	Arari
BF3330	PA	LGI	Bacabal
BR3131	RL	LGI	Bacabal
BR3132	RL	LGI	Bacabal
BF3233	PA	LGI	Bacabal
VR3234	RD	LGI	V. do Mearim
VR3135	RL	LGI	V. do Mearim
VR3236	PA	LGI	V. do Mearim
VR3137	RL	LGI	V. do Mearim

RL – Raiz lavada; RD – Raiz desinfestada; PA – Parte aérea.



Figura 9. Perfil eletroforético de restrição dos fragmentos da região 16S DNAr de estirpes de referência de novos isolados. Restrição com *AluI*. Legenda: 1 (marcador de 100 pb), 2 (BR4119) 3 (BR4120), 4 (VF4321), 5 (VR4122), 6 (VR4123), 7 (VR4124), 8 (BR4225), 9 (AR3226), 10 (AR3127), 11 (AR3128), 12 (AR3229), 13 (BF3330), 14 (BR3131), 15 (BR3132), 16 (BF3233), 17 (VR3234), 18 (VR3135), 19 (VR3236), 20 (marcador de 100 pb).

Tabela 15. Perfil eletroforético de restrição dos fragmentos da região 16S DNAr de estirpes de referência *Burkholderia brasiliensis*, *Burkholderia tropica*, *Burkholderia vietnamiensis* e de novos isolados não identificados pelas características morfológicas.

Estirpes e isolados	Perfis de restrição			Tipos de perfis
	<i>AluI</i>	<i>Hinfl</i>	<i>RsaI</i>	
M130, TVV75	A*	A	A	1
Ppe8	B	A	E	2
AR112, BR115, BF137, BF138, BR129, AR1210, BR1212, AF4214, AR4115, AR4116, BR4217, BF4218, BR4120, VR4122, VR4124, BR4225, AR3226, BR3132, BF3233	A	A	A	1
AR4213	A	A	B	3
VF4321, VR4123	A	B	B	4
AR1111, VR3236	A	D	D	5
VR3234, VR3137	B	C	D	6
AR111, BR116, AR3127, AR3229, BF3330,	C	A	A	7
VR3135	B	E	D	8
BR3131	D	C	E	9
AF134, AR3128	C	E	C	10
AR223	C	D	D	11

*As letras representam o tipo de perfil gerado por cada enzima.

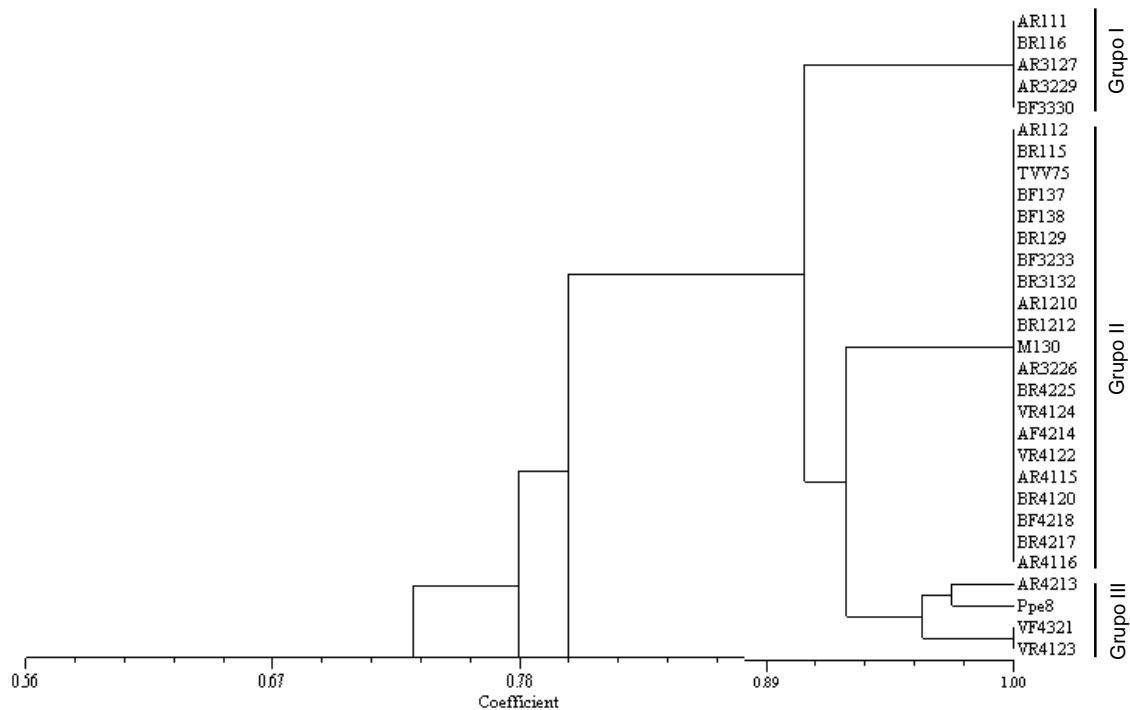


Figura 10. Dendrograma de similaridade de estirpes de referência de *Burkholderia brasiliensis*, *Burkholderia tropica*, *Burkholderia vietnamiensis* e de isolados caracterizados morfológicamente como “não identificados”. Este dendrograma foi gerado pelo programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir dos perfis de restrição gerados pela técnica de ARDRA.

2.6 Conclusões

Foram isoladas bactérias diazotróficas agrupados de acordo com a caracterização morfológica e pela técnica de ARDRA, como pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*.

A análise de diversidade genética mostrou que houve alta diversidade entre os isolados obtidos, principalmente os do gênero *Burkholderia*.

Foram encontrados isolados bacterianos eficientes na produção de ácido indol-acético e capazes de fixar N_2 , portanto apresentam potencial para promover o crescimento vegetal quando inoculados em plantas.

3 CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZÓTROFICAS NA PRODUÇÃO DE GRÃOS EM DIFERENTES CULTIVARES DE ARROZ TRADICIONAIS

3.1 Resumo

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento de grande importância por ser uma excelente fonte de carboidratos e proteínas. Pela sua grande adaptabilidade edafoclimática é considerado pela FAO como o alimento mais importante para a segurança alimentar do mundo. O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados diazotróficos nativos do estado do Maranhão com base na habilidade destes em promover o crescimento de plantas. Para isso, foram instalados experimentos em condições gnotobióticas, em vasos e em campo. Foram testados três isolados representativos de cada grupo, com base na produção de AIA e ARA e que foram inoculados em 10 variedades tradicionais de arroz do estado do Maranhão. Após a inoculação as plantas foram crescidas por 30 dias em solução de Hoaglands em tubos de ensaio. Foi observado efeito positivo dos tratamentos de inoculação de alguns isolados na promoção do crescimento das plantas crescidas em condições gnotobióticas. Em vasos foram testados sete isolados em associação com nove genótipos de arroz. Foi observado efeito dos tratamentos de inoculação na produção de massa seca da parte aérea, no rendimento de grãos e na massa de mil grãos, sendo que este efeito foi dependente do genótipo da planta. Em condições de campo foram testados cinco isolados em associação com três genótipos de arroz e não foi observado interação entre tratamentos de inoculação e genótipos para os parâmetros estudados. Entretanto houve efeito simples dos tratamentos de inoculação na produção de grãos, sendo que os isolados *Herbaspirillum* sp. AR1122 e *A. amazonense* AR3122 apresentaram maior potencial para promover o crescimento das plantas e aumentar a produção de grãos na cultura do arroz.

3.2 Abstract

The rice (*Oryza sativa* L.) is an important source of carbohydrate and proteins. Due to great edaphoclimatic adaptability it is considered by FAO as the most important food for supplying the hungary of the World. The aim of this work was to select native diazotrophic bacteria isolated from soil of the Maranhão State based on their ability to promote growth of rice plants. Experiments were carried out in gnotobiotic, pots and field conditions. Isolates selected based on the production of AIA and ARA were evaluated in association with ten traditional varieties of rice grown in Hoaglands solution for 30 days. A positive effect on growth promotion of the plants was observed for some isolates as compared to the non-inoculated plants. Seven isolates were tested in association with nine genotypes of rice grown in pots. The results showed an effect of the inoculation on dry mass production of aerial part, grain yield and mass of thousand grains, and this effect was dependent on the plant genotype. In the field conditions, five isolates were tested with three rice cultivars and no interaction was observed between the inoculation treatments and genotypes for the studied parameters. Nevertheless, it was observed that among the isolates tested, the *Azospirillum amazonense* AR3122 and *Herbaspirillum* sp AR1122 showed potential to promote growth of rice plants and to increase the grain yield of this crop.

3.3 Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento de grande importância para população mundial. Nos próximos anos, haverá a necessidade de se aumentar a produção mundial de arroz para atender a demanda do crescimento populacional. As práticas agrícolas existentes para atingir este objetivo requerem o uso de grandes quantidades de adubos nitrogenados, uma vez que o nitrogênio é o principal nutriente que limita o crescimento de plantas em muitos ecossistemas, sendo que a redução do uso destes compostos é um objetivo a ser atingido pela agricultura moderna. O nitrogênio molecular (N_2) compõe 78% dos gases da atmosfera e pode ser fixado ou transformado em formas mais reduzidas, como NH_3 , que podem ser assimiladas pelas plantas por processos biológicos mediados principalmente por bactérias (NEVES e RUMJANEK, 1998).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a maior responsável pelo aporte de nitrogênio nos sistemas biológicos, contribuindo com cerca de 65% do nitrogênio fixado (NEWTON, 2000), fornecendo o nitrogênio necessário para o desenvolvimento vegetal diretamente para as plantas por meio de associações, ou quando os organismos morrem e o libera no ambiente (LINDERMAN e GLOVER, 2003). As gramíneas são capazes de associar-se com diversas espécies de bactérias diazotróficas (KENNEDY et al., 2004). Experimentos recentes têm demonstrado que plantas de arroz podem se beneficiar da associação com bactérias diazotróficas, aumentando a produção quando inoculadas (TRAN VAN et al., 2000; GOVINDARAJAN et al., 2008; RODRIGUES et al., 2007).

Existem diferenças consideráveis entre genótipos de arroz quanto à obtenção de nitrogênio por meio da FBN (CAMPOS, 1999; BALDANI et al., 2000). No entanto, os fatores envolvidos nestas diferenças não são bem conhecidos. A presença de um alto número de células bacterianas diazotróficas, associadas às raízes de plantas de arroz, não significa, necessariamente que as plantas sejam beneficiadas com quantidades significativas de nitrogênio via FBN (BODDEY et al., 1995). REIS JUNIOR (1998) não observou diferença entre a população de bactérias diazotróficas presentes em genótipos de cana-de-açúcar ditos eficientes quanto ao potencial de FBN em relação aos não eficientes. Também, CAMPOS (1999) visando identificar genótipos de arroz mais eficientes quanto a obtenção de nitrogênio via fixação biológica, constatou que não houve diferença na população de bactérias diazotróficas entre os genótipos considerados eficientes e os ineficientes.

Alguns estudos indicam que a promoção do crescimento em plantas de arroz não está diretamente associada à fixação biológica de nitrogênio, mas a outros mecanismos (SUTRZ et al., 2000; PENG et al., 2002). A promoção de crescimento pode ser o resultado de diversos mecanismos como indução de resistência a patógenos, aumento da disponibilidade de nutrientes pela solubilização de nutrientes minerais precipitados, e/ou produção de fitohormônios que induzem a formação de pêlos radiculares adicionais ou raízes laterais, produção de sideróforos e pela fixação de nitrogênio (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; BISWAS et al., 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001; GOVINDARAJAN et al., 2008).

Numerosos resultados positivos têm sido obtidos, no aumento da produção de arroz devido a inoculação com bactérias diazotróficas. No entanto os resultados são inconsistentes e isso tem dificultado a obtenção de um produto comercial (BASHAN, 1998). Isto pode ser atribuído, em parte, a fatores ecológicos e ambientais como características físicas e químicas do solo e capacidade dos microrganismos de se estabelecerem e competirem com a comunidade microbiana nativa (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados diazotróficos nativos do Estado do Maranhão com base na habilidade destes em promover o crescimento de plantas de arroz e aumentar a produção de grãos.

3.4 Material e Métodos

3.4.1 Avaliação preliminar das variedades e cultivares utilizadas para seleção de estirpes

Foram utilizadas 17 variedades tradicionais de arroz provenientes de pequenos produtores de arroz do estado do Maranhão (Tabela 16), sendo cinco com baixo teor de proteína total nos grãos (Cutião, Cana Forte, Pingo D'água, Palha Murcha, Lajeado sem Pelo), cinco com médio teor de proteína nos grãos (Bacabinha Roxo, Bacaba Comprido, Zebu Branco, Lajeado Liso, Rabo de Burro) e cinco com alto teor de proteína (Cana Roxa, Zebu Branco (caru), Bacabinha, Braquiária e Arroz 70) (ARAÚJO et al., 2003) acrescidas de seis cultivares melhoradas (CNA4899, CNA7553, CNA8172, CNA3490, IR42 e IAC4440). Dado a necessidade de multiplicar as sementes, para serem utilizadas nos experimentos de inoculação *in vitro* e em vasos, foi instalado um experimento, em casa de vegetação, em vasos contendo 4 kg de terra adubada de acordo com o recomendado para a cultura com base na análise de solo.

Tabela 16. Genótipos de arroz utilizados para a multiplicação de sementes.

Genótipo	Teor de proteína	Local de origem	Procedência
Arroz 70		V. do Mearim	Araújo (2003)
Bacabinha		V. do Mearim	Araújo (2003)
Cana Roxa	Alto (>8%)	Viana	Araújo (2003)
Manteiga		Penalva	Araújo (2003)
Zebú Branco		Viana	Araújo (2003)
Bacaba Comprido		V. do Mearim	Araújo (2003)
Bacabinha Roxo		V. do Mearim	Araújo (2003)
Braquiária	Médio (7-8%)	V. do Mearim	Araújo (2003)
Come Cru Vermelho		Miranda Norte	Araújo (2003)
Pingo D'água		Viana	Araújo (2003)
Zebú Branco (Caru)		V. do Mearim	Araújo (2003)
Cana Forte		Miranda Norte	Araújo (2003)
Cutião		Viana	Araújo (2003)
Lajeado sem Pêlo	Baixo (6-7%)	Arari	Araújo (2003)
Lajeado Liso		V. do Mearim	Araújo (2003)
Palha Murcha		Penalva	Araújo (2003)
Rabo de Burro		Penalva	Araújo (2003)
Melhoradas			
CNA4899			
CNA7553			Embrapa Arroz e Feijão
CNA8172			
CNA3490			
IR42			IRRI
IAC4440			IAC

Os vasos foram dispostos inteiramente ao acaso em bancadas em casa de vegetação com quatro repetições. As plantas foram coletadas à medida em que atingiam a fase de

maturação das sementes, quando foram separadas em panículas e palha e foram determinados a produção de matéria seca total, o número de panículas por vaso, a percentagem de espiguetas cheias e estéreis por panícula, a altura das plantas, a massa de mil sementes, o teor de N das sementes e da parte aérea e a proteína bruta das sementes. A percentagem de espiguetas cheias e estéreis por panícula foi determinada em três panículas, apanhadas ao acaso de cada repetição, utilizadon-se o valor médio para cada repetição. A massa de mil sementes foi determinada em amostras de 100 sementes de cada repetição e multiplicando-se cada valor por 10, a fim de obter a referida massa.

As avaliações dos teores de N foram realizadas na Embrapa Agrobiologia, de acordo com o método proposto por TEDESCO et al. (1995). As amostras da parte aérea das plantas foram colocadas em estufa de circulação forçada a 65°C até peso constante e o material seco foi moído e utilizado para análise de teor de N. Os grãos foram descascados a mão e moídos, amostras de 200 mg de farinha de arroz foram digeridas com ácido sulfúrico e água oxigenada e após a destilação, obteve-se o teor de N. O conteúdo de proteína bruta dos grãos foi calculado pelo teor de N multiplicado pelo fator 5,95. Este fator é baseado no conteúdo de nitrogênio (16,8%) da principal proteína do arroz, a glutelina (JULIANO, 1985).

3.4.2 Seleção de estirpes em condições gnotobióticas

Os isolados que apresentaram maior produção de AIA *in vitro*, foram inoculados, em condições gnotobióticas, em 10 variedades tradicionais de arroz do Maranhão, sendo cinco com alto teor de proteína bruta (Zebu Branco, Arroz 70, Cana Roxa, Bacabinha, e Braquiária) e cinco com baixo teor de proteína bruta (Cana forte, Come Cru Vermelho, Pingo D'água, Lajeado Liso e Bacaba Comprido) (ARAÚJO et al., 2003). Além disso, foi incluída a cultivar IR42 utilizada como controle. Os ensaios foram conduzidos em tubos de ensaio transparentes com 120 mL de capacidade, contendo 60 mL de solução de Hoaglands, sem nitrogênio, em 6 g de agar . L⁻¹ (BALDANI et al., 2000). Foram conduzidos dois experimentos. No primeiro, foram utilizados 10 isolados, sendo três de *Herbaspirillum* ssp. (VR2117, AR1122 e AR1124), três de *Azospirillum* ssp. (BR2113, AR1135 e BF1358), três de *Azospirillum amazonense* (VR218, VF2213 e AR3122) e um de *Sphingomonas* spp. (AR2112). A estirpe ZAE94 de *Herbaspirillum seropedicae* foi utilizada com controle positivo, além de um tratamento controle inoculado com células mortas de ZAE94. No segundo experimento foram utilizados três isolados de *Burkholderia* ssp. (BF5327, BF5276 e BF4231), além da estirpe ZAE94 e do tratamento controle inoculado com células mortas por autoclavagem.

A inoculação foi realizada antes da solidificação do meio (40 a 45°C) com 1 mL da cultura líquida de cada estirpe, crescida no meio DYGS por 16 horas contendo 10⁹ células mL⁻¹ e o controle foi inoculado com 1 mL⁻¹ células previamente autoclavadas. Antes do plantio, as sementes foram desinfestadas e pré-germinadas em placas de ágar-água (1%), por dois dias a 30°C. Apenas as sementes livres de contaminantes microbianos foram plantadas (BALDANI et al., 2000).

Os tubos com as plântulas foram mantidos em casa de bio-segurança a 25°C por 30 dias. Após este período as plantas foram retiradas do meio e lavadas em água corrente para eliminar resíduos do meio e postas para secar em papel toalha para retirar o excesso de umidade e determinada a massa fresca. A massa seca foi determinar após as amostras serem levadas à estufa de circulação de ar forçado a 65°C por 72 horas.

Os experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, sendo o primeiro, 11 x 12 (11 genótipos e 12 tratamentos de inoculação) e o segundo, 11 x 5 (11 genótipos e 5 tratamentos de inoculação) ambos com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias testadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.4.3 Seleção de estirpes em condições de vasos e em campo

3.4.3.1 Experimento em vasos

Os isolados que proporcionaram maior acúmulo de massa seca nas plantas de arroz, quando comparados com o controle positivo ZAE94 foram testados simultaneamente em dois experimentos de inoculação, um em vasos e outro em campo. O experimento em vasos foi instalado no dia 20 de janeiro de 2007 na Embrapa Agrobiologia em Seropédica, RJ, e o de campo no dia 08 de fevereiro de 2007 na Embrapa Meio Norte em Teresina, PI.

O experimento em vasos foi instalado em vasos plásticos, pintados externamente com tinta alumínio, contendo 4 kg de terra fina seca ao ar destorroada e peneirada proveniente de um Planossolo série ecológica. Os vasos foram mantidos ao ar livre, entre as casas de vegetação, na área experimental da Embrapa Agrobiologia dispostos em blocos ao acaso em esquema fatorial (nove tratamentos de inoculação x nove genótipos) com quatro repetições. Os tratamentos consistiram da inoculação das sementes de cada genótipo com dois isolados de *Azospirillum* spp.: BR2113 e BF1358; dois de *A. amazonense* VR218 e AR3122; dois de *Herbaspirillum* spp. AR1122 e AR1124; e um de *Sphingomonas* spp. AR2112. A estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* foi utilizada como controle positivo, além da testemunha nitrogenada que recebeu 100 kg de nitrogênio na forma de nitrato de amônio dividido em três aplicações, sendo, 20 kg ha⁻¹ no início do perfilhamento, 40 kg ha⁻¹, 50 dias após emergência e 40 kg ha⁻¹ aos 75 dias após emergência.

Uma semana antes do plantio, procedeu-se a adubação com base na análise química do solo. Os resultados da análise do solo encontram-se na Tabela 17. Foi aplicada em cada vaso uma dose equivalente a 120 kg de P₂O₅ ha⁻¹ na forma de superfosfato simples e micronutrientes na dose equivalente a 60 kg de FTE BR-12 ha⁻¹. No início do perfilhamento (25 dias após a emergência) em todos os tratamentos foi aplicada uma solução de NH₄NO₃ na dose equivalente a 10 kg de N ha⁻¹ e uma de K₂SO₄ na dose 30 kg ha⁻¹. Posteriormente, aos 50 dias após a emergência foi aplicada outra dose de NH₄NO₃ equivalente a 10 kg de N ha⁻¹.

Tabela 17. Análise química das amostras de solo utilizadas nos experimentos em vasos e de campo.

Solos	PH/H ₂ O	Al cmol _c dm ⁻³	Ca + Mg	Ca mg dm ⁻³	Mg	P	K
RJ	5,8	0,1	0,7	0,5	0,2	17,3	45,6
PI	6,1	0,1	7,4	5,9	1,5	7,8	310,0

No experimento em vasos foram utilizadas seis variedades tradicionais de arroz do estado do Maranhão, sendo três com alto teor de proteína total nos grãos (Zebu Branco, Arroz 70 e Braquiária) e três com e baixo teor de proteína total (Cana forte, Come Cru Vermelho e Pingo D'água) (ARAÚJO et al., 2003). Além disso, foram usadas duas cultivares recomendadas para o estado do Maranhão (Bonança e Canastra). A cultivar IR42 foi utilizada como controle positivo.

As suspensões bacterianas utilizadas no preparo do inoculante foram obtidas a partir de culturas puras crescidas por 16 horas em meio Dygs sob agitação. Após esse período, a concentração das suspensões foi determinada por meio da densidade ótica em espectrofotômetro com comprimento de onda de 620 nm e foi ajustada para aproximadamente 109 células mL⁻¹. O inoculante foi preparado adicionando-se 15 mL da suspensão de cada

bactéria, em sacos de polietileno contendo 35 g de turfa (previamente moída, seca, corrigida a acidez e esterilizada). As sementes foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 1%, por 10 minutos, em seguida, de quatro lavagens com água destilada estéril e colocadas para secar em fluxo laminar por duas horas. Estas sementes foram inoculadas, utilizando-se uma proporção de 10 g do inoculante por kg de semente, empregando-se uma solução de goma arábica a 10% para fixar o inoculante às sementes e, em seguida, foram colocadas para secar à sombra antes da utilização.

Cada vaso foi considerado como uma parcela experimental, onde foram plantadas oito sementes, sendo feito o desbaste após a emergência, deixando-se três plantas uniformes por vaso. No início da fase de florescimento foi retirada uma planta para contagem das bactérias nos tecidos vegetais, mantendo-se duas até o término do ciclo da cultura.

As plantas foram coletadas à medida em que atingiam a fase de maturação dos grãos, sendo cortadas rente ao solo e separadas em panículas e palha. Os seguintes parâmetros foram efetuados as seguintes avaliações: altura das plantas, número de panículas, número de grãos por panícula, massa de 1000 grãos, produção de massa seca da parte aérea e produção de grãos, teor de N da parte aérea e proteína bruta dos grãos.

A altura das plantas foi determinada medindo-se à distância da base da planta até o ápice das folhas bandeira com os limbos distendidos, a massa de 1000 grãos foi determinada pesando-se em balança analítica 100 grãos por parcela e multiplicando-se por 10 sendo os resultados corrigidos para 13% de umidade dos grãos. A massa seca da parte aérea foi obtida pela pesagem das amostras após terem secado em estufa de circulação de ar forçada à temperatura de 65°C até atingirem peso constante. A produção de grãos foi determinada para cada parcela, corrigida para 13% de umidade expressos em gramas por vaso. As avaliações dos teores de N foram realizadas conforme descrito anteriormente.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4.3.2 Experimento em campo

No experimento em condições de campo foram utilizadas duas variedades típicas do Maranhão, sendo uma com alto teor de proteína bruta do grão (Arroz 70) e uma com baixo teor de proteína bruta do grão (Cana Forte), além da cultivar Bonança recomendada para a região e utilizada como controle. Foram utilizados quatro isolados (AR3122 de *A. amazonense*, AR1122 de *Herbaspirillum* spp., BR2113 de *Azospirillum* spp., AR2112 de *Sphingomonas* spp.), além da estirpe ZAE94 e um controle com 100 kg ha⁻¹ de nitrogênio mineral.

O experimento foi instalado no campo experimental da Embrapa Meio-Norte em Teresina, PI, adotando-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, em esquema fatorial (seis tratamentos de inoculação x três genótipos de arroz de sequeiro) com quatro repetições. Os tratamentos consistiram da inoculação das sementes de cada genótipo com cada uma das bactérias diazotróficas, mais a testemunha nitrogenada. As sementes foram misturadas à turfa na proporção de 10⁹ células por grama de turfa, utilizando-se uma proporção de 10 g do inoculante por kg de semente e, em seguida, secas à sombra antes da utilização. Foram plantadas 100 sementes por metro linear.

Cada parcela ocupou 3 m² (1,5 x 2 m) com cinco linhas de 2,0 m de comprimento espaçadas de 0,30 m, sendo a área útil constituída pelas 3 linhas centrais, desprezando-se 0,5 m em ambas as extremidades de cada linha.

A adubação foi realizada de acordo com o recomendado para a cultura com base na análise de solo, aplicando-se 120 kg de P₂O₅ ha⁻¹ na forma de superfosfato simples e 60 kg de K₂O ha⁻¹ na forma de cloreto de potássio no plantio. O nitrogênio (20 kg ha⁻¹) na forma de

uréia) foi aplicado em cobertura, 20 dias após a emergência das plantas em todos os tratamentos. Os tratos culturais foram os recomendados para a cultura.

Na ocasião da colheita foram avaliados os seguintes parâmetros: altura das plantas, medindo-se, ao acaso, cinco plantas por parcela, a distância da superfície do solo até o ápice das folhas bandeira com o limbo destendido; número de panículas, mediante contagem na área útil de cada parcela; número de grãos por panícula, amostrando-se ao acaso 10 panículas em cada parcela; massa de 1.000 grãos, pesando-se em balança analítica 100 grãos oriundos das 10 panículas coletadas ao acaso multiplicado por 10 e os resultados expressos em peso de 1.000 grãos e corrigidos para 13% de umidade; produção de massa seca, obtida pela pesagem de amostras de cinco plantas por parcela coletadas ao acaso e colocadas para secar em estufa à temperatura de 65°C, até atingirem peso constante. A produção de grãos foi determinada com base na área útil de 1 m² por parcela, nas quais se determinou o peso e umidade dos grãos, sendo os resultados expressos em Mg ha⁻¹, a 13% de umidade.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.5 Resultados e Discussão

3.5.1 Avaliação de características agrônômicas das variedades e cultivares utilizadas para a seleção de estirpes

As variedades tradicionais Lajeado Liso, Lajeado sem Pelo e Rabo de Burro, apresentaram um ciclo mais longo (180 dias) e maior produção de matéria seca total e número de panículas por vaso em relação aqueles de ciclo mais curto (Tabela 18). As variedades tradicionais apresentaram maior altura o que pode favorecer-las na competição com plantas invasoras, podendo ser uma vantagem no sistema de cultivo de roça em toco, comum no estado do Maranhão. Houve diferença na massa de mil sementes entre os genótipos. Esta é uma variável estável dentro da variedade, porém dependente da translocação de carboidratos que tem sua síntese e remobilização influenciadas pelas condições ambientais. Todos os genótipos apresentaram uma alta percentagem de espiguetas estéreis (dados não mostrados), embora tenha havido diferença entre estes, isto pode ter ocorrido em função das altas temperaturas observadas durante o período reprodutivo.

Houve diferença significativa para o teor de N na palha e nas sementes e de proteína bruta entre os genótipos estudados (Tabela 19). As variedades de Lajeado (sem Pelo e Liso) apresentaram menor teor de proteína nos grãos, resultados estes que estão de acordo com ARAUJO et al. (2003) que observaram menor teor de proteína nos grãos nestas variedades. De um modo geral, as cultivares apresentaram um teor de proteína mais elevado que os observados por ARAUJO et al. (2003) quando trabalharam com as mesmas variedades procedentes do estado do Maranhão. Também FERRAZ JUNIOR et al. (2001) observaram que algumas variedades apresentaram teores diferentes de proteína bruta quando cultivadas no Rio de Janeiro ou no Maranhão enquanto que para outras variedades não houve alteração neste parâmetro. Segundo JULIANO (1985), os teores de proteína bruta dos grãos podem variar muito, devido a mudanças nas condições ambientais, sendo que para o arroz, a disponibilidade de N é um dos principais fatores ambientais que afetam o teor de proteína bruta dos grãos.

Tabela 18. Biomassa da parte aérea e número de panículas, número de espiguetas, massa de mil sementes, altura das plantas e ciclo em dias de 23 genótipos de arroz cultivados em vaso.

Genótipo	Biomassa seca de palha (g)	Número de panículas	Número de espiguetas por panícula	Massa de 1000 sementes (g)	Altura das plantas (cm)	Ciclo (dias)
Cutião	14,35D*	5,25B	68,33C	31,45C	101	120
IAC4440	23,23B	10,50A	77,66C	24,88F	80	120
IR42	24,89B	9,25A	91,33B	22,45G	81	135
Arroz 70	12,85E	6,00B	47,5F	33,86B	91	135
Bacabinha	13,88D	4,00C	125,00A	20,65H	112	135
Cana Roxa	16,40C	4,25C	85,33B	28,43D	117	135
Manteiga	16,37D	4,25C	109,16A	21,82G	107	135
Zebu Branco	14,76D	4,00C	95,58B	28,82D	125	135
Braquiária	17,78C	4,75C	72,25C	25,22F	121	135
Bacaba Comprido	16,94C	5,25B	83,83B	30,98C	120	135
Bacabinha Roxo	11,19E	3,00C	94,25B	27,33E	105	135
Come Cru Vermelho	15,01D	5,75B	73,00C	30,58C	103	135
Pingo D'água	17,10C	6,75B	61,49D	26,26F	118	135
Zebu Branco (Caru)	11,72E	3,50C	89,45B	29,45D	118	135
Cana Forte	15,35D	4,50C	62,75D	27,52E	106	135
Palha Murcha	14,43D	5,00C	65,00C	36,36A	103	135
CNA4899	22,93B	10,00A	78,00C	22,36G	75	135
CNA7553	22,68B	11,50A	77,66C	22,45G	76	135
CNA8172	09,52E	4,50C	73,50C	25,81F	69	135
Lajeado Liso	46,58A	10,75A	69,75C	23,55G	115	180
Lajeado sem Pelo	46,77A	10,50A	82,16E	21,95G	118	180
Rabo de Burro	20,52B	6,00B	105,91A	22,01G	99	180
CNA3490	17,63C	7,75B	62,75D	19,69H	70	180
C.V. (%)	11,16	9,20	7,5	3,78		

* Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 19. Teor de N nas sementes e na parte aérea e teor de proteína bruta total de 23 genótipos de arroz.

Genótipo	Teor de N na semente (%)	Teor de N na palha (%)	Proteína bruta
Arroz 70	1,55A*	0,45E	9,24A
Bacabinha	1,52A	0,452E	9,02A
Cana Roxa	1,43B	0,42E	8,48B
Manteiga	1,39B	0,44E	8,27B
Zebu Branco	1,36B	0,43E	8,08B
Braquiária	1,44B	0,38E	8,54B
Bacaba Comprido	1,34B	0,37E	7,96B
Bacabinha Roxo	1,42B	0,45E	8,46B
Come Cru Vermelho	1,33B	0,36E	7,87B
Pingo D'água	1,45B	0,35E	8,63B
Zebu Branco (Caru)	1,34B	0,42E	7,94B
Cana Forte	1,35B	0,49C	8,04B
Palha Murcha	1,38B	0,44E	8,21B
Cutião	1,42B	0,49E	8,24B
Lajeado Liso	1,08D	0,79B	6,38C
Lajeado sem Pelo	1,11D	0,72C	6,61C
Rabo de Burro	1,39B	0,81B	8,28B
CNA4899	1,54A	0,55D	9,14A
CNA7553	1,39B	0,49D	8,32B
CNA8172	1,68A	0,64C	9,96A
CNA3490	1,32B	0,98A	7,82B
IR42	1,32B	0,54D	7,82B
IAC4440	1,23C	0,58D	7,34B
C.V. (%)	7,10	13,61	7,10

* Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.5.2 Avaliação e seleção de isolados de bactérias diazotróficas em associação com diferentes variedades de arroz crescidas em condições gnotobióticas

Os resultados obtidos nos experimentos de inoculação em condições gnotobióticas, não mostraram interação entre as estirpes inoculadas e os genótipos das plantas testados (Tabela 20). Embora tenha havido diferença entre as estirpes inoculadas quanto acúmulo de matéria seca pelas plantas, não foi observado efeito positivo da inoculação para os diferentes genótipos de arroz, sendo observado até efeito negativo na maioria das estirpes inoculadas quando comparadas com o controle não inoculado (Tabela 21). Somente os isolados AR3122 de *A. amazonense* e AR2112 de *Sphingomonas* spp. não promoveram a diminuição da produção de matéria seca quando comparados com o controle não inoculado. FERREIRA et al. (2003) também não observaram interação entre estirpes de *H. seropedicae* ZAE94 e *B. brasilensis* M130 e as variedades de arroz IR42 e IAC4440 em condições gnotobióticas, embora não tenha sido observado efeito inibitório no crescimento das plantas. Entre 80 isolados testados em condições gnotobióticas apenas quatro apresentaram efeito positivo para o crescimento de plantas (BALDANI et al., 2000).

Tabela 20. Acúmulo de massa seca (mg) em 11 genótipos de arroz inoculadas com diferentes isolados bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em condições gnotobióticas.

Isolados	Cana Roxa	Zebu Branco	Bacabinha	Braquiária	Arroz 70	Bacaba comprido	Pingo D'água	Lageado Liso	Cana Forte	Come Cru	IR42	Média
AR3122	62,3*	52,0	44,7	61,0	58,2	52,0	51,2	52,7	63,0	58,5	51,2	55,2a
AR2112	55,5	47,0	42,0	51,2	60,7	58,5	47,2	43,0	48,2	55,2	45,5	50,4ab
VR218	57,5	46,5	45,3	50,7	58,0	47,0	47,7	38,0	48,2	50,0	45,5	48,0ab
VF2213	44,3	51,0	40,7	46,7	54,0	46,2	40,0	27,5	41,5	53,7	41,0	44,0bc
BF1358	36,0	37,7	32,7	52,2	51,7	46,5	34,7	24,7	27,7	41,7	48,7	39,5cd
AR1135	33,5	40,5	25,0	37,7	35,2	40,0	36,0	23,0	30,2	40,2	30,0	33,7de
AR1124	34,0	28,5	24,7	32,0	42,7	32,0	32,7	15,5	25,7	41,2	31,2	30,9ef
BR2113	40,7	29,7	13,0	36,0	37,2	37,7	27,2	23,0	35,2	27,5	31,0	30,7ef
VR2117	37,0	25,0	19,7	31,5	35,0	37,2	27,7	24,2	27,7	36,5	23,0	29,5f
AR1122	35,5	29,7	27,2	26,5	31,7	38,2	23,2	15,0	31,7	34,2	25,5	28,0f
ZAE94 (controle positivo)	40,3	41,0	35,7	35,0	43,2	47,3	35,0	31,2	43,2	34,2	38,5	38,6cd
Testemunha absoluta	48,5	51,0	48,2	56,7	60,2	50,7	50,0	43,0	42,5	61,5	42,2	50,7ab
Média	43,7AB	39,9AB	33,3CD	43,1AB	47,3A	44,4AB	37,7CD	30,0D	38,7BC	44,5AB	37,5BC	
C.V. (%)	28,00											

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para cultivares e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O efeito negativo pode ter ocorrido em função do alto número de células utilizadas no inóculo o que pode ter desencadeado uma resposta defensiva da planta. JAMES et al. (2002) observaram que a colonização muito agressiva por *H. seropedicae* na cultivar IR72 ocasionou uma resposta defensiva da planta à colonização com efeitos negativos ao crescimento vegetal. A resposta da planta ao AIA, liberado por bactérias, pode variar de efeito benéfico a inibitório dependendo da concentração. Quando a concentração de AIA endógeno nas raízes já se encontra em níveis ótimos para o crescimento, o AIA adicional liberado pelas bactérias pode alterar o metabolismo da planta e afetar o crescimento (BARAZANI e FRIEDMAN, 1999). Estes autores observaram que altas concentrações de AIA, produzido por bactérias, inibiram o crescimento de raízes de alface em condições axênicas.

Tabela 21. Acúmulo de massa seca (mg) em 11 genótipos de arroz inoculados com bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em condições gnotobióticas.

Isolados	Cana Roxa	Zebu Branco	Bacabinha	Braquiária	Arroz 70	Bacaba comprido	Pingo D'água	Lageado Liso	Cana Forte	Come Cru	IR42	Média
BF4231	44,0*	36,5	28,3	37,2	49,0	45,2	37,2	33,0	42,7	55,5	38,5	40,6b
BF5327	36,5	44,5	32,0	40,7	43,5	44,2	38,2	24,2	43,5	48,7	40,7	39,7b
BF5276	45,5	36,5	31,7	35,2	54,0	41,0	40,7	34,0	35,0	43,2	34,5	39,2b
ZAE94 (controle positivo)	40,2	41,0	35,7	35,0	43,2	47,2	35,0	31,2	43,5	34,2	38,5	36,6b
Testemunha absoluta	48,5	51,0	48,3	56,7	60,2	50,7	50,0	43,0	42,5	61,5	45,2	50,7a
Média	42,9AB	41,9AB	35,2BC	40,0AB	50,0A	45,7AB	40,2AB	33,1C	41,4AB	48,6A	39,5BC	
C.V. (%)	25,06											

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para cultivares e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os isolados de *A. amazonense* e o de *Sphingomonas* spp. que produziram as maiores quantidades de AIA *in vitro*, foram aqueles que causaram menor efeito inibitório ao crescimento das plantas, sugerindo que o efeito inibitório não é devido ao AIA produzido, mas sim a outros fatores como, por exemplo, outros fitohormônios. RODRIGUES et al. (2007) não observaram correlação entre a produção de compostos indólicos *in vitro* e a promoção do crescimento de plantas de arroz das cultivares IR42 e IAC4440 por isolados de *A. amazonense* quando avaliados em condições gnotobióticas. Os autores observaram ainda que os tratamentos de inoculação para a maioria dos isolados testados apresentaram efeito inibitório no crescimento de plantas. Também, BACILIO-JIMÉNEZ et al. (2001) observaram efeito inibitório em plantas de arroz inoculadas com *Azospirillum brasilense* crescidas em condições gnotobióticas. A resposta da planta à produção de compostos indólicos por bactérias é influenciada pelo genótipo da planta e do microrganismo. JAIN e PATRIQUIN (1985) observaram, em trigo, que as mudanças na ramificação das raízes das plantas foram influenciadas por estirpes de *Azospirillum* spp. e a cultivar de trigo.

A comparação do efeito da inoculação dos diferentes isolados com a estirpe ZAE94, usada como controle positivo, mostrou que houve maior produção de matéria seca nas plantas inoculadas com os isolados de *A. amazonense* (AR3122, VR218 e BR2113), *Sphingomonas* spp. (AR2112) e *Azospirillum* spp. (BF1358) (Tabela 20). Já para os isolados de *Burkholderia* spp. (Tabela 21), não foi observado diferença quando comparados com a estirpe ZAE94. Por outro lado, foi constatada entre as variedades de arroz utilizadas, nos dois experimentos de inoculação em condições gnotobióticas, diferenças no ganho de massa seca (Tabelas 20 e 21). Estas diferenças podem ser em função exclusiva do genótipo das plantas independentemente dos tratamentos de inoculação.

3.5.3 Experimento de arroz cultivado em vasos com terra e inoculado com isolados previamente selecionados

A análise dos dados do experimento realizado em vasos, mostrou que houve interação entre tratamentos de inoculação e os genótipos de arroz no acúmulo de massa seca da parte aérea, rendimento de grãos, número de grãos cheios por panícula e massa de mil grãos (Tabelas 22, 23 e 24). Para estes parâmetros, a resposta das plantas à inoculação com bactérias diazotróficas foi dependente do genótipo da planta de arroz. Em arroz, é comum se observar diferença na FBN entre os genótipos avaliados (SHRESTHA e LADHA, 1996; BALDANI et al., 2000), sugerindo que a associação entre as plantas e as bactérias fixadoras é controlada pelas plantas. Também, RETHATI et al. (2000) estudando a associação de

cultivares de arroz com *A. brasilense* e *H. seropedicae* observaram que a inoculação de ambas as bactérias aumentou a massa das raízes das plantas e que este efeito benéfico, devido à inoculação, foi altamente dependente da cultivar.

Tabela 22. Acúmulo de massa seca (g/planta) da parte aérea de nove genótipos de arroz, inoculados com isolados de *Azospirillum amazonense* (VR218 e AR3122), *Azospirillum* spp. (BR2113 e BF1358), *Herbaspirillum* spp. (AR1122 e AR1124) e *Sphingomonas* spp. (AR2112) em vasos.

Isolados	Zebu Branco	Arroz 70	Braquiária	Cana Forte	Pingo D'água	Come Cru	Bonança	IR42	Canastra	Média
AR1122	9,3ABb*	10,6Aa	6,5CDb	8,6BCb	8,2BCd	7,2BCbc	6,4CDa	8,9ABab	6,0Dbc	7,8
VR218	8,5Abc	8,2Abc	6,2Ab	8,4Ab	7,8Ad	8,2Aab	7,1Aa	6,3Ac	7,4Aab	7,6
AR1124	8,3ABbc	9,8Aab	5,7Db	8,3ABb	9,4Abc	6,7BCc	5,9CDa	7,1CDbc	4,7Dc	7,5
BF1358	7,6ABbc	6,7ABcd	6,2BCb	7,6ABb	8,7Acd	8,2ABbc	5,6Ca	6,5ABc	5,3Cbc	7,0
AR2112	6,8Ccd	9,6ABab	6,6Cb	7,8BCb	11,4Ac	6,6Cc	6,3Ca	6,7Cbc	6,1Cbc	7,6
AR3122	6,8BCcd	7,7BCbc	7,4BCab	11,7Aa	8,7Bcd	6,5BCc	7,8BCa	8,2CDab	6,8BCbc	7,6
BR2113	6,1Dd	9,0ABbc	6,7CDab	9,2ABb	10,6Abc	8,4BCbc	6,1Da	6,0Cc	6,2Dbc	7,8
ZAE94 (controle positivo)	8,7Abbc	7,4BCcd	6,0Cb	9,8Aab	9,7ABbc	9,4ABab	6,1Ca	6,3Cc	5,4Cbc	7,7
Testemunha										
Nitrogenada (100Kg/há).	13,6Aba	11,3CDa	9,0DEa	11,8BCa	15,1Aa	10,2Ea	7,9Ea	10,4CDa	9,5DEa	11,0
Média	8,4	8,9	6,7	9,2	7,0	7,9	6,5	7,4	6,4	
C.V. (%)	13,15									

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para cultivares e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 23. Produção de grãos (g/vaso) de nove genótipos de arroz, inoculados com isolados de *Azospirillum amazonense* (VR218 e AR3122), *Azospirillum* spp. (BR2113 e BF1358), *Herbaspirillum* spp. (AR1122 e AR1124) e *Sphingomonas* spp. (AR2112) em vasos.

Isolados	Zebu Branco	Arroz 70	Braquiária	Cana Forte	Pingo D'água	Come Cru	Bonança	IR42	Canastra	Média
AR1122	5,7BCa*	8,1ABa	6,6BCb	6,6BCab	6,8BCab	6,4BCa	5,8BCab	9,2Aab	4,8Cb	6,7
VR218	4,7Ca	6,6ABab	7,6ABab	8,0Aa	6,3ABCb	7,8ABa	5,5BCb	7,6ABb	5,7BCab	6,5
AR1124	6,0Aa	7,3Aab	7,1Aab	6,1Aab	6,5Ab	7,2Aa	5,2Ab	7,2Ab	5,2Aab	6,4
BF1358	6,8ABa	7,0ABab	7,0ABab	6,0ABab	5,1Bb	6,4ABa	4,8Bb	7,7Ab	5,5ABab	6,3
AR2112	6,7ABa	7,2ABab	7,0ABab	5,1Bb	5,6Bb	5,8Ba	5,6Bb	8,7Aab	6,5ABab	6,5
AR3122	5,6Ba	6,9ABab	7,6ABab	6,9ABab	5,4Bb	6,5Ba	6,2Bab	9,2Aab	5,8Bab	6,7
BR2113	5,4ABa	7,4ABab	6,6ABb	6,3ABab	6,3ABb	7,2ABa	5,1Bb	7,7Ab	6,2ABab	6,5
ZAE94 (controle positivo)	6,1Ba	5,7Bb	7,2ABab	6,9ABab	6,2Bb	6,0Ba	5,4Bb	8,7Aab	5,9Bab	6,5
Testemunha										
Nitrogenada (100Kg/há).	6,5Ca	7,0BCab	9,0Aba	7,3BCab	9,1ABa	6,3Ca	8,1BCa	10,7Aa	7,4BCa	7,9
Média	5,9	7,0	7,3	6,6	6,4	6,5	5,8	8,5	5,7	
C.V. (%)	15,71									

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para cultivares e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 24. Grãos cheios por panícula de nove genótipos de arroz, inoculadas com isolados de *Azospirillum amazonense* (VR218 e AR3122), *Azospirillum* spp. (BR2113 e BF1358), *Herbaspirillum* spp. (AR1122 e AR1124) e *Sphingomonas* spp. (AR2112) em vasos.

Isolados	Zebu Branco	Arroz 70	Braquiária	Cana Forte	Pingo D'água	Come Cru	Bonança	IR42	Canastra	Média
AR1122	71,0Aab*	61,0ABa	43,0BCb	57,3ABab	50,0BCbc	46,8BCbc	56,8ABa	36,3Ca	56,0BCa	53,11
VR218	52,5Ab	60,8Aa	45,5ABb	64,5Aa	52,5Abc	49,3ABbc	60,0Aa	31,8Ba	60,5Aa	53,03
AR1124	56,5ABb	53,3ABa	50,5ABab	44,0ABb	59,8Aab	54,0ABbc	53,3ABa	37,0Ba	47,8ABa	50,66
BF1358	67,5Aab	51,0ABa	54,5Aab	48,8ABab	52,3ABbc	62,3Aabc	48,0ABa	34,0Ba	49,8ABa	52,00
AR2112	61,3Ab	61,5Aa	58,8ABab	50,0ABab	41,0BCc	53,0ABbc	47,0BCa	34,3Ca	59,5ABa	51,80
AR3122	82,0Aa	51,3BCa	54,3ABab	44,3Cb	69,3ABa	42,8Cc	58,5BCa	39,3Ca	56,3BCa	55,30
BR2113	60,3ABb	58,5ABa	52,3ABab	55,5ABab	46,0ABbc	66,5Aab	59,0ABa	42,0Ba	53,3ABa	54,91
ZAE94 (controle positivo)	55,3Ab	54,8Aa	58,3Aab	51,0Aab	62,0Aab	57,3Aabc	56,0Aa	42,8Aa	50,5Aa	54,19
Testemunha						73,3Aa				
Nitrogenada (100Kg/há).	60,3ABb	59,3ABa	68,5Aa	63,5Aab	60,8ABab		66,8Aa	41,3Ba	60,5ABa	61,55
Média	62,9	56,8	53,9	53,2	54,9	56,1	56,1	38,5	54,9	
C.V. (%)	20,17									

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para cultivares e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para altura de plantas e número de panículas por vaso, não houve efeito dos tratamentos de inoculação em nenhum dos genótipos estudados (dados não mostrados). DILEEP et al. (1998) observaram que a inoculação com *Pseudomonas fluorescences* em arroz cultivado sob condições de campo e em casa de vegetação, aumentou a altura e biomassa das plantas. Já VALAZCO e CASTRO (1999) observaram que a inoculação de arroz, crescido em casa de vegetação, com *A. brasilense* aumentou a altura das plantas avaliada até a fase de iniciação das panículas. No entanto, no final do ciclo da cultura não foi observado efeito dos tratamentos de inoculação para este parâmetro.

O maior acúmulo de massa seca da parte aérea para todos os genótipos foi observado com adubação nitrogenada de 100 kg N ha⁻¹ (Tabela 22). Os isolados AR1122 e AR1124 de *Herbaspirillum* spp., proporcionaram maior produção de massa seca nas variedades Arroz 70 e Zebu Branco, enquanto que para as variedades Braquiária e Cana Forte, os isolados VR218 e AR3122 de *A. amazonense* proporcionaram maior produção de matéria seca com rendimento igual ou superior à inoculação com a estirpe ZAE94. Na cultivar IR42 os isolados AR1122 de *Herbaspirillum* spp. e AR3122 de *A. amazonense* proporcionaram a maior produção de massa seca. Estes dois isolados proporcionaram maior produção massa seca da parte aérea para a maioria dos genótipos testados, embora menor do que a testemunha nitrogenada.

VALAZCO e CASTRO (1999) observaram que a inoculação de arroz com *A. brasilense*, cultivado em casa de vegetação aumentou a massa seca da parte aérea. Também, BISWAS et al. (2000), estudando rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Azospirillum lipoferum* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, em condições de casa de vegetação, observaram que algumas das estirpes de bactérias testadas estimularam o crescimento das plantas (massa seca), sendo o efeito da inoculação dependente das estirpes e variedades das plantas. GUIMARÃES et al. (2003) avaliando plantas de arroz crescidas em casa de vegetação, observaram efeito positivo no acúmulo de massa seca de plantas de arroz da variedade Guarani aos 40 dias após transplantio das plântulas inoculadas com estirpes de *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, mas não aos 70 e 130 dias após o transplantio.

A análise de produção de grãos mostrou que a inoculação com o isolado AR1122 de *Herbaspirillum* na variedade Arroz 70 apresentou uma produção de grãos igual à testemunha nitrogenada (Tabela 23). Além disso, o mesmo isolado proporcionou uma produção de grãos igual ou superior àquela proporcionada pela estirpe ZAE94 para todos os genótipos testados.

Já a inoculação dos isolados de *A. amazonense* VR218 e AR3122 resultaram em uma produção de grãos significativamente maior quando comparada com a estirpe ZAE94, na variedade Cana Forte e nos genótipos Arroz 70 e Bonança respectivamente. Nas variedades Come Cru e Zebu Branco não houve diferença entre os tratamentos de inoculação para produção de grãos e nem destes para a testemunha nitrogenada (100 kg N ha^{-1}) para a produção de grãos (Tabela 23).

Os efeitos da inoculação de plantas com bactérias diazotróficas nem sempre se refletem em aumento de produção de grãos no campo (PEREIRA et al., 1988). RAMAMOORTHY et al. (2000) observaram que a inoculação de sementes de arroz com *Azospirillum* aumentou o vigor das plantas, embora isso não tenha se refletido na produção de grãos. Já BISWAS et al. (2000), em condições de casa de vegetação, observaram que a inoculação de sementes de arroz pré-germinadas com estirpes de *Rhizobium* spp. aumentou a velocidade de emergência, o acúmulo de massa seca nas plantas e proporcionou maior eficiência de absorção de nutrientes. PRADHAN e MOHAN (1998) observaram que inoculação de plantas de arroz com *A. brasilense*, quando utilizou a metade da dose recomendada de nitrogênio para a cultura do arroz, proporcionou aumento no vigor das plantas aos 30 e 60 dias após a inoculação e aumento na produção de grãos. Também, GUIMARÃES et al. (2003) observaram aumento de até 25% na produção de grãos na variedade Guarani inoculada com estirpes de *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, em condições de casa de vegetação e campo.

A análise do número de grãos cheios por panícula mostrou que o isolado AR3122 de *A. amazonense* aumentou o número de grãos por panícula na variedade Zebu Branco e Pingo D'água, quando comparado com os outros tratamentos de inoculação e com a testemunha nitrogenada (Tabela 24). Já nas variedades Cana Forte e Come Cru, esta mesma bactéria promoveu uma redução no número de grãos cheios por panícula. O isolado VR218 de *A. amazonense* promoveu um maior número de grãos por panícula na variedade Cana Forte, enquanto que nas variedades Braquiária e Come Cru o maior número de grãos por panícula foi obtido com a testemunha nitrogenada (100 kg N ha^{-1}). Em contraste, não houve efeito dos tratamentos de inoculação para os genótipos Arroz 70, Bonança, IR42 e Canastra (Tabela 24).

Pode-se observar pelas Tabelas 23 e 24 que as diferenças na produção de grãos ocorreram principalmente, em função do número de grãos por panícula. Este efeito pode ser claramente observado na variedade Cana Forte inoculada com o isolado VR218 de *A. amazonense*. Já o isolado AR2112 de *Sphingomonas* spp. promoveu uma menor produção de grãos e menor número de grãos por panícula, esta tendência não seja constante claro para todos os tratamentos.

A análise da massa de mil grãos mostrou que houve efeito da inoculação nos genótipos Zebu Branco, Braquiária, e IR42 (Tabela 25). O isolado BR2113 de *Azospirillum* spp. promoveu o desenvolvimento de grãos mais pesados na variedade Zebu Branco, a estirpe ZAE94 na variedade Braquiária e o isolado VR218 de *A. amazonense* na cultivar IR42. Nos referidos genótipos, como também, na variedade Come Cru, a massa de mil grãos foi maior nas plantas inoculadas do que na testemunha nitrogenada (100 kg N ha^{-1}). TRAN VAN et al. (2000) observaram que a adubação com 0, 45 e 90 kg N ha^{-1} não afetou a massa de mil grãos, sendo que a inoculação com *Burkholderia vietnamiensis* aumentou a massa de mil grãos quando comparado com os tratamentos não inoculados. GOVINDARAJAN et al. (2008) também observaram que a inoculação de *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *A. lipoferum* e *B. vietnamiensis* aumentou o peso de mil grãos em duas cultivares de arroz, sendo que este parâmetro foi um importante componente de produção. SALA et al. (2007) observaram em trigo que a inoculação com bactérias diazotróficas, aumentou a massa de 1000 sementes, no entanto, o local de cultivo influenciou a resposta da planta.

Tabela 25. Massa de 1000 grãos (g) de nove genótipos de arroz, inoculados com isolados de *Azospirillum amazonense* (VR218 e AR3122), *Azospirillum* spp. (BR2113 e BF1358), *Herbaspirillum* sp (AR1122 e AR1124) e *Sphingomonas* spp. (AR2112) em vasos.

Isolados	Zebu Branco	Arroz 70	Braquiária	Cana Forte	Pingo D'água	Come Cru	Bonança	IR42	Canastra	Média
AR1122	27,7ABab*	26,4Ba	30,8Aab	27,1Ba	24,7BCa	26,9Ba	22,8Ca	21,8Cb	22,8Ca	26,7
VR218	27,9ABa	28,0ABa	31,2Aab	26,5Ba	25,0BCa	27,0Ba	22,9BCa	26,6Ba	22,4Ca	26,4
AR1124	27,6ABab	26,4BCa	30,9Aab	28,2ABa	24,9Ca	27,5BCa	23,5Ca	24,3CDab	23,2Da	26,2
BF1358	28,3ABa	27,0BCa	31,3Aab	27,3BCa	24,4CDa	27,2BCa	23,4Ea	24,7CDab	23,6DEa	26,3
AR2112	26,1BCab	25,0BCa	30,8Aab	27,7ABa	23,2CDa	27,5ABa	22,9CDa	23,9CDab	22,2Da	25,5
AR3122	28,1ABa	26,6Ba	30,6Aab	27,5ABa	24,9BCa	28,3ABa	22,3Ca	23,1Cb	22,9Ca	26,0
BR2113	28,6Aa	26,5BCa	29,8Aab	27,6ABa	24,4CDa	24,0CDa	23,4CDa	23,1Db	23,2CDa	26,2
ZAE94 (controle positivo)	26,8BCab	26,8BCa	32,5Aa	26,7BCa	24,7CDa	29,0Ba	23,6CDa	21,9Db	23,0Da	26,1
Testemunha						22Cb				
Nitrogenada (100Kg/há).	24,3BCb	24,6BCa	28,5Ab	25,3ABa	22,9BCa		24,6BCa	21,9BCb	24,3BCa	24,2
Média	27,3	26,4	30,7	27,1	24,2	27,1	23,3	23,5	23,1	
C.V. (%)	5,99									

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para cultivares e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para acúmulo de nitrogênio na biomassa da parte aérea das plantas houve interação entre tratamentos de inoculação e os genótipos de arroz, sendo que o isolado VR218 de *A. amazonense* se destacou em todos os genótipos testados. Com aumento variando entre 160 a 390 %, dependendo do genótipo, em relação a testemunha nitrogenada que recebeu 100 kg de nitrogênio ha⁻¹ (Tabela 26). O isolado AR1122 de *Herbaspirillum* spp. se destacou nos genótipos Cana forte, Zebu branco e Come cru, com aumento de 150 % no nitrogênio acumulado na biomassa em relação a testemunha nitrogenada. As cultivares melhoradas Bonança e Canastra apresentaram maior acúmulo de N na biomassa com a adubação nitrogenada do que os tratamentos de inoculação com exceção da inoculação com o isolado VR218.

Não houve efeito dos tratamentos de inoculação no acúmulo de proteína nos grãos (Tabela 27), independentemente do genótipo da planta quando comparado com a estirpe ZAE94. Somente os grãos provenientes do tratamento testemunha nitrogenada, que recebeu 100 kg N ha⁻¹, apresentaram maior teor de proteína. RODRIGUES et al. (2007) não observaram efeito significativo no acúmulo de N nos grãos da cultivar IR42 inoculada com diferentes isolados de *A. amazonense* em condições de vasos. Também, FERREIRA et al. (2003) não constataram aumento no acúmulo de N-Total nos grãos da cultivar IR42 inoculada com *H. seropedicae* em condições de casa de vegetação, já em condições de campo estes autores observaram aumento de 20% de nitrogênio nos grãos com a inoculação de *H. seropedicae* na mesma cultivar.

Tabela 26. Acúmulo de nitrogênio (%) na biomassa de nove cultivares de arroz inoculadas com isolados de *Azospirillum amazonense* (VR218 e AR3122), *Azospirillum* spp. (BR2113 e BF1358), *Herbaspirillum* spp. (AR1122 e AR1124) e *Sphingomonas* spp. (AR2112) em vasos.

Isolados	Zebu Branco	Arroz 70	Braquiária	Cana Forte	Pingo D'água	Come Cru	Bonança	IR42	Canastra	Média
AR1122	0,70ABa	0,43CDb	0,48CDbc	0,56BCb	0,44CDb	0,66ABb	0,38Db	0,46CDb	0,77Ac	0,54
VR218	0,84Da	0,98BCa	1,05Ba	0,78Da	0,81Da	1,66Aa	0,75Da	0,85CDa	1,58Aa	1,02
AR1124	0,41ABbc	0,37CDb	0,43BCc	0,34Cc	0,35Cbc	0,53Abc	0,32Cb	0,36Cbc	0,5ABde	0,40
BF1358	0,38ABbc	0,31ABb	0,37ABc	0,32ABc	0,38ABbc	0,32ABd	0,28Bb	0,34ABbc	0,45Ae	0,35
AR2112	0,36BCbc	0,33Cb	0,42ABCc	0,36BCc	0,32Cbc	0,52Abc	0,36BCb	0,32Cbc	0,47ABde	0,38
AR3122	0,28Cc	0,32Cb	0,40CDc	0,30Cc	0,29Cc	0,53ABbc	0,29Cb	0,33Cbc	0,61Ad	0,37
BR2113	0,33Cbc	0,35Cb	0,43BCc	0,30Cc	0,33Cbc	0,63Ab	0,33Cb	0,37BCbc	0,51ABde	0,40
ZAE94 (controle positivo)	0,33DEbc	0,30DEb	0,43BCDc	0,31DEc	0,32DEbc	0,56Bbc	0,28Eb	0,45BCbc	0,92Ab	0,43
Testemunha										
Nitrogenada (100Kg/há).	0,47CDb	0,38Db	0,60BCb	0,38Cc	0,40Cbc	0,42Ccd	0,67Ba	0,41Cbc	0,96Ab	0,52
Média	0,45	0,42	0,51	0,40	0,40	0,63	0,41	0,43	0,75	
C.V. (%)	13,15									

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para cultivares e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 27. Acúmulo de proteína (%) nos grãos de nove cultivares de arroz inoculadas com isolados de *Azospirillum amazonense* (VR218 e AR3122), *Azospirillum* spp. (BR2113 e BF1358), *Herbaspirillum* spp. (AR1122 e AR1124) e *Sphingomonas* spp. (AR2112) em vasos.

Isolados	Zebu Branco	Arroz 70	Braquiária	Cana Forte	Pingo D'água	Come Cru	Bonança	IR42	Canastra	Média
AR1122	4,5*	5,9	7,2	6,3	6,4	6,6	8,1	5,62	7,81	6,69b
VR218	6,4	6,8	6,6	5,6	5,4	6,2	7,3	6,87	7,11	6,41b
AR1124	6,1	6,1	7,2	6,8	5,8	6,0	8,2	5,54	7,11	6,48b
BF1358	6,4	5,8	6,7	5,8	6,1	6,1	7,5	5,62	7,42	6,39b
AR2112	6,6	6,4	7,3	6,1	5,9	7,2	7,2	5,23	7,30	6,57b
AR3122	6,6	6,0	6,9	5,8	6,6	7,1	7,2	5,56	6,81	6,51b
BR2113	6,1	5,5	6,9	7,1	6,5	6,4	8,2	5,31	7,27	6,57b
ZAE94 (controle positivo)	6,1	5,5	6,1	6,2	6,1	5,9	8,0	5,36	7,06	6,25b
Testemunha						8,1			8,09	
Nitrogenada (100Kg/há).	8,6	7,3	8,0	7,1	7,8		9,2	7,33		7,94a
Média	6,6CD	6,1DE	7,0BC	6,2DE	6,3DE	6,6CD	7,9A	5,8E	7,3AB	
C.V. (%)						11,16				

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para cultivares e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Todas as variedades apresentaram baixo teor de proteína nos grãos, entre 6 e 7%, independentemente dos tratamentos de inoculação. Mesmo as variedades Arroz 70, Zebu Branco e Braquiária, que foram escolhidas por apresentarem alto teor de proteína nos grãos (>8%), contrastando com as variedades Come Cru, Cana Forte e Pingo D'água (6-7%) apresentaram baixo teor de proteína nos grãos, sugerindo que as plantas se desenvolveram em condições de deficiência de nitrogênio. A diferença entre os genótipos em relação ao nitrogênio derivado da fixação biológica pode ser mais evidente em condições de baixo nível de nitrogênio no solo (PRADHAN e MOHAN, 1998). Este efeito também foi observado por NIEUWENHOVE et al. (2001) estudando a inoculação de plantas de arroz com *Azorhizobium caulinodans*, em combinação com diferentes níveis de sacarose e nitrogênio, em condições de casa de vegetação. Esses autores observaram, pela técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, que houve incorporação de N₂ fixado na biomassa das plantas inoculadas com *A. caulinodans*, em

condições de baixo nível de nitrogênio (20 kg ha⁻¹) e que, nesta condição, a perda de nitrogênio foi menor que em condições de alto nível de nitrogênio (60 kg ha⁻¹).

3.5.4 Avaliação do efeito da inoculação com bactérias diazotróficas em diferentes variedades de arroz cultivadas em condições de campo

No experimento realizado em condições de campo, a variedade Cana Forte não completou o ciclo devido à falta de chuvas na fase de enchimento dos grãos. Assim, a análise dos dados foi realizada somente com os genótipos Arroz 70 e Bonança. A análise de variância mostrou que não houve interação entre genótipos e as estirpes inoculadas nas sementes para nenhum dos parâmetros estudados. É possível que seja devido ao efeito residual de adubação com nitrogênio em cultivos anteriores na área, tendo em vista que a produção obtida (mais de 3500 kg ha⁻¹) foi muito superior à média nacional para arroz de sequeiro (1500 kg ha⁻¹).

Pode-se observar que houve efeito dos tratamentos de inoculação no rendimento de grãos e no teor de proteína nos grãos sem considerar a testemunha nitrogenada (Tabela 28). A inoculação com o isolado AR1122 de *Herbaspirillum* spp. proporcionou uma maior produção de grãos independentemente do genótipo produzindo 11% a mais que a inoculação com a estirpe ZAE94, apresentando o mesmo teor de proteína nos grãos que a testemunha nitrogenada (Tabela 28). Já a inoculação com o isolado BR2113 de *Azospirillum* spp. foi o tratamento que apresentou a menor produção de grãos, assim como, o menor teor de proteína nos grãos independentemente do genótipo da planta.

Tabela 28. Produtividade de dois genótipos de arroz, submetidas à inoculação com estirpes de *Azospirillum amazonense* (AR3122), *Azospirillum* spp. (BR2113), *Herbaspirillum* spp. (AR1122) e *Sphingomonas* spp. (AR2112) em condições de campo.

Isolados	Produção (Kg . ha ⁻¹)			Biomassa seca (g)/planta			Proteína (%)		
	Arroz 70	Bonança	Média	Arroz 70	Bonança	Média	Arroz 70	Bonança	Média
AR1122	4336,2	5061,6	4698,9a	21,8	8,5	15,1 a	8,75	8,25	8,50a
AR3122	3562,5	4884,7	4223,4ab	31,5	10,3	20,9 a	8,50	6,75	7,62ab
AR2112	3006,4	5081,4	4043,9ab	24,8	10,8	17,8a	6,75	7,75	7,25ab
BR2113	2550,5	4523,1	3536,8b	25,8	7,0	16,4a	6,50	6,50	6,50b
ZAE94 (controle positivo)	3362,4	5011,9	4187,7ab	20,5	10,5	15,5a	7,00	6,50	6,75b
Testemunha Nitrogenada (100Kg/há).	3931,5	4929,9	4430,7ab	26,5	8,3	17,4a	9,50	7,75	8,62a
Média	3458,3B	4915,4A		25,1A	9,2B		7,83A	7,23A	
C.V. (%)	14,61			22,22			14,31		

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para cultivares e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise de outros parâmetros agrônômicos mostrou que a inoculação não afetou o número de panículas por m², a massa de mil grãos e nem o número de grãos por panícula (Tabela 29). Embora não tenha havido diferença significativa para estes parâmetros, a diferença na produção observada entre os tratamentos de inoculação com a bactéria AR1122 e BR2113 pode ter ocorrido em função do maior número de panículas por m² e do número de grãos por panícula.

Tabela 29. Dados médios de número de panículas por m², massa de mil grãos e número de grãos por panícula de plantas de dois genótipos de arroz submetidos à inoculação com

Azospirillum amazonense (AR3122), *Azospirillum* spp. (AR2113), *Herbaspirillum* spp. (AR1122) e *Sphingomonas* spp. (AR2112) em condições de campo.

Isolados	Número de panículas m ²			Massa de mil grãos			Nº de grãos por panícula		
	Arroz 70	Bonança	Média	Arroz 70	Bonança	Média	Arroz 70	Bonança	Média
AR1122	207	226	216a	28,692	24,982	26,837a	73	91	82a
AR3122	198	227	212a	25,907	25,067	25,487a	67	85	76a
AR2112	170	247	208a	27,497	24,190	25,844a	68	80	74a
AR2113	146	243	194a	25,497	25,977	25,640a	73	72	72a
ZAE94 (controle positivo)	171	246	209a	29,647	25,317	27,837a	70	80	75a
Testemunha Nitrogenada (100Kg/há).	175	243	209a	27,737	25,852	26,837a	75	75	75a
Média	178B	239A		27,46A	25,23B		71B	80A	
C.V. (%)	18,09			7,18			9,12		

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para cultivares e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em aveia, SALANTUR et al. (2005) observaram que o aumento de produção de grãos em função da inoculação com bactérias diazotróficas foi devido ao aumento de panículas por m² e do número de grãos por panícula. No entanto, GOVINDARAJAN et al. (2008) observaram em arroz que o aumento de produção, também, ocorre em função do aumento na massa de mil grãos.

A fixação biológica de nitrogênio pelas bactérias inoculadas pode não ter sido o principal fator que influenciou a resposta das plantas aos tratamentos de inoculação. Outros fatores podem ter influenciado, tendo em vista que no experimento em condições de vasos, embora tenha ocorrido efeito na produção de grãos e seus componentes, não houve efeito no teor de proteína nos grãos.

Entre os isolados estudados, AR1122 de *Herbaspirillum* spp. e AR3122 de *A. amazonense* foram os que se mostraram mais promissores para promover o crescimento de plantas de arroz. Por outro lado, não foi observada relação entre o alto teor de proteína nos grãos observado para algumas variedades tradicionais de arroz do Maranhão e a fixação biológica de nitrogênio. No entanto, novos estudos são necessários para confirmar os resultados.

3.6 Conclusões

Houve efeito positivo da inoculação dependente do genótipo vegetal, nos experimentos em condições de casa de vegetação e em campo, sendo os isolados VR218 de *A. amazonense* e AR1122 de *Herbaspirillum* spp foram os mais promissores.

Não houve relação entre o alto teor de proteína algumas variedades tradicionais de arroz do Maranhão com a fixação biológica de nitrogênio.

4 CAPÍTULO III

EFEITO DA INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA GERMINAÇÃO E VIGOR DE SEMENTES ARROZ

4.1 Resumo

Bactérias diazotróficas são freqüentemente associadas a plantas de arroz, podendo promover a germinação de sementes e o crescimento de plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação e o vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. Para isso, foram instalados dois experimentos em condições de laboratório. No primeiro, dois lotes distintos de sementes de arroz da cultivar IAC4440 foram inoculados com oito estirpes de bactérias diazotróficas (Cd, ZAE94, M130, AR2112, BR2113, AR3122, AR1122 e BF1358). No segundo experimento, sementes recém-colhidas da cultivar IR42 e da variedade Zebu Branco, recém-colhidas, foram inoculadas com seis estirpes de bactérias diazotróficas (ZAE94, M130, AR2112, AR3122, AR1122 e BF1358). Além disso, foram utilizados dois tratamentos adicionais nos dois experimentos: controle com a turva umedecida com o meio de cultivo estéril e sementes não inoculadas. Os resultados mostraram que a inoculação com as bactérias AR1122, M130, BF1358, ZAE94 e AR3122 favoreceu a germinação das sementes de arroz do lote que apresentava menor poder germinativo e maior contaminação por fungos. No segundo experimento, a inoculação com as bactérias diazotróficas favoreceu a velocidade de germinação das sementes das cultivar IR42 e da variedade Zebu Branco, porém não proporcionou aumento da germinação das sementes com alto poder germinativo e baixa contaminação por fungos. Testes *in vitro* mostraram que as estirpes BF1358, M130, AR1122 e ZAE94 apresentaram, respectivamente, elevados efeitos antagônicos ao fungo *Fusarium* spp. isoladas das sementes de arroz.

4.2 Abstract

Diazotrophic bacteria are frequently associated with plant of rice (*Oryza sativa*), and could promote the seed germination and the growth of plants. The objective of this work was to evaluate the rice seeds germination and the vigour as affected by the inoculation with diazotrophic bacteria. Two experiments were conducted in laboratory conditions. In the first, two lots of rice seeds of cultivar IAC4440 were inoculated with eight strains of diazotrophic bacteria (Cd, ZAE94, M130, AR2112, BR2113, AR3122, AR1122 e BF1358). In the second study, seeds of cultivar IR42 and the variety Zebu Branco, recently harvested were inoculated with six strains (ZAE94, M130, AR2112, AR3122, AR1122 e BF1358). In both studies, there were also two additional treatments (control with the peat soil humidified with a sterile medium and seeds without no inoculation). The results showed that the inoculation with the bacteria AR1122, M130, BF1358, ZAE94 and AR3122 favoured the germination of rice seeds of the lot stored four years and with low germination and high fungi contamination. In the second experiment, the inoculation with the bacteria favoured the speed of seed germination of cultivar IR42 and the variety Zebu Branco, although it did not increase seeds germination with high germination and low contamination by fungi. *In vitro* experiment showed that the strains BF1358, M130, AR1122 and ZAE94 produced, respectively, the highest antagonistic effects against *Fusarium* sp. isolated from rice seeds.

4.3 Introdução

Um numeroso e diverso espectro de bactérias diazotróficas tem sido recentemente isolado de plantas de arroz (ELBELTAGY et al., 2001). Segundo PENG et al. (2002) é possível que muitas destas bactérias associadas às plantas de arroz estejam envolvidas na promoção do crescimento de plantas. A capacidade da população de microrganismos promover o crescimento de plantas envolve mecanismos como a fixação biológica de nitrogênio (HAN et al., 2005), a produção de fitohormônios e, ou, a solubilização de fosfato e o aumento na formação de pelos radiculares e, ou, a formação de raízes laterais (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999), a inibição do crescimento de fungos e a indução de resistência sistêmica no hospedeiro (BEVIVINO et al., 2005). Atualmente, alguns trabalhos têm sido realizados no sentido de avaliar os aspectos benéficos da associação de plantas com bactérias diazotróficas com a germinação de sementes. RAMAMOORTHY et al. (2000) observaram aumento na germinação de sementes de arroz de dois lotes (com alto e baixo vigor) inoculadas com *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* após 14 dias de instalação. Também, KARTHIKEYAN et al. (2007) avaliando as sementes de *Catharanthus roseus*, observaram que a inoculação da semente com bactérias diazotróficas (*Azospirillum* spp. e *Azotobacter* spp.), isoladas da rizosfera e da raiz desta planta, aumentou a percentagem de germinação, assim como o vigor e o acúmulo de massa seca das plântulas em condições gnotobioticas. Em soja, foi observado que a presença de *Methylobacterium* spp. estimulou a emissão de raiz primária das plântulas após 5 dias da instalação devido a estímulo hormonal e quebra de dormência (KOENIG et al., 2002). Também, BARAZANI e FRIEDMAN (1999) constataram que a maioria das bactérias isoladas da rizosfera de plantas são produtoras de fitohormônios. Fitohormônios são essenciais na coordenação de diferentes aspectos da fisiologia de plantas, como germinação de sementes e formação de raízes, dentre outros (RAVEN et al., 2001). ARSEGO et al. (2006) observaram que o tratamento de sementes de arroz com giberelinas proporcionou o desenvolvimento de plântulas com desempenho superior. Plântulas vigorosas podem competir mais eficientemente, principalmente em condições de estresse, por luz, nutrientes e água, influenciando no estabelecimento da população e na produção de grãos (FAROOQ et al., 2006). Assim, a aplicação de bactérias diazotróficas com o objetivo de melhorar a germinação e o estabelecimento das plantas de arroz, pode ser uma tecnologia de baixo custo e de fácil aplicação. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a germinação e o vigor de sementes de arroz, por meio da inoculação com bactérias diazotróficas.

4.4 Material e Métodos

Foram conduzidos dois experimentos no Laboratório de Análise de Sementes da UFRRJ, com sementes de arroz (*Oryza sativa* L.), no ano 2007. No primeiro experimento, foram utilizados dois lotes de sementes da cultivar IAC 4440, sendo que um deles armazenado em câmara localizada na Embrapa-CNPAB, com 15°C e 50% de umidade relativa do ar por quatro anos (lote 1) e o outro por um ano, nas mesmas condições do lote 1 (lote 2). No segundo experimento, foram utilizadas sementes de arroz da cultivar IR42 (genótipo 1) e da variedade Zebu Branco (genótipo 2) recém colhidas da área experimental da Embrapa Agrobiologia, no ano de 2007, em Seropédica, RJ. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (10 procedimentos de inoculação x dois lotes no primeiro experimento e oito procedimentos de inoculação x dois genótipos no segundo experimento) com quatro repetições. Os tratamentos consistiram da inoculação das sementes com o inoculante a base de turfa empregando as bactérias diazotróficas bem como

de um tratamento somente com a turva umedecida com o meio de cultivo estéril, denominado de controle e o outro tratamento, sem o procedimento de inoculação, denominado de testemunha. No primeiro experimento, foram utilizadas, as seguintes estirpes: 1 - *Azospirillum brasilense* Cd, 2 - *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94, 3 - *Burkholderia brasilensis* M130 e quatro isoladas da raiz de arroz que apresentaram alta produção de compostos indólicos *in vitro*, em testes prévios, 4 - *Sphingomonas* spp. AR2112, 5 - *A. brasilense* BR2113, 6 - *Azospirillum amazonense* AR3122, 7 - *Herbaspirillum* AR1122 e 8 - *Azospirillum* sp. BF1358. No segundo experimento, foram utilizadas 1 - *H. seropedicae* ZAE94, 2 - *B. brasilensis* M130, 3 - *Sphingomonas* spp. AR2112, 4 - *A. amazonense* AR3122, 5 - *Herbaspirillum* AR1122 e 6 - *Azospirillum* sp BF1358.

As suspensões bacterianas foram preparadas a partir de culturas puras crescidas por 16 horas em meio Dygs sob agitação. Após esse período, a concentração das células foi determinada por meio da densidade ótica em espectrofotômetro com comprimento de onda de 620 nm e foi ajustada para aproximadamente 10^9 células mL⁻¹. O inoculante foi preparado adicionando 15 mL da suspensão de cada bactéria, em sacos de polietileno contendo 35 g de turfa (previamente moída, seca, corrigida acidez e esterilizada). Após o preparo, o inoculante foi mantido em estufa a 30°C por 24 horas, em seguida, realizou-se a contagem das células em meio semi-sólido por meio da técnica do Número Mais Provável. O controle consistiu na adição de 15 mL do meio de cultivo estéril em 35 g de turfa.

A inoculação das sementes foi realizada após a desinfestação superficial das sementes com hipoclorito de sódio a 1%, por dez minutos (CHUN et al., 1997) e em seguida, estas foram lavadas por quatro vezes em água destilada estéril e colocadas para secar em fluxo laminar por duas horas. Estas sementes foram inoculadas, utilizando uma proporção de 10 g do inoculante por kg de semente, empregando uma solução de goma arábica a 10% para fixar o inoculante às sementes e, em seguida, colocadas para secar à sombra antes da utilização.

As sementes inoculadas foram submetidas aos testes de germinação e de vigor (primeira contagem de germinação e classificação das plântulas). O teste de germinação foi realizado seguindo as recomendações prescritas nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). As sementes foram distribuídas em papel germitest previamente esterilizados e umedecidos com o volume de água 2,5 vezes a massa do substrato. Os rolos de papel com as sementes foram mantidos a 25°C sob 12 horas de luz. As avaliações foram realizadas aos cinco e aos 14 dias. Em conjunto com este teste foi realizado o teste de primeira contagem de germinação que constou na determinação da porcentagem de plântulas normais, verificadas no quinto dia após a instalação do teste também em conjunto, foi realizado o teste de classificação de plântulas. As plântulas normais foram classificadas em fortes e fracas (KRZYZANOWSKI et al., 1999). Os dados obtidos foram transformados em raiz de $(x + 0,5)$ e submetidos à análise de variância. A comparação entre médias foi feita por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No primeiro experimento, as bactérias que mostraram maior capacidade de inibir o crescimento de fungos durante o teste de germinação foram submetidos a ensaios contra *Fusarium* spp., que foram os fungos presentes em maior quantidade nas sementes analisadas e que foram isolados durante a realização do teste de germinação. Para isso, foi utilizado um meio rico (Dygs), colocando-se um disco de ágar de 0,5 cm de diâmetro com crescimento abundante dos fungos a 1,5 cm da borda da placa e na outra extremidade uma estria da bactéria (MELO et al., 1995), mais um tratamento controle que recebeu apenas o disco com crescimento do fungo sem presença da bactéria. Após sete dias de incubação a 28°C e fotoperíodo de 12 horas, o crescimento micelial foi medido. O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso com quatro repetições por tratamento. Os dados foram submetidos a análise de variância, e as médias, comparadas através do teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.5 Resultados e Discussão

No primeiro experimento, foi constatado que houve interação entre lotes e os tratamentos de inoculação para germinação quando se avaliou o efeito dos tratamentos de inoculação em dois lotes distintos de sementes, que permaneceram armazenadas por diferentes períodos (Tabela 30). Assim para o lote 1, que estava armazenado por mais tempo e com menor valor de germinação (58%), houve aumento da germinação das sementes submetidas aos tratamentos de inoculação com as bactérias AR1122, M130, BF1358, Z94 e AR1122, provavelmente devido a redução da contaminação fúngica, como constatado pela diminuição da porcentagem de plântulas anormais deterioradas (Tabela 30).

Tabela 30. Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas na porcentagem de germinação, plântulas anormais deformadas, plântulas anormais infeccionadas em dois lotes de sementes de arroz cv. IAC 4440.

Tratamentos	Germinação			Plântulas anormais deformadas			Plântulas anormais deterioradas		
	Lote 1	Lote 2	Médias	Lote 1	Lote 2	Médias	Lote 1	Lote 2	Médias
AR1122	89Aa*	96Aa	92	6Abcd	2Aa	4	5Ade	3Aa	4
M130	88Aa	93Aa	90	2Acd	3Aa	3	3Ae	0Aa	1
BF1358	84Bab	97Aa	91	2Ad	2Aa	2	2Ae	0Aa	1
ZAE94	80Bab	96Aa	88	6Abcd	3Aa	4	7Acde	1Ba	4
AR3122	67Bcd	98Aa	83	7Abcd	2Aa	4	18Aab	0Ba	9
AR2112	66Bde	95Aa	81	9Abcd	1Ba	5	13Aabc	2Ba	7
Cd	62Bde	99Aa	81	15Aab	1Ba	8	8Abcd	0Ba	4
BR2113	62Bde	93Aa	78	20Aa	3Ba	12	8Abcd	1Ba	4
Controle	58Bde	90Aa	74	16Aab	4Ba	10	19Aab	5Ba	12
Testemunha	50Be	94Aa	72	12abc	3Ba	7	24Aa	1Ba	12
Médias	71	95		9	2		10	1	
C.V.(%)		4,71			41,64			38,02	

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para lotes e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Pela Tabela 31 e Figura 11 pode-se notar que estas bactérias foram capazes de inibir o desenvolvimento de fungo *in vitro*, permitindo, assim, que as sementes germinassem melhor. Bactérias diazotróficas associadas as gramíneas têm sido relatadas como importantes agentes no biocontrole de patógenos nestas plantas (CAVAGLIERI et al., 2005; HAN et al., 2005). Bactérias do complexo *Burkholderia cepaceae* são capazes de colonizar plantas de culturas importantes como milho, arroz e trigo e são importantes antagonistas de patógenos do solo podendo ser utilizadas em biocontrole contra *Fusarium* spp. (BEVIVINO et al., 1998, 2005). Para KIM et al. (1998) *Sphingomonas* spp. são freqüentemente encontradas em sementes de arroz e em outras partes desta planta, podendo ser utilizadas para o controle de patógenos em arroz.

TRAN VAN et al. (2000) observaram que *Burkholderia vietnamiensis* TVV75 inibe o crescimento de vários fungos fitopatogênicos. Também NANDAKUMAR et al. (2001) demonstraram que apenas uma aplicação de *Pseudomonas fluorescens* na cultura do arroz induziu resistência sistêmica contra o fungo *Rhizoctonia solani*, impedindo o crescimento miceliano e a incidência da doença. Já SCHLOTTER et al. (1997) observaram antagonismo de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* quando inoculado em plantas leguminosas e não leguminosas em casa de vegetação.

Tabela 31. Inibição de crescimento micelial de *Fusarium* spp. por bactérias diazotróficas mais controle sem inoculação. Médias de quatro repetições.

Tratamentos	Crescimento micelial (cm)	
	<i>Fusarium</i> sp.	
Controle	6,4a*	
<i>H. seropedicae</i> ZAE94	5,3b	
<i>Herbaspirillum</i> sp. AR1122	5,0bc	
<i>Burkholderia brasilensis</i> M130	4,5cd	
<i>Azospirillum</i> spp. BF1358	4,2d	
C.V.(%)	5,85	

* Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

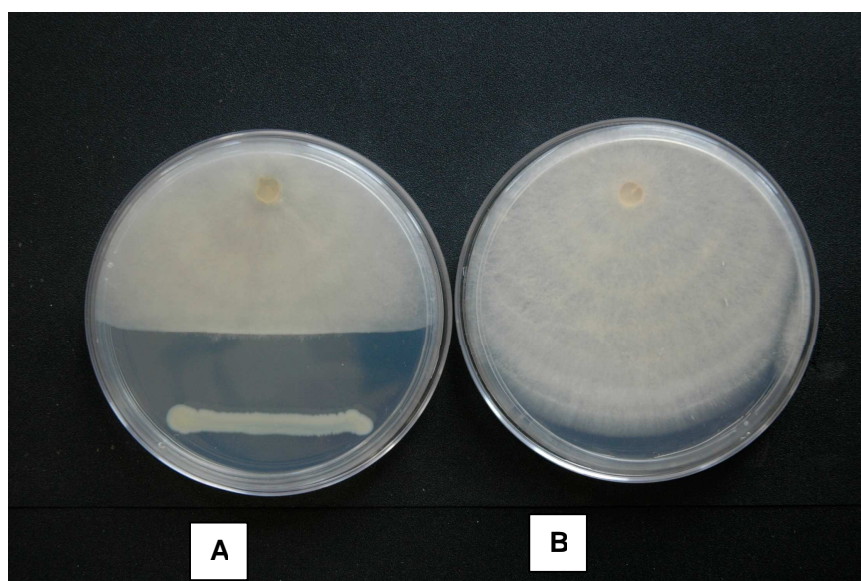


Figura 11. A) inibição do crescimento micelial de *Fusarium* spp. por *Burkholderia brasilensis* M130 e B) controle.

Já, para as sementes do lote 2 que apresentava inicialmente 90% de germinação após dois anos de armazenamento, não houve efeito dos tratamentos de inoculação na germinação e percentagem de plântulas anormais (deterioradas e deformadas) (Tabela 30). Em relação a avaliação do vigor não foi constatado efeito da aplicação dos tratamentos de inoculação com as bactérias no vigor das sementes do lote 1, avaliado pelo teste primeira contagem de germinação (Tabela 32). Pelo teste de classificação das plantas independentemente do lote, as sementes submetidas a inoculação com a bactéria AR3122 apresentaram maior vigor, ou seja, maior percentagem de plântulas normais fortes (bem desenvolvidas). No entanto, LEE et al. (2006) trabalhando com bactérias metilotróficas do gênero *Methylobacterium* e outras bactérias (*Enterobacter* spp. e *Burkholderia* spp.) diazotróficas constataram que estas bactérias foram capazes de produzir compostos indólicos *in vitro* e que o tratamento de sementes de arroz com estas bactérias favoreceram a germinação e a velocidade de germinação de sementes de arroz. Também, BISWAS et al. (2000), observaram aumento do coleoptilo e da radícula de sementes de arroz inoculadas com estirpes de *Rhizobium* spp. após 120 horas de incubação a 30°C no escuro. Já RAMAMOORTHY et al. (2000) após remoção das sementes contaminadas, observaram que a inoculação de sementes de arroz com *Azospirillum* spp. aumentou a germinação das sementes de arroz de dois lotes com diferentes níveis de vigor, aos 14 dias, embora isso não tenha se refletido na produção de grãos.

Tabela 32. Dados médios, em percentagem, de plântulas normais na primeira contagem de germinação, e de plântulas normais (fortes e fracas) obtidas de dois lotes de sementes de arroz da cv. IAC 4440, após inoculação com bactérias diazotróficas mais os tratamentos testemunha e controle.

Tratamentos	Primeira contagem de germinação			Plântulas normais fortes			Plântulas normais fracas		
	Lote 1	Lote 2	Médias	Lote 1	Lote 2	Médias	Lote 1	Lote 2	Médias
AR1122	19Ba*	31Abcd	25	30	52	41abc	56Aab	43Aab	49
M130	17Aa	21Ac	19	27	48	38bc	60Aa	43Bab	51
BF1358	21Aa	23Abc	22	33	50	42abc	46Aab	42Aab	44
ZAE94	26Ba	37Aabc	31	38	65	52ab	43Aab	35Aab	39
AR3122	27Aa	30Aabc	29	38	67	53 ^a	30Ab	26Ab	28
AR2112	27Aa	34Aabc	30	29	50	40abc	40Aab	46Aa	43
Cd	20Aa	25Abc	22	28	52	40abc	32Aab	43Aab	37
BR2113	19Ba	35Aabc	27	25	60	42abc	38Aab	34Aab	34
Controle	22Aa	29Aabc	26	25	43	34c	34Bb	47Aa	40
Testemunha	19Ba	43Aa	31	23	58	40abc	28Ab	37Aab	32
Médias	21	31		29B	55A		40	39	
C.V. (%)		12,23			10,36			11,21	

*Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para lotes e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No segundo experimento, não houve interação entre tratamentos e genótipos na percentagem de germinação de sementes de arroz, provavelmente devido à baixa contaminação por fungos, como constatados pela percentagem de plântulas anormais deterioradas (Tabela 33). No entanto, os tratamentos de inoculação com todas as bactérias aumentaram o vigor, avaliado pelo teste de primeira contagem de germinação, das sementes do G1 e das sementes do G2 com exceção da bactéria AR2112, este efeito também foi observado pelo teste de classificação de plântulas, principalmente para as bactérias BF1358 e AR3122 (Tabela 34).

Tabela 33. Dados médios, em percentagem, de germinação e de plântulas anormais (deformadas e deterioradas) obtidas de sementes de dois genótipos de arroz IR42 (G1) e Zebu Branco (G2), após inoculação com bactérias diazotróficas mais os tratamentos controle e testemunha.

Tratamentos	Germinação			Plântulas anormais deformadas			Plântulas anormais deterioradas		
	G1	G2	Médias	G1	G2	Médias	G1	G2	Médias
BF1358	99	93	96a*	0	3	2a	0	3	2a
AR3122	97	95	96a	2	4	3a	0	3	2a
AR1122	96	89	93a	2	7	5ab	0	0	0a
ZAE94	93	88	91a	7	8	8ab	0	1	1a
M130	91	92	92a	8	6	7ab	0	0	0a
AR2112	90	91	91a	6	6	6ab	1	1	1a
Controle	95	86	91a	4	11	8ab	3	3	3a
Testemunha	93	88	91a	4	9	7ab	0	4	2a
Médias	94	90		4B	7A		1A	2A	
C.V.(%)		2,84			45,23			60,86	

*Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para genótipos e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 34. Dados médios, em porcentagem, de plântulas normais na primeira contagem de germinação e de plântulas normais (fortes e fracas), obtidas de sementes de dois genótipos de arroz IR42 (G1) e Zebu Branco (G2), após inoculação com bactérias diazotróficas mais os tratamentos controle e testemunha.

Tratamentos	Primeira contagem de germinação			Plântulas normais fortes			Plântulas normais fracas		
	G1	G2	Médias	G1	G2	Médias	G1	G2	Médias
BF1358	60Aa*	51Aa	56	74Aa	59Ba	67	25Ab	34Aa	30
AR3122	57Aab	46Aa	52	61Aabc	57Aa	59	36Abc	38Aa	37
AR1122	43Abc	51Aa	47	51Abcd	53Aab	52	45Aab	35Aa	40
ZAE94	56Aab	50Aa	53	62Aab	56Aa	59	31Abc	32Aa	32
M130	53Aab	48Aa	50	57Aabc	52Aab	55	34Abc	40Aa	37
AR2112	40Abc	37Aab	39	62Aab	47B	55	26Bb	44Aa	36
Controle	29Ad	36Aab	33	42Ad	44Aab	43	53Aa	42Aa	47
Testemunha	32Ad	27Ab	29	46Acd	40Ab	43	47Aab	48Aa	48
Médias	45	44		56	51		37	39	
C.V. (%)		8,22			6,68			9,91	

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para genótipos e minúsculas para procedimento de inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No entanto, em sementes de *C. roseus*, KARTHIKEYAN et al. (2007) observaram que quando inoculadas com bactérias diazotróficas (*Azospirillum* spp. e *Azotobacter* spp.), isoladas da rizosfera e da raiz desta planta, apresentaram maior porcentagem de germinação e de vigor. Também em soja, foi observado que a inoculação de sementes com *Methylobacterium* spp., estimula a emissão de raiz primária do primeiro ao quinto dia das sementes, devido a estímulo hormonal (KOENIG et al., 2002). O efeito na germinação são atribuídos à capacidade destes microrganismos em produzir fitohormônios que aumentam a atividade de enzimas como amilases (RAMAMOORTHY et al., 2000). A habilidade de *Azospirillum* spp. em reduzir os efeitos de déficit de hídrico em sementes de cereais sob estresse osmótico ou salino, também são atribuídos à sua capacidade de produzir giberelinas (CREUS et al., 2004).

4.6 CONCLUSÕES

A inoculação com as bactérias AR1122, M130, BF1358, ZAE94 e AR3112 favoreceu a germinação das sementes de arroz com menor poder germinativo e maior contaminação por fungos.

A inoculação com as bactérias diazotróficas favoreceu a velocidade de germinação das sementes das cultivar IR42 e da variedade Zebu Branco, embora não tenha proporcionado aumento da germinação de sementes com maior poder germinativo e menor contaminação por fungos.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Foram isoladas bactérias diazotróficas que foram agrupadas de acordo com a caracterização morfológica e pela técnica de ARDRA como pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*.

Foram encontrados isolados bacterianos eficientes na produção de ácido indol-acético e capazes de fixar N₂, portanto apresentam potencial para promover o crescimento vegetal quando inoculado em plantas.

Houve efeito positivo da inoculação dependentes do genótipo vegetal, nos experimentos em condições de casa de vegetação e em campo.

Não foi observada relação entre o alto teor de proteína observado em algumas variedades tradicionais de arroz do Maranhão com a fixação biológica de nitrogênio

Bactérias diazotróficas, principalmente *Burkholderia*, possuem potencial para controle de patógenos em sementes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, E. S.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. F. Características morfológicas e moleculares e acúmulo de proteína em grãos de variedades de arroz do Maranhão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1281-1288, 2003.

ARSEGO, O.; BAUDET, L.; AMARAL, A. S.; HÖLBIG, L.; PESKE, F. Recobrimento de sementes de arroz irrigado com ácido giberélico, fungicidas e polímero. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 201-206, 2006.

BACILIO-JIMÉNEZ, M.; AGUILAR-FLORES, S.; DEL VALLE, M. V.; PEÉREZ, A.; ZEPEDA, A.; ZENTENO, E. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology e Bioqhesmestry**, Elmsford, v. 33, p. 167-172, 2001.

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

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

BALDANI, J. I.; AZEREDO, M. S.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R.; OLIVARES, L.; GOI, S. R.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S., LOPES, A. S.; GUILERRME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Org.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, 1999. p. 621-666.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 195-232.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

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

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

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

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, n. 10, p. 35-44, 1999.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, p. 729–770, 1998.

BEVIVINO, A.; SARROCCO, S.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, C.; CHIARINI, L. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: Effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 225-237, 1998.

BEVIVINO, A.; PEGGION, V.; CHIARINI, L.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, C.; DALMASTRI, C. Effect of *Fusarium verticillioides* on maize-root-associated *Burkholderia cenocepacia* populations, **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 10, p. 974-983, 2005.

BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B. *Rhizobia* inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. **Soil Science Society and America Journal**, v. 64, n. 5, p. 1644-1650, 2000.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 195-209, 1995.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Departamento Nacional de Defesa Vegetal, 1992. 365 p.

BRASIL, M. S. **Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz**. 2005, 105 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

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

CAMPOS, D. V. B. **Identificação de genótipos de arroz irrigado com potencial para fixação biológica de nitrogênio**. 1999, 94 f. Tese (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

CANEDO, O. S. V. E. **Organização do espaço agrário maranhense até os anos 80: distribuição da terra e atividades agrícolas**. São Luís: Ed. Norte Sul, 1993. 125 p.

CASSUCE, F. C. C.; MATTOS, L. B.; GOMES, S. T. Oferta e demanda de produtos agrícolas no Brasil 2008 e 2012. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v. XV, n. 2, 2006.

CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; RODRÍGUEZ, M.I.; CHULZEB, S.; ETCHEVERRY, M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, p. 748-754, 2005.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.; BÂ, A.; GILLIS, M.; LAJUDIE, P., DREYFUS, B. Photosynthetic Bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5437-5447, 2000.

CHEN, C.; BAUSKE, E. M.; MUSSON, G.; RODRÍGUEZ-CABAÑA, R.; KLOPPER, J. Biological control of *Fusarium* on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, Orlando, v. 5, p. 83-91, 1995.

CHUN, S. C.; SCHNEIDER, R. W.; COHN, M. A. Sodium hypochlorite: Effect of solution pH on rice seed disinfestation and its direct effect on seedling growth. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 821-824, 1997.

CONAB. **Acompanhamento de Safra**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/safra>>. Acesso em: 15 jan. 2008.

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

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacterial isolated from banana (*Musa spp.*) e abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DAS, A. C.; SAHA, D. Influence of diazotrophic inoculations on nitrogen nutrition of rice. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 41, n. 8, p. 1543-1554, 2003.

DE DATTA, S. R.; OBCEMEA, W. N.; CHEN, R. Y.; CALABRIO, J. C.; EBANGELISTA, R. C. Effect of water depth on nitrogen use efficiency and N15 balance in lowland rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 79, p. 210-216, 1987.

DILEEP, C.; KUMAR, B. S. D.; DUBE, H. C. Promotion of plant growth and yield by two rhizoplane fluorescent pseudomonads. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 36, p. 399-402, 1998.

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

DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 771-774, 1997.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.

ELBADRY, M.; GAMAL-ELDIN, H.; ELBANNA, K. Effects of *Rhodobacter capsulatus* inoculation in combination with graded levels of nitrogen lysimeter experiments. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 15, p. 393-395, 1999.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKI, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 5285-5293, 2001.

EMBRAPA. **Origem e História do Arroz.** Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/arroz/historia.htm>>. Acesso em: 20 set. 2007.

ENGELHARD, M.; HUREK, T.; HUREK, B. R. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 131-141, 2000.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

FAO. **Faostat Agriculture Data.** Disponível em: <<http://apps.fao.org/pag/collections?subset=agriculture>>. Acesso em: 20 jan. 2006.

FAROOQ, M.; BARSA, S. M. A.; WAHID, A. Priming of field-sown rice seed enhances germination, seedling establishment, allometry and yield. **Plant Growth Regulator**, Dordrecht, v. 49, p. 285-294, 2006.

FENG, C.; SHI-HUA, S.; SAN-FENG, C.; YU-XIANG, J. Migration of *Azospirillum brasilense* Yu62 from root to stem and leaves inside rice and tobacco plants. **Acta Botanica Sinica**, Peiping, v. 46, n. 9, p. 1065-1070, 2004.

FERRAZ JUNIOR, A. S. L.; SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S. Crude protein in rice grown in different environmental conditions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New Delhi, v. 7, n. 2, p. 149-157, 2001.

FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI J. I.; BALDANI V. L.D. Seleção de veículo para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Agronomia**, Itaguaí, v. 37, n. 2, p. 6-12, 2003.

FONSECA, J. R.; RANGEL, P. H.; BEDENDO, I. P.; SILVEIRA, P. M.; GUIMARÃES, E. P.; CORANDIN, L. **Características botânicas e agronômicas de cultivares e raças regionais de arroz (*Oryza sativa* L.) coletadas no Estado do Maranhão.** Goiânia: Embrapa-CNPAF-Cernagen, 1982. 42 p. (Boletim de Pesquisa, 1).

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; KWON, S. W.; WEON, H. Y.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 21-37, 2008.

GUIMARÃES, E. P.; SANT'ANA, E. P. Sistema de cultivo. In: EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO (Org.). **A cultura do arroz no Brasil.** Goiânia: EMBRAPA, 1999. p. 17-35.

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

GUNARTO, L.; ADACHI, K.; SENBOKU, T. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. from a subtropical island, and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 28, p. 129-135, 1999.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N.; REDDY, P. M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 8, p. 2634-2645, 2001.

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

HAN, J.; SUN, L.; DONG, X.; CAI, Z.; YANG, H.; WANG, Y.; SONG, W. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various pathogens. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, n. 1, p. 66-76, 2005.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, p. 1913-1923, 1994.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. **Journal of Biotechnology**, Washington, v. 106, p. 169-178, 2003.

JAIN, D. K.; PATRIQUIN, D. G. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, p. 206-210, 1985.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p.197-209, 2000.

JAMES, E. K.; GYANESWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W. L.; REDDY, P. M.; IANNETTA, P. P. M.; OLIVARES, F. L.; LADHA, J. K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 9, p. 894-906, 2002.

JEYABAL, A.; KUPPUSWAMY, G. Recycling of organic wastes for the production of vermicompost and its response in rice–legume cropping system and soil fertility. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 153–170, 2001.

JULIANO, B. O. Polysaccharides, proteins and lipids of rice. In: JULIANO, B. O. (Org.). **Rice: chemistry and technology**. 2. ed. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1985. p. 59-175.

KAMUNGO, P. K.; RAMAKRISHNAN, B.; RAO, V. R. Placement effect of organic sources on nitrogenase activity and nitrogen-fixing bacteria in flooded rice soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 25, p. 103-108, 1997.

KARTHIKEYAN, B.; JALEEL, C.A.; GOPI, R.; DEIVEEKASUNDARAM, M. Alterations in seedling vigour and antioxidant enzyme activities in *Catharanthus roseus* under seed priming with native diazotrophs. **Journal of Zhejiang University**, v. 8, n. 7, p. 453-457, 2007.

KENNEDY, I. R.; TCHAN, Y. Biological nitrogen fixation in non leguminous field crops: recent advances. **Plant and Soil**, The Hague, v. 141, p. 93-118, 1992.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; MIHA'LY, L. K. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KIM, H.; NISHIYAMA, M.; KUNITO, T.; SENOO, K.; KAWAHARA, K.; MURAKAMI, K.; OYAIZU, H. High population of *Sphingomonas* species on plant surface. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, n. 4, p. 731-736, 1998.

KOENIG, R. L.; MORRIS, R. O.; POLACCO, J. C. tRNA is the source of low-level transzeatin production in *Methylobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 184, p. 1832-1842, 2002.

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de Sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, Comitê de Vigor de Sementes, 1999. 218 p.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANIKLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. 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, 2007.

LADHA, J. K.; TIROL-PADDRE, A.; DAROY, M. L. G.; PUNZALAN, G.; WATANABE, I. The effect on N₂ fixation (C₂H₂ reducing) activity and plant growth characters of 16 wetland rice varieties. **Biology and Fertility of Soil**, Berlin, v. 5, p. 106-111, 1987.

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

LEE, H. S.; MADHAIYAN, M.; KIM, C. W.; CHOI, S. J.; CHUNG, K. Y. Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N₂-fixing methylotrophic isolates, **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, p. 402-408, 2006.

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

LOWRY, ° H.; ROSERBRUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of biology and chemistry**, London, v. 183, p. 265-275, 1951.

MALARVIZHI, P.; LADHA, J. K. Influence of available N and rice genotype on associative nitrogen fixation. **Soil Science Society and America Journal**, Madison, v. 63, p. 93-99, 1999.

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

MARCHIORO, L. E. T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005, 74 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MEHNAZ, S.; MIRZA, M. S.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; BANO, A.; MALIK, K. A. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 110-117, 2001.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 3, p. 620-624, 2007.

MELO, I. S.; VALARINE, P. J.; FAULL, J. L. Controle biológico de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* por *Bacillus subtilis* isolado da rizosfera do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 342, 1995.

MENDEZ DEL VILLAR, P.; DUCOS, A.; FERREIRA, N. L. S.; PEREIRA, J. A.; YOKOYAMA, L. P. **Cadeia produtiva de arroz no Maranhão**. Brasília: Embrapa Meio Norte, 2001. 136 p.

MOSTAJERAN, A.; AMOOAGHAIE, R.; EMTIAZI, G. The participation of the cell wall hydrolytic enzymes in the initial colonization of *Azospirillum brasilense* on wheat roots. **Plant and Soil**, The Hague, v. 291, p. 239–248, 2007.

MULÉ, M. C. Z.; CAIRE, G. Z. C.; CANO, M. S.; PALMA, R. M.; COLOMBO, K. Effect of cyanobacterial inoculation and fertilizers on rice seedlings and postharvest soil structure. **Communications in soil science and plant analysis**, New York, v. 30, n. 1/2, p. 97-107, 1999.

MUTHUKUMARASAMY, R.; CLEENWERCK, I.; REVATHI, G.; VADIVELU, M.; JANSSENS, D.; HOSTE, B.; GUM, K. U.; PARK, K. D.; SON, C. Y.; SA, T.; CABALLERO-MELLADO, J. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, p. 277-286, 2005.

MUTHUKUMARASAMY, R.; KANG, U. G.; PARK, K. D.; JEON, W. T.; PARK, C. Y.; CHO, Y. S.; KWON, S. W.; SONG, J.; ROH, D. H.; REVATHI, G. Enumeration, isolation

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

NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil biology and biochemistry**, Elmsford, v. 33, p. 603-612, 2001.

NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. p. 15-60.

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY, 12., 1999, Foz do Iguaçu. **Proceeding** . Foz do Iguaçu: Klumer Academic Publishers, 2000. p. 3-8

NIEUWENHOVE, C. V.; VAN HOLM, R. M. L.; VLASSAK, K. Dinitrogen fixation activity of *Azorhizobium caulinodans* in the rice (*Oryza sativa* L.) rhizosphere assessed by nitrogen balance and nitrogen-15 dilution methods. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, n. 1, p. 25-32, 2001.

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

OLIVEIRA, E. **Estudo da associação entre bactérias diazotróficas e arroz**. 1992, 96 f. Tese (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí.

OLIVEIRA, F. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. v. 1, 40 p.

PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J., JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 900-915. 1983.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, n. 6, p. 1263-1271, 2006.

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

PEREIRA, J. A. R. **A Cultura do arroz no Brasil: Subsídios para sua história**. Brasília: Embrapa Meio Norte, 2002. 226 p.

PEREIRA, J. A. R.; CAVALCANTE, V. A.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*, **Plant and Soil**, The Hague, v. 110, p. 269-274, 1988.

PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 2007, 88 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Unversidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

PRADHAN, S.; MOHAN, J. Response of cereals to *Azospirillum brasilense*. **Indian Journal of Agricultural Science**, New Delhi, v. 68, n. 10, p. 701-703, 1998.

RADWAN, T. E. S.; DESOUK, E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 10, p. 987-994, 2004.

RAMAMOORTHY, K.; NATARAJAN, N.; KILLIKULAM, T. N. A. U.; VALLANAD, P. O. Seed biofortification with *Azospirillum* spp. for improvement of seedling vigour and productivity in rice (*Oryza sativa* L.). **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 28, n. 3, p. 809-815, 2000.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRACKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, n. 1, p. 1-20, 2001.

RAO, V. R.; JENA, P. K.; ADHYA, T. K.; Inoculation of rice with nitrogen – fixing bactéria – problems and perspectives. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 26, p. 4-21, 1998.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. Regulando o crescimento e o desenvolvimento: os hormônios vegetais. In: RAVEN, P.H. (Org.). **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 649-675.

REDDY, P. M.; LADHA, J. K.; SO, R. B.; HERNANDEZ, R. J.; RAMOS, M. C.; ANGELES, O. R.; DAZZO, F. B.; BRÜJIN, F. J. *Rhizobial* communication with rice roots: induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. **Plant and Soil**, The Hague, v. 194, p. 81-98, 1997.

REINHOLD-HUREK, B.; HURECK, T.; CLAEYSSSENS, M.; VAN-MONTASU, M. Cloning expression in *Escherchia coli* and Characterization of cellulolytic enzyrnes of *Azoarcus* sp. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, p. 7056-7065, 1993.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 17, p. 29-54, 1998.

REIS JUNIOR, F. B. **Influência do genótipo da planta, micropropagação e fertilização nitrogenada sobre a população de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 1998, 120 f. Tese (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Campinas, v. 28, p. 103-113, 2006.

REIS JUNIOR, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

RETHATI, B.; DALLMANN, K.; SIMON, I. K.; BALINT, A. Characterization of hungarian rice cultivars in nitrogen fixing associations with bacteria. **Cereal research communications**, Szeged, v. 28, p. 9-16, 2000.

RODRIGUES, E. P.; RODRIGUES, L. S.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 20, p. 35-48, 2007.

RODRIGUES, L. S. **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado**. 2003, 85 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

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

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R.; Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, n. 3/4, p. 319-339, 1999.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J.O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 45, p. 39-47, 2003a.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. Root colonization, systemic spriending and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 35, p. 261-270, 2003b.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. In situ localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 34, p. 261-279, 2003.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 6, p. 833-842, 2007.

SALANTUR, A.; OZTURK, A.; AKTEN, S.; SAHIN, F.; DONMEZ, F. Effect of inoculation with non-indigenous and indigenous rhizobacteria of *Erzurum* (Turkey) origin on growth and yield of spring barley. **Plant and Soil**, The Hague, v. 156, p. 275-147, 2005.

SAMBROOK, R.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 3.

SARVAR, M.; KREMER, R.J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters of Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, p. 282-285, 1995.

SCHLOTTER, M.; WIEHE, W.; ASSMUS, B.; STEINDL, H.; BECK, H.; HOFLICH, G.; HARTMANN, A. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 63, p. 2038-2046, 1997.

SHRESTHA, R. K.; LADHA, J. K. Genotypic variation in promotion of rice dinitrogen fixation as determined by nitrogen-15 dilution. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 60, p. 1815-1821, 1996.

SINGH, R. K.; MISHRA, R. P. N.; JAISWAL, H. K.; KUMAR, V.; PANDEY, S. P.; RAO, S. B.; ANNAPURNA, K. Isolation and identification of natural endophytic *Rhizobia* from rice (*Oryza sativa* L.) through rdna pcr-rflp and sequence analysis. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 117-122, 2006.

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

STOLTZFUS, J. R.; SO, R.; MALARVITHI, P. P.; LADHA, J. K.; BRUIJN, F. J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and soil**, The Hague, v. 194, p. 25-36, 1997.

SUTRZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable system of crop production. **Critical Review in Plant Science**, Boca Ronta, v. 19, p. 1-30. 2000.

TEDESCO, J. M.; GIANELLO, C.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solos, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174 p.

TRAN VAN, V.; BERGE, O.; KE, S. N.; BALANDREAU, J.; HEULIN, T. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnã. **Plant and Soil**, The Hague, v. 218, p. 273-284, 2000.

VALAZCO, A., CASTRO, R. Estudio de la inoculación de *Azospirillum brasilense* en el cultivo del arroz (variedad A'82) en condiciones de macetas. **Cultivos Tropicalis**, v. 20, n. 1, p. 5-9, 1999.

- VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; VOS, D. P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 25, p. 507-512, 2002.
- WALKER, P.; FRANCINE, M.; PRAYITNO, J.; ROLFE, B. G.; WEINMAN, J. J.; HOCART, C. H. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 12, p. 3343-3350, 2007.
- XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n. 4, p. 1435-1438, 2005.
- YKOYAMA, P. L.; RUCATT, G. E.; KLUTHOCOUSKI, J. Economia da produção: conjuntura, mercado e custos. In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. (Org.). **A cultura do arroz no Brasil**. Brasília: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p. 36-57.
- YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of phototrophic strain BT Ai 1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 2271-2277, 1991.
- ZHU, G. Y.; DOBBELARE, S.; VANDERLEYDEN, J. Use of green protein to visualize rice root colonization by *Azospirillum irakense* and *A. brasilense*. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 29, n. 11, p. 1279-1285, 2002.

ANEXOS

Anexo A. Resumo da análise de variância para os dados de produção de compostos indólicos por isolados de *Azospirillum* spp., isolados da raiz (R) e da parte aérea (PA) de três variedades de arroz crescidas em solo provenientes de três localidades no Maranhão (A = Arari, B= Bacabal e V = Vitória do Mearim) avaliados pelo método colorimétrico.

Anexo B. Resumo da análise de variância para os dados de de produção de compostos indólicos por isolados de *Azospirillum amazonense*, isolados da raiz (R) e da parte aérea (PA) de diferentes variedades de arroz crescidas em solo provenientes de duas localidades no Maranhão (A = Arari e V = Vitória do Mearim) avaliados pelo método colorimétrico.

Anexo C. Resumo da análise de variância para os dados de acúmulo massa seca da parte aérea, número de panículas, % de sementes chochas e cheias por panículas massa de mil sementes de 23 genótipos de arroz.

Anexo D. Resumo da análise de variância para os dados de acúmulo de massa seca em 11 variedades de arroz inoculadas com diferentes isolados de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum*.

Anexo E. Resumo da análise de variância para os dados de acúmulo de massa seca em 11 variedades de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*.

Anexo F. Resumo da análise de variância para os dados de acúmulo de massa seca da parte aérea (MSP), altura de plantas (Altura), produção de grãos (Produção), número de panícula por vaso (NPAN), número de sementes por panícula (NSP), massa de 1000 grãos (MMS) e acúmulo de proteína em diferentes genótipos de arroz inoculados com bactérias diazotróficas em condições de vaso.

Anexo G. Resumo da análise de variância dos dados de acúmulo de massa seca da parte aérea, produção de grãos, altura de plantas, numero de panículas por m² e número de grãos por panícula de dois genótipos de arroz submetidas à inoculação com diferentes bactérias diazotróficas em condições de campo.

Anexo H. Resumo da análise de variância para os dados do teste de germinação em sementes de dois lotes arroz da cultivar IAC 4440, em função de distintos procedimentos de inoculação com bactérias diazotróficas.

Anexo I. Resumo da análise de variância para os dados do teste de germinação em sementes de arroz das cultivares IR42 e Zebu branco, em função de distintos procedimentos de inoculação com bactérias diazotróficas.

Anexo J. Resumo da análise de variância para os dados de inibição do crescimento micelial de *Fusarium* sp. causado por bactérias diazotróficas.

Anexo K. Todos os isolados de bactérias diazotróficas obtidos de amostras de solo proveniente de três municípios do estado do Maranhão.

Anexo A. Resumo da análise de variância para os dados de produção de compostos indólicos por isolados de *Azospirillum* spp., isolados da raiz (R) e da parte aérea (PA) de três variedades de arroz crescidas em solo provenientes de três localidades no Maranhão (A = Arari, B= Bacabal e V = Vitória do Mearim) avaliados pelo método colorimétrico.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio	
		Mg/mL	µM/µg
Isolado	38	11238.072921**	0.315119**
Resíduo	199	240.797633	0.066094**
C.V. (%)		32,57	96,15

** significativo a 1%.

Anexo B. Resumo da análise de variância para os dados de produção de compostos indólicos por isolados de *Azospirillum amazonense*, isolados da raiz (R) e da parte aérea (PA) de diferentes variedades de arroz crescidas em solo provenientes de duas localidades no Maranhão (A = Arari e V = Vitória do Mearim) avaliados pelo método colorimétrico.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio	
		Mg/mL	µM/µg
Isolado	38	20421.418329**	0.632864**
Resíduo	199	369.097874	0,222116
C.V. (%)		13,90	76,21

** significativo a 1%.

Anexo C. Resumo da análise de variância para os dados de acúmulo massa seca da parte aérea, número de panículas, % de sementes chochas e cheias por panículas massa de mil sementes de 23 genótipos de arroz.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio						
		Massa seca (g/ planta)	Altura	Nº de panícula por planta	Nº de grãos por panícula	Massa de 1000 grãos	Teor de N na parte aérea	Proteína
Trat.	22	364,2299**	1295,6375**	28,54249**	1618,91666**	0,795675**	0,10602**	2,430636**
Resíduo	69	4,594573	15,880627	1,387681	234,446970	0,009840	0,005081	0,338808
C.V. (%)		11,16	3,78	18,46	20,20	3,78	13,61	7,10

** significativo a 1%.

Anexo D. Resumo da análise de variância para os dados de acúmulo de massa seca em 11 variedades de arroz inoculadas com diferentes isolados de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum*.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
		PS
Variedade (V)	11	0,003901**
Isolado (I)	10	0,001319**
V x I	110	0.000084ns
Resíduo	396	0,000110
C.V. (%)		28,00

** significativo a 1%.

Anexo E. Resumo da análise de variância para os dados de acúmulo de massa seca em 11 variedades de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
		PS
Variedade (V)	11	0,001118**
Isolado (I)	10	0,000517**
V x I	110	0.000083ns
Resíduo	396	0,000110
C.V. (%)		25,06

** significativo a 1%.

Anexo F. Resumo da análise de variância para os dados de acúmulo de massa seca da parte aérea (MSP), altura de plantas (Altura), produção de grãos (Produção), número de panícula por vaso (NPAN), número de sementes por panícula (NSP), massa de 1000 grãos (MMS) e acúmulo de proteína em diferentes genótipos de arroz inoculados com bactérias diazotróficas em condições de vaso.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio							
		MSR	MSP	Altura	Produção	NPAN	NSP	MMS	Proteína
Bloco	3	18,003501**	0,529855ns	153,11214**	2,584080ns	1,887860ns	128,92489ns	2,39551ns	0,594537ns
Isolado (I)	8	33,272863**	154,6017**	58,80729ns	8,754631**	3,540223**	365,8194**	16,22414**	8,84220**
Variedade (V)	8	69,094772**	90,17337**	9263,0937**	27,212956**	171,2831**	1646,4513**	231,5199**	14,84599**
I x V	64	5,812919**	31,83595**	34,38541ns	2,109089**	1,310089ns	187,5503**	4,766668**	0,68446ns
Resíduo	240	2,519817	24,333430	35,310185	1,111310	1,077160	82,725309	2,394498	0,551651
C.V. (%)		16,33	13,15	7,20	15,71	20,17	16,82	5,99	11,16

ns = não significativo; ** significativo a 1%.

Anexo G. Resumo da análise de variância dos dados de acúmulo de massa seca da parte aérea, produção de grãos, altura de plantas, número de panículas por m² e número de grãos por panícula de dois genótipos de arroz submetidas à inoculação com diferentes bactérias diazotróficas em condições de campo.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio				
		Massa seca por planta	Rendimento	Altura	Nº de panículas m ²	Nº de grãos por panícula
Bloco	3	95,225775**	5528,815746ns	1456,6600**	4674,243056ns	1618,916667**
Isolado (I)	5	32,752547ns	12256,036007*	62,388889ns	451,720833ns	87,833333ns
Variedades (V)	1	3048,301880**	254809,780724**	8809,387222**	44469,18750**	1064,083333*
I x V	5	35,048186	3794,03030ns	90,459222ns	1826,58750ns	141,433333ns
Resíduo	33	14,490866	3740,862637	154,724275	1421,136995	234,446970
C.V. (%)		22,22	14,61	9,12	18,09	20,20

ns = não significativo; * significativo a 5%; ** significativo a 1%.

Anexo H. Resumo da análise de variância para os dados do teste de germinação em sementes de dois lotes arroz da cultivar IAC 4440, em função de distintos procedimentos de inoculação com bactérias diazotróficas.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio						
		Germinação	Plântulas anormais deformadas	Plântulas anormais infeccionadas	Sementes mortas	Primeira contagem de germinação	Plântulas normais fortes	Plântulas normais fracas
Estirpes (E)	9	1,459606**	2,636889**	4,390853**	2,420739**	1,153397**	1,555268**	2,698348**
Lotes (L)	1	37,637110**	37,092876**	70,645701**	56,202042**	16,394438**	79,653908**	0,055768ns
E x L	9	1,254174**	2,467298**	2,563969**	1,306347*	0,821066*	0,487190ns	1,277952*
Resíduo	60	0,183121	0,780498	0,61110	0,542014	0,383565	0,439807	0,496366
C.V. (%)		4,71	41,64	38,02	33,70	12,23	10,36	11,21

ns = não significativo; * significativo a 5%; ** significativo a 1%.

Anexo I. Resumo da análise de variância para os dados do teste de germinação em sementes de arroz das cultivares IR42 e Zebu branco, em função de distintos procedimentos de inoculação com bactérias diazotróficas.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio						
		Germinação	Plântulas anormais deformadas	Plântulas anormais infeccionadas	Sementes mortas	Primeira contagem de germinação	Plântulas normais fortes	Plântulas normais fracas
Estirpes (E)	7	0,126722ns	2,680404*	0,214286ns	0,613941ns	4,426993**	2,480723**	2,243566**
Variedade (V)	1	0,701823**	6,166821*	0,12500ns	3,202415ns	0,004760ns	2,298822**	0,476776ns
E x V	7	0,0733330ns	0,725202ns	0,339286ns	0,404052ns	0,604335*	0,383214ns	1,115959**
Resíduo	48	0,074627	0,969823	0,416667	0,539260	0,292037	0,240667	0,373958
C.V. (%)		2,84	45,23	60,86	67,48	8,22	6,68	9,91

ns = não significativo; * significativo a 5%; ** significativo a 1%.

Anexo J. Resumo da análise de variância para os dados de inibição do crescimento micelial de *Fusarium* sp. causado por bactérias diazotróficas.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
Tratamento	5	3,924417**
Resíduo	18	0,09639
C.V. (%)		5,85

** significativo a 1%.

Anexo K. Todos os isolados de bactérias diazotróficas obtidos de amostras de solo proveniente de três municípios do estado do Maranhão.

Número	Código antigo	Código Novo	Número	Código antigo	Código Novo	Número	Código antigo	Código Novo
1	A11	ARM-ID-1	51	A31	ARM-ID-51	101	A31	ARM-ID-101
2	A11	ARM-ID-2	52	B33	BRM-ID-52	102	A31	ARM-ID-102
3	D11	VRM-ID-3	53	B33	BRM-ID-53	103	A31	ARM-ID-103
4	A22	ARM-ID-4	54	A33	ARM-ID-54	104	D32	VRM-ID-104
5	A13	AFM-ID-5	55	A33	ARM-ID-55	105	D32	VRM-ID-105
6	B12	BRM-ID-6	56	A31	ARM-ID-56	106	D32	VRM-ID-106
7	A11	ARM-ID-7	57	A31	ARM-ID-57	107	D32	VRM-ID-107
8	B11	BRM-ID-8	58	A32	ARM-ID-58	108	D32	VRM-ID-108
9	A21	ARM-ID-9	59	A32	ARM-ID-59	109	D32	VRM-ID-109
10	A12	ARM-ID-10	60	B33	BFM-ID-60	110	B32	BRM-ID-110
11	A11	ARM-ID-11	61	B33	BFM-ID-61	111	B32	BRM-ID-111
12	B12	BRM-ID-12	62	A32	ARM-ID-62	112	B32	BRM-ID-112
13	B22	BRM-ID-13	63	A32	ARM-ID-63	113	A32	ARM-ID-113
14	A11	ARM-ID-14	64	B31	BRM-ID-64	114	A42	ARM-ID-114
15	A21	ARM-ID-15	65	B31	BRM-ID-65	115	A42	ARM-ID-115
16	B13	BFM-ID-16	66	A32	ARM-ID-66	116	A42	ARM-ID-116
17	B13	BFM-ID-17	67	A32	ARM-ID-67	117	A41	ARM-ID-117
18	B11	BRM-ID-18	68	B32	BRM-ID-68	118	A41	ARM-ID-118
19	B11	BRM-ID-19	69	B32	BRM-ID-69	119	B42	BRM-ID-119
20	B12	BRM-ID-20	70	A31	ARM-ID-70	120	B41	BRM-ID-120
21	A11	ARM-ID-21	71	A31	ARM-ID-71	121	A41	ARM-ID-121
22	B12	BRM-ID-22	72	B33	BFM-ID-72	122	A41	ARM-ID-122
23	A12	ARM-ID-23	73	B33	BFM-ID-73	123	A41	ARM-ID-123
24	A11	ARM-ID-24	74	A31	ARM-ID-74	124	B42	BRM-ID-124
25	B13	BFM-ID-25	75	A31	ARM-ID-75	125	A41	ARM-ID-125
26	B13	BFM-ID-26	76	A31	ARM-ID-76	126	A41	ARM-ID-126
27	B13	BFM-ID-27	77	A31	ARM-ID-77	127	B42	BRM-ID-127
28	A12	ARM-ID-28	78	A31	ARM-ID-78	128	A41	ARM-ID-128
29	A13	AFM-ID-29	79	A31	ARM-ID-79	129	A41	ARM-ID-129
30	A11	ARM-ID-30	80	B32	BRM-ID-80	130	B41	BRM-ID-130
31	A13	AFM-ID-31	81	B32	BRM-ID-81	131	A41	ARM-ID-131
32	B11	BRM-ID-32	82	B31	BRM-ID-82	132	B42	BRM-ID-132
33	A11	ARM-ID-33	83	B31	BRM-ID-83	133	B41	BRM-ID-133
34	B12	BRM-ID-34	84	A31	ARM-ID-84	134	A42	ARM-ID-134
35	B13	BFM-ID-35	85	A31	ARM-ID-85	135	B43	BFM-ID-135
36	A32	ARM-ID-36	86	B32	BRM-ID-86	136	A42	ARM-ID-136
37	A32	ARM-ID-37	87	B32	BRM-ID-87	137	B42	BRM-ID-137
38	B31	BRM-ID-38	88	B33	BFM-ID-88	138	B41	BRM-ID-138
39	B31	BRM-ID-39	89	B33	BFM-ID-89	139	A42	ARM-ID-139
40	A31	ARM-ID-40	90	A31	ARM-ID-90	140	B41	BRM-ID-140
41	A31	ARM-ID-41	91	A31	ARM-ID-91	141	A42	ARM-ID-141
42	B31	BRM-ID-42	92	A32	ARM-ID-92	142	B41	BRM-ID-142
43	B31	BRM-ID-43	93	A32	ARM-ID-93	143	B42	BRM-ID-143
44	B32	BRM-ID-44	94	B31	BRM-ID-94	144	A41	ARM-ID-144
45	B32	BRM-ID-45	95	B31	BRM-ID-95	145	B41	BRM-ID-145
46	B31	BRM-ID-46	96	A32	ARM-ID-96	146	B41	BRM-ID-146
47	B31	BRM-ID-47	97	A32	ARM-ID-97	147	D41	BRM-ID-147
48	A32	ARM-ID-48	98	A31	ARM-ID-98	148	D43	VFM-ID-148
49	A32	ARM-ID-49	99	A31	ARM-ID-99	149	D43	VFM-ID-149
50	A31	ARM-ID-50	100	A31	ARM-ID-100	150	D41	VRM-ID-150

Anexo K. Continuação.

Número	Código antigo	Código Novo	Número	Código antigo	Código Novo
151	D41	DRM-ID-151	201	AR1125	ARM-HE-201
152	D43	VFM-ID-152	202	BR2126	BRM-HE-202
153	D41	VRM-ID-153	203	AR211	ARM-AZ-203
154	D41	VRM-ID-154	204	AR212	ARM-AZ-204
155	D43	VFM-ID-155	205	VR113	ARM-AZ-205
156	D41	VRM-ID-156	206	AR114	ARM-AZ-206
157	D41	VRM-ID-157	207	AR215	ARM-AZ-207
158	D41	VRM-ID-158	208	A216	ARM-AZ-208
159	D43	VFM-ID-159	209	BR117	ARM-AZ-209
160	D41	VRM-ID-160	210	AR218	ARM-AZ-210
161	D41	VRM-ID-161	211	AR319	ARM-AZ-211
162	D52	VRM-BU-162	212	BR2111	BRM-AZ-212
163	D51	VRM-BU-163	213	A2112	ARM-SP-213
164	D51	VRM-BU-164	214	B2113	BRM-AZ-214
165	B51	BRM-BU-165	215	BF2227	BFM-AZ-215
166	A52	ARM-BU-166	216	AR2128	ARM-AZ-216
167	A51	ARM-BU-167	217	AR2129	ARM-AZ-217
168	B51	BRM-BU-168	218	AR2130	ARM-AZ-218
169	B51	BRM-BU-169	219	AR1131	ARM-AZ-219
170	B51	BRM-BU-170	220	AR2132	ARM-AZ-220
171	B51	BRM-BU-171	221	AR1133	ARM-AZ-221
172	A51	ARM-BU-172	222	VR1134	VRM-AZ-222
173	A51	ARM-BU-173	223	AR1135	ARM-AZ-223
174	A52	ARM-BU-174	224	VF2236	VFM-AZ-224
175	A52	ARM-BU-175	225	BR2137	BRM-AZ-225
176	A51	ARM-BU-176	226	BR1138	BRM-AZ-226
177	A52	ARM-BU-177	227	BR1139	BRM-AZ-227
178	A52	ARM-BU-178	228	AR2140	BRM-AZ-228
179	D51	VRM-BU-179	229	AR2141	ARM-AZ-229
180	D51	VRM-BU-180	230	BR1142	BRM-AZ-230
181	D51	VRM-BU-181	231	A2111	ARM-AM-231
182	A51	ARM-BU-182	232	AF22	AFM-AM-232
183	A53	AFM-BU-183	233	AR213	ARM-AM-232
184	B53	BFM-BU-184	234	AR214	ARM-AM-234
185	B-53	BFM-BU-185	235	AR215	ARM-AM-235
186	A51	ARM-BU-186	236	AF226	AFM-AM-236
187	B53	BFM-BU-187	237	VF227	VFM-AM-237
188	B51	BRM-BU-188	238	VR218	VRM-AM-238
189	B53	BFM-BU-189	239	VR219	VRM-AM-239
190	A51	ARM-BU-190	240	AR2110	ARM-AM-240
191	D2231-3A	VFM-HE-191	241	VR2111	VRM-AM-241
192	VR2116	VRM-HE-192	242	VR2112	VRM-AM-242
193	VR2117	VRM-HE-193	243	VF2213	VFM-AM-243
194	A2231-2C	AFM-HE-194	244	VR2114	VRM-AM-244
195	VR1119	VRM-HE-195	245	VF2215	VFM-AM-245
196	AR2120	ARM-HE-196	246	VR2116	VRM-AM-246
197	AR1121	ARM-HE-197	247	AR2117	ARM-AM-247
198	AR1122	ARM-HE-198	248	AR3118	ARM-AM-248
199	AR1123	ARM-HE-199	249	VR3119	VRM-AM-249
200	AR1124	ARM-HE-200	250	VR3120	VRM-AM-250

Anexo K. Continuação.

Número	Código antigo	Código Novo	Número	Código antigo	Código Novo
251	AR3121	ARM-AM-251	295	D5131-2B	VRM-BU-295
252	AR3122	ARM-AM-252	296	B5231-2B	VFM-BU-296
253	AR3123	ARM-AM-253	297	D5131-1A	VRM-BU-297
254	AR3124	ARM-AM-254	298	A5141-1B	ARM-BU-298
255	VR3125	VRM-AM-255	299	B4231-2C	BFM-BU-299
256	VR3126	VRM-AM-256	300	A5141-1B	ARM-BU-300
257	AR3127	ARM-AM-257	301	A5231-1B	AFM-BU-301
258	AR2128	ARM-AM-258	302	A5131-2B	ARM-BU-302
259	A312-2B	ARM-ND-259	303	A511-1B	ARM-BU-303
260	A3131-2B	ARM-ND-260	304	A511-1A	ARM-BU-304
261	A312-2A	ARM-ND-261	305	A5142-1B	ARM-BU-305
262	B312-1A	BRM-ND-262	306	A512-1B	ARM-BU-306
263	B3152-2C	BRM-ND-263	307	A5132-1A	ARM-BU-307
264	B312-3A	BRM-ND-264	308	A5132-1A	ARM-BU-308
265	B3231-1C	BFM-ND-265	309	A5132-1B	ARM-BU-309
266	D3131-1C	VRM-ND-266	310	A512-1A	ARM-BU-310
267	D3231-1B	VFM-ND-267	311	B5131-1B	ARM-BU-311
268	A4141-1B	ARM-ND-268	312	B4231-2C	BFM-BU-312
269	A411-1A	ARM-ND-269	313	B521-1C	BFM-BU-313
270	A4141-4D	ARM-ND-270	314	B5231-2B	BFM-BU-314
271	A4142-4A	ARM-ND-271	315	B512-1B	BRM-BU-315
272	A421-2A	AFM-ND-272	316	B5142-4B	BRM-BU-316
273	A4141-1A	ARM-ND-273	317	B512-2A	BRM-BU-317
274	A4231-1B	AFM-ND-274	318	B5142-4A	BRM-BU-318
275	A4131-2B	ARM-ND-275	319	B512-2B	BRM-BU-319
276	A4141-3A	ARM-ND-276	320	A5142-3A	ARM-BU-320
277	A4131-1A	ARM-ND-277	321	B5132-1A	BRM-BU-321
278	A4231-3A	AFM-ND-278	322	D512-2A	VRM-BU-322
279	B4231-2A	BFM-ND-279	323	D5131-1B	VRM-BU-323
280	B411-1B	BFM-ND-280	324	D5132-3A	VRM-BU-324
281	B4231-3B	BFM-ND-281	325	D5132-3A	VRM-BU-325
282	B4231-1B	BFM-ND-282	326	D512-2A	VRM-BU-326
283	B4231-1B	BFM-ND-283	327	D512-1A	VRM-BU-327
284	D3141-1A	VRM-ND-284	328	D5131-1A	VRM-BU-328
285	B411-2A	BRM-ND-285	329	A5231-2B	AFM-BU-329
286	D4131-2A	VRM-ND-286	330	A5141-1B	ARM-BU-330
287	D4131-2A	VRM-ND-287	331	A5141-1B	ARM-BU-331
288	A5141-1B	ARM-BU-288	332	A5141-1D	ARM-BU-332
289	A511-1A	ARM-BU-289	333	A5231-1B	AFM-BU-333
290	A5231-1B	AFM-BU-290	334	A511-1B	ARM-BU-334
291	A511-1B	ARM-BU-291	335	A511-1A	ARM-BU-335
292	D5131-1B	VRM-BU-292	336	A4231-2C	AFM-BU-336
293	A5131-1B	ARM-BU-293	337	B5131-1C	ARM-BU-337
294	B521-1C	BFM-BU-294	338	D5131-1A	VRM-BU-338