

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

**Isolamento e Seleção de Bactérias Diazotróficas em
Cultivares de Arroz Recomendadas para o Plantio
no Estado do Rio de Janeiro**

Esdras da Silva

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM
CULTIVARES DE ARROZ RECOMENDADAS PARA O PLANTIO NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO

ESDRAS DA SILVA

Sob a Orientação da Professora
Vera Lucia Divan Baldani

e Co-orientação da Professora
Kátia Regina dos Santos Teixeira

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre**, no Curso de Pós-
Graduação em Agronomia, Área de
Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2014

633.18098153

S586i

T

Silva, Esdras da, 1981-

Isolamento e seleção de bactérias diazotróficas em cultivares de arroz recomendadas para o plantio no Estado do Rio de Janeiro / Esdras da Silva. – 2014.

61 f.: il.

Orientador: Vera Lucia Divan Baldani.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, 2014.

Bibliografia: f. 44-53.

1. Arroz – Cultivo – Rio de Janeiro (Estado) – Teses. 2. Crescimento (Plantas) - Teses. 3. Nitrogênio - Fixação – Teses. 4. Bactérias – Teses. I. Baldani, Vera Lucia Divan, 1954- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA CIÊNCIA DO SOLO

ESDRAS DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** o Curso de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do solo, área de Concentração em Ciência do Solo.

APROVADO EM 27/02/2014

Vera Lucia Divan Baldani. Dr^a. Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)

Joilson Silva Ferreira. Dr. UESB

Sonia Regina de Souza. Dr^a. UFRRJ

Dedico

Aos meus pais Sebastião Ribeiro da Silva e Tereza Roberta da Silva (*in memoriam*),
Aos meus irmãos Anderson Luiz, Tâmara, Edelmar e Ozana
Pelo amor incondicional, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Á Deus por me conceder a oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Ao curso de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de realização do curso e pelo convívio no espaço universitário.

A EMBRAPA Agrobiologia pela possibilidade de realização deste trabalho e pela oportunidade de estar em um lugar de que muito contribuiu para minha formação.

Á Capes pela concessão a bolsa de estudos que me permitiu a dedicação a pesquisa que agora eu concluo.

A minha orientadora Dra. Vera Lucia Divan Baldani pela oportunidade e a confiança a mim oferecida. Pelos valiosos ensinamentos e observações sobre as bactérias diazotróficas que a mim foi ofertado de maneira tão generosa.

A minha Co-orientadora Dra. Kátia Regina dos Santos Teixeira, pelos valiosos ensinamentos e orientações prestados desde a iniciação científica até o presente trabalho.

A minha família, meus sobrinhos e cunhados e aos meus vizinhos, Leda, Ducarmo, Dona Francisca, irmã Tereza pelo carinho e apoio constantes.

Aos amigos que fiz no laboratório de solo da Corporação Colombiana de investigação Agropecuária (Corpoica).

Aos Funcionários e amigos da Embrapa Agrobiologia pela dedicação ao trabalho e eficiência e atenção a mim dispensadas: Wilson, Antônio Lucio, Geraldo Baeta, Carol, Patrícia Gitahy, Aline, Tatiane, Fernanda, Natalia, Luiz Carlos, Amarildo, Claudinho, Ernani, Alderi, Itamar.

Aos pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, José Ivo Baldani, Marcia Vidal, Stefan Schwab, Jean Luiz S. de Araujo, Verônica M. Reis, Éderson C. Jesus, Orivaldo Jose Saggin, Janaina e Luc Rouws.

Aos amigos que compartilharam atenção a este trabalho, especialmente Silvana dos Santos, Gabriela Alves, Cecília e Mayan Blanc pela ajuda e incentivo.

A todas as grandes “associações” de amigos. Amigos de graduação e da pós-graduação, amigos do alojamento da Embrapa e amigos dos laboratórios (Bioquímica e Gramíneas): Fernando, Mauro, Maysa, Leysimar, Felipe, Irineu, Jean, Mariana, Jessica, Saulo, Murilo, Valfredo, Andreia, Leison, Patricia, Iara, Rafael, Rodrigo, Cristiane, Mauro, Patrícia Galvão, Leona, Paulo Boa Sorte, Sandy, German, Cleiton, Jéssica, Carlos, Paula Renata, Marcela, Anita, Ana Luíza, Viviane, Helder, Renata e Leonardo. Não me esquecerei de vocês!

Obrigado!

BIOGRAFIA

ESDRAS DA SILVA, filho de Sebastião Ribeiro da Silva e Tereza Roberta da Silva, nasceu em 08 de dezembro de 1981 na cidade de Nova Iguaçu, RJ. cursou o segundo grau no colégio Gilson Amado - CIEP 207 em Japeri, RJ e o curso de pós-médio técnico em Agropecuária no Colégio técnico Agrícola Ildfonso Bastos Borges em Bom Jesus do Itabapoana, RJ. Graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no ano de 2011. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica do CNPq vinculado a Embrapa Agrobiologia, e depois de graduado foi bolsista de Apoio técnico da FAPERJ, sob a orientação da pesquisadora Dr^a Kátia Regina dos Santos Teixeira. Em março de 2012 ingressou no curso de Mestrado do curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo na UFRRJ sob a orientação da pesquisadora Dr^a Vera Lucia Divan Baldani.

RESUMO

SILVA, Esdras. **Isolamento e Seleção bactérias diazotróficas em cultivares de arroz recomendadas para o plantio no Estado do Rio de Janeiro**. 2014. 61p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos principais alimentos da população mundial, pois atende a grande parte das necessidades protéicas e calóricas do ser humano. A cultura do arroz no Estado do Rio de Janeiro passou por profundas mudanças o que refletiu na diminuição da área plantada e conseqüente queda de produção. Na década de 60, a área cultivada no Estado, chegou a mais de 80 mil ha, atualmente, não passa de 1,4 mil ha plantados, produzindo cerca de 4,3 mil toneladas de grãos, o que corresponde a menos de 1% da safra nacional. Para diminuir o custo de produção e aumentar a produtividade do arroz no Estado do Rio de Janeiro, algumas alternativas têm sido estudadas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e selecionar bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* e *Herbaspirillum* associadas a cultivares de arroz recomendadas para o plantio no Estado do Rio de Janeiro e avaliar o efeito da inoculação desses isolados nessas cultivares. Foram obtidos 39 isolados de bactérias diazotróficas associadas às cultivares BRS TROPICAL e EPAGRI-109. Destes foram selecionados 18 isolados com melhores resultados de atividade da redução de acetileno (ARA), testadas quanto à produção de compostos indólicos, solubilização de fosfato e produção de sideróforos. Dos isolados testados foram obtidos isolados pertencentes aos gêneros *Azospirillum*; *Herbaspirillum*; *Paenibacillus*; *Ideonella*; e *Pseudomonas*. Os isolados selecionados com as melhores características de promoção de crescimento vegetal (PCV) *in vitro*, foram utilizados em um bioensaio em condição gnotobióticas e em um experimento casa de vegetação. As estirpes mais eficientes no experimento gnotobiótico promoveram incrementos de até 31% na massa seca das plantas devido à inoculação. Nesse experimento foram selecionados dois isolados mais promissores e testados, juntamente com estirpes padrões em casa de vegetação. O experimento em casa de vegetação constou com tratamentos de inoculação, diferentes doses de Nitrogênio (N) (30, 60, 90 e 120 kg de N ha⁻¹) e o uso das cultivares EPAGRI-109 e BRS TROPICA. Dos tratamentos de inoculação a estirpes EP4-1L de *A. amazonense*, o inoculante comercial AZOTOTAL e a estirpe e Sp245 de *A. brasilense* aumentaram significativamente a produção de panícula na cultivar EPAGRI-109 em 19,8%, 23,9 % e 39,9% respectivamente, na dose de 30 kg de N ha⁻¹.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Promotores de crescimento vegetal.

ABSTRACT

SILVA, Esdras. **Isolation and selection of diazotrophic bacteria in rice cultivars recommended for cropping in the Rio de Janeiro state.** 2014. 61p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the main foods of the world population that provide most of the protein and caloric needs of human beings. Rice cultivation in the State of Rio de Janeiro has undergone profound changes which resulted in a decrease in planted area and consequent production loss. In the 60's, the cultivated area in Rio de Janeiro State reached more than 80 thousand hectares, but nowadays cultivation area is just of 1.4 thousand hectares, producing about of 4.3 tons of grains corresponding to less than 1 % of the national crop. To reduce production costs and increase the productivity of rice in the Rio de Janeiro State some alternatives have been studied. In this context, this work aimed to isolate, characterize and select diazotrophic bacteria of the genus *Azospirillum* and *Herbaspirillum*, associated with rice cultivars recommended for cropping in the Rio de Janeiro State and to evaluate their inoculation effects. A total of 39 diazotrophic bacteria isolates associated with BRS TROPICAL and EPAGRI TROPICAL-109 were obtained. Then 18 isolates were selected based on results of acetylene reduction assay (ARA), indolic compounds production, phosphate solubilization and siderophores production. Among them there were found isolates belonging to the genera *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Paenibacillus*, *Ideonella* and *Pseudomonas*. The isolates that showed *in vitro* the best plant growth promotion (PCP) characteristics were used in experiments at gnotobiotic condition and in greenhouse. The most efficient strains used in gnotobiotic condition promoted increments up to 31% on the dry mass of plants due to inoculation. Based on the data of this experiment there were selected two promising isolates to evaluate in greenhouse experiments, using some reference strains as standard. The greenhouse experiment treatments consisted of inoculation, nitrogen fertilizer doses (N) (30, 60, 90 e 120 kg de N ha⁻¹) and cultivars EPAGRI-109 and BRS TROPICAL. The inoculation treatments with strain EP4-1L of *A. amazonense*, the commercial inoculant AZOTOTAL and the *A. brasilense* standard strain Sp245 showed significant increase of the production of panicles in EPAGRI-109 rice variety in 19.8%, 23.9% and 39.9%, respectively, at a dose of 30 kg N ha⁻¹.

Key words: Plant growth promoters. Biological nitrogen fixation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografias de grãos de arroz das cultivares IR42 (A), EPAGRI-109 (B) e BRS TROPICAL (C).7
- Figura 2.** Atividade de redução de acetileno (ARA) dos isolados bacterianos obtidos na cultivar EPAGRI -109 e estirpes padrões utilizadas: *Azospirillum brasilense* (Sp254), *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94) e *A. amazonense* (CBAmC). Média de três repetições.20
- Figura 3.** Atividade de redução de acetileno (ARA) dos isolados bacterianos obtidos na cultivar BRS TROPICAL e estirpes padrões utilizados: *Azospirillum brasilense* (Sp245), *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94). Média de três repetições.20
- Figura 4.** Produção de compostos indólicos dos isolados bacterianos das cultivares EPAGRI-109 E BRS TROPICAL em diferentes estágios de cultivos (24, 48 e 72 horas) em meio Dyg's suplementado com 200 ug/ml de L-Triptofano, Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott knott a 5% de probabilidade. Media de três repetições.22
- Figura 5.** Formação do halo de solubilização de Pi pelas estirpes padrões e alguns isolados de plantas de arroz aos 16 dias de cultivo.24
- Figura 6.** Formação de halo amarelo-alaranjado em meio NFb sólido, sem azul de bromotimol e com NH₄Cl a 0,1% e CAS, de estirpes padrões e alguns “isolados de trabalho” de plantas de arroz aos 12 dias de crescimento.24
- Figura 7.** Morfologia das colônias dos isolados obtidos nas cultivares de arroz EPAGRI-109 e BRS TROPICAL. Observação realizada no quinto dia de crescimento em meio NFb (3x) e LGI.27
- Figura 8.** Morfologia celular dos isolados bacterianos, Gran colorido, obtidos em cultivares de arroz irrigado (BRS TROPICAL e EPAGRI-109), observadas em microscópio ótico (aumento de100X).28
- Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose (1%) do produto da amplificação do gene 16S rDNA dos isolados obtidos na cultivar EPAGRI-109.PM (1kb Plus DNA Ladder), 1 (Sp 245) *Azospirillum brasilense*, 2 (ZAE 94 *Herbaspirillum seropedicae*), 3 (CBAmC, *Azospirillum. amazonense*), 4 (EP3-1L), 5 (EP3-2L), 6(EP3-3L), 7 (EP3-4L)* ,8 (EP3-5L), 9 (EP3-6L), 10 (EP3-7L), 11 (EP3-8J), 12 (EP3-9J),13(EP3-10J), 14(EP3-11J), 15(EP3-12J), 16 (EP3-13J),17(EP3-14J), 18 (EP3-15N),19(EP3-16N), 20 (EP3-17N), 21 (EP4-1L), 22 (EP4-2J), 23 (EP4-3J), 24 (EP4-4JL), 25 (EP4-5J), 26 (EP4-6J), 27 (EP4-7N)*, 28 (EP4-8N), 29 (EP4-9N), 30 (EP4-10N) e C (Controle Negativo). *Os isolados EP3-4L e EP4-7N não apresentaram amplificação do gene16S DNAr.29
- Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose (1%) do produto da amplificação do gene 16S DNAr dos isolados obtidos na cultivar BRS TROPICAL. PM (1kb Plus DNA Ladder), 1 (Sp 245) *Azospirillum brasilense*, 2 (ZAE 94 *Herbaspirillum seropedicae*), 3 (TR-I1), 4 (TR-N1), 5 (TR-N2), 6 (TR-N3), 7 (TR-N4), 8 (TR-N5), 9 (TR-N6), 10 (TR-N7), 11 (TR-N8), 12 (TR-N9), 13 (TR-N10), 14 (TR-N11) e C (Controle Negativo).29
- Figura 11.** Análise de regressão da variável acúmulo de biomassa total em função das doses de nitrogênio (30, 60, 90 e 120 Kg. ha⁻¹) nas variedades BRSTROPICAL (A) e EPAGRI-109 (B). Inoculadas com AZOTOTAL, ZAE94, Sp245, EP3-1L, EP3-2J e um tratamento não inoculado. Sob condições de casa de vegetação (media de 4 repetições).42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Indicadores utilizados nas reações para amplificação do gene 16S DNAr.....	13
Tabela 2. Análise química da terra utilizada no experimento.	15
Tabela 3. Número de bactérias presentes em partes aéreas, raiz e solo rizosférico de arroz da cultivar EPAGRI-109, cultivado em condições de campo. Dados expressos em Log ₁₀ por grama de massa fresca.	16
Tabela 4. Número mais provável de bactérias fixadoras de nitrogênio por grama massa fresca (Log ₁₀) presente em diferentes partes das plantas e solo rizosférico de arroz da cultivar BRS TROPICAL, cultivada em casa de vegetação.	17
Tabela 5. Identificação dos isolados de bactérias diazotróficas obtidas em diferentes partes das plantas e solo rizosférico das cultivares de arroz EPAGRI-109 e BRS TROPICAL.....	18
Tabela 6. Isolados de bactérias diazotróficas provenientes das duas cultivares de arroz utilizadas, e selecionados com base na capacidade de reduzir acetileno.....	21
Tabela 7. Determinação da capacidade de solubilização de fosfato inorgânico (Pi) pelas estirpes padrões e isolados de plantas de arroz em meio sólido NBRIP.	23
Tabela 8. Indicação de produção de sideróforos de diferentes isolados de arroz, usando meio NFb sólido, sem azul de bromotimol e com NH ₄ Cl a 0,1% e CAS. Utilizando a estirpe Sp245 de <i>A. brasilense</i> como controle aos 7 e 12 dias após incubação.	25
Tabela 9. Propriedades benéficas dos isolados obtidos das cultivares de arroz EPAGRI-109 e BRS TROPICAL.	26
Tabela 10. Similaridade entre as sequências do gene que codifica o 16S RNAr das bactérias isoladas com as sequencias depositadas no banco de dados (GenBank).....	30
Tabela 11. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas na ocasião da inoculação do experimento gnotobiótico.	31
Tabela 12. Massa fresca de parte aérea e raiz de plantas de arroz irrigado, cultivadas em condições gnotobióticas e inoculadas com bactérias diazotróficas aos 30 dias após a inoculação (média de quatro repetições).	32
Tabela 13. Massa seca de parte aérea e raiz de plantas de arroz irrigado, cultivadas em solução de Hoagland inoculadas com bactérias diazotróficas aos 30 dias após a inoculação, (média de quatro repetições).	35
Tabela 14. Relação Raiz/Parte aérea da massa seca plantas de arroz irrigado, cultivadas em solução de Hoagland inoculadas com bactérias diazotróficas aos 30 dias após a inoculação, (média de quatro repetições).	37
Tabela 15. Incremento na biomassa de plântulas de arroz das cultivares IR42, BRS TROPICAL e EPAGRI-109.	38
Tabela 16. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas presente na terra utilizada como substrato.	38
Tabela 17. Contagem de bactérias realizadas no inoculante produzido e utilizado no experimento em vasos em casa de vegetação.	39
Tabela 18. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas presentes nas raízes de plantas de arroz das cultivares EPAGRI-109 e BRS TROPICAL nas fases de desenvolvimento vegetativo (60 DAP) e de maturação de grãos (120 DAP) adubadas com 30 kg de N há ⁻¹	40

Tabela 19. Inoculação de bactérias diazotróficas nos parâmetros altura e perfilho aos 60 DAP, Massa seca total aos 60 DAP e aos 120 DAP; número de panícula; peso de 100 grãos e produção de grãos nas cultivares de arroz BRS TROPICAL e EPAGRI-109 em diferentes doses de adubação nitrogenada.41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. A Cultura do Arroz.....	2
2.2. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV)	3
2.2.1. Fixação biológica de nitrogênio	3
2.2.2. Produção de auxinas	4
2.2.3. Solubilização de fosfatos inorgânicos	5
2.2.4. Produção de sideróforos	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1. Métodos Gerais Utilizados nos Experimentos	7
3.1.1. Cultivares de arroz utilizadas	7
3.1.2. Estirpes utilizadas como padrões bacterianos nas análises morfológicas, fisiológicas e moleculares.....	8
3.2. Contagem e Isolamento de Bactérias Diazotróficas	8
3.2.1. Isolamento de bactérias diazotróficas a campo.....	8
3.2.2. Isolamento de bactérias diazotróficas em experimento em casa de vegetação.....	8
3.2.3. Preparo das amostras	9
3.2.4. Meios de cultura e condições de cultivos para obtenção dos isolados.....	9
3.3. Caracterização Fisiológica	9
3.3.1. Atividade de redução de acetileno (ARA)	9
3.3.2. Avaliação da produção de compostos indólicos (AIA).....	10
3.3.3. Solubilização de fosfato.....	10
3.3.4. Produção de sideróforos	11
3.4. Caracterização Morfológica.....	11
3.5. Caracterização Molecular.....	11
3.5.1. Extração de DNA.....	11
3.5.2. Amplificação do gene que codifica RNAr 16S (DNAr 16S).....	12
3.5.3. Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados	13
3.6. Ensaios de Interação Planta – Bactéria.....	13
3.6.1. Seleção dos isolados de trabalho.....	13
3.6.2. Experimento de inoculação em tubos de ensaio em condições gnotobioticas.....	13

3.6.3. Experimento de inoculação em casa de vegetação	14
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1. Contagem e Isolamento de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio.....	16
4.1.1. Número mais provável (NMP) de bactérias em diferentes partes das plantas e solo rizosférico associado às cultivares de arroz EPAGRI 109 e BRS TROPICAL	16
4.1.2. Isolamento de bactérias diazotróficas a campo e casa de vegetação	17
4.2. Resultados da Caracterização Fisiológica	19
4.2.1. Atividade de redução de acetileno (ARA) dos isolados obtidos nas cultivares de arroz testadas	19
4.2.2. Avaliação das estirpes selecionadas quanto à produção de auxinas	21
4.2.3. Avaliação da solubilização de fosfato	23
4.2.4. Avaliação da produção de sideróforos	24
4.3. Resultados da Caracterização Fenotípica dos Isolados.....	27
4.3.1. Morfologia das colônias	27
4.3.2. Reação de Gran	27
4.4. Resultados da Caracterização Molecular	28
4.4.1. Qualidade do DNA genômico.....	28
4.4.2. Análise do gene 16S DNAr	28
4.4.3. Sequenciamento	30
4.5. Efeito da Inoculação de Bactérias Diazotróficas no Desenvolvimento Inicial de Plantas de Arroz em Tubos de Ensaio	30
4.6. Inoculação de Bactérias Diazotróficas em Diferentes Variedades de Arroz e Doses de Nitrogênio em Vasos em Casa de Vegetação	38
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
7. ANEXOS	54

1. INTRODUÇÃO

Dentre os cereais o arroz (*Oryza sativa L.*) desempenha um importante papel na nutrição de mais da metade da população mundial. Estima-se que esse cereal contribua com aproximadamente 20% da energia e 15% da proteína que é consumida pelo homem nos cinco continentes (KENNEDY & BURLINGAME, 2003). Devido à sua longa história de cultivo e seleção em diversos ambientes, o arroz adquiriu uma vasta gama de adaptabilidade e tolerância, de modo que ele pode ser cultivado em diferentes ambientes tanto de várzeas a cultivo em terras altas.

O Brasil é o 9º maior produtor de arroz do mundo, sendo a maior parcela de sua produção proveniente dos ecossistemas de várzeas dos Estados do sul do país, as quais são irrigadas por inundação. O Estado do Rio de Janeiro apesar de ser um dos maiores consumidores de arroz, não figura entre os maiores produtores brasileiros dessa cultura. No Brasil, na safra 2012/2013, o arroz foi plantado em 2,4 milhões de hectares, produzindo cerca de 11,85 milhões de toneladas com uma produtividade média de 4,8 toneladas por hectare. O arroz produzido no estado do Rio de Janeiro corresponde a menos de 1% da safra nacional, aproximadamente 4,3 mil toneladas (CONAB, 2014).

A cultura do arroz no Estado do Rio de Janeiro passou por profundas mudanças com reflexos na área plantada. Em 1960 a produção de arroz no Estado do Rio de Janeiro foi de 117,3 mil toneladas, porém, em 1995 esses valores haviam sido reduzidos em mais de 71%, concomitante com uma redução de 87% da área plantada. Uma das possíveis causas para o desinteresse pela Orizicultura no Estado do Rio de Janeiro foi o aumento do custo de produção da cultura (AMORIM NETO & ANDRADE, 2008).

A produção de arroz é dependente principalmente de fertilizantes químicos, os quais apresentam custos elevados e alta capacidade de poluir o meio ambiente. Uma alternativa para a substituição de parte desses insumos está no uso de microorganismos que possam exercer no sistema solo-planta algumas funções importantes como: fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de fitohormônios, seqüestro de ferro por siderofóros, controle biológico de pragas e doenças e outras funções benéficas à planta.

Estudos têm demonstrado que as bactérias diazotróficas, além de contribuírem com parte do N requerido pela cultura de arroz via fixação biológica de nitrogênio (FBN), possuem outras características de promotores do crescimento vegetal, o que podem agregar benefícios a planta via interação planta-bactéria (ARAÚJO et al., 2013; ESTRADA et al., 2013).

Com a recente demanda para produção mais sustentável e em consonância com as políticas governamentais do Programa de Agricultura de Baixo Carbono (ABC), torna-se premente a busca de alternativas de manejo sustentáveis que visem mitigar os efeitos causados pelo uso intensivo dos solos com cultivos agrícolas.

Esse trabalho teve como objetivo isolar e selecionar bactérias diazotróficas associadas às cultivares de arroz, EPAGRI-109 e BRS TROPICAL recomendadas para o plantio no Estado do Rio de Janeiro e avaliar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas (BD), dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* nessas cultivares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Cultura do Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos principais alimentos da população mundial, é cultivado e consumido em todos os continentes e destaca-se pela produção, área de cultivo, e características nutricionais, que confere a este cereal um papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social. O gênero *Oryza*, pertencente à família Poaceae (gramineae), é uma cultura anual, monocotiledônea e semi-aquática que engloba entorno de 23 espécies. Dispersou-se pelo mundo todo, e é considerada uma espécie polifilética. Atualmente a espécie *Oryza sativa* encontra-se subdividida em três subespécies, indica, japonica e javanica (PEREIRA, 2002; FAO, 2014).

A produção mundial de arroz em 2013 foi de 744,9 milhões de toneladas (496,6 milhões de toneladas, beneficiado), sendo que mais da metade dessa produção é oriunda do sistema de cultivo irrigado e concentrada no continente Asiático (FAO, 2014). No Brasil, o plantio está classificado em dois sistemas, o plantio “de várzea” e plantio “de terras altas”. De acordo com o manejo hídrico, estes sistemas de plantios podem ser subdivididos em: a) sistema irrigado por inundação; b) sistema com irrigação não controlada; c) sistema de várzea úmida; d) sistema de sequeiro tradicional e sistema de sequeiro sob irrigação suplementar por aspersão (GUIMARÃES E SANT`ANA, 1999).

No Brasil, na safra 2012/2013, o arroz foi plantado em 2,4 milhões de hectares, produzindo cerca de 11,85 milhões de toneladas com uma produtividade média de 4,9 toneladas por hectare. O Brasil ocupa atualmente o 9º lugar da produção mundial, o estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional. O estado do Rio de Janeiro, apesar de ser um dos maiores consumidores de arroz, não figura entre os maiores produtores brasileiros da cultura (CONAB, 2014; MAPA, 2014).

Quanto à importância da cultura no Estado do Rio de Janeiro, as regiões onde tradicionalmente se planta arroz são: norte, noroeste e baixadas litorâneas do Estado. Os solos mais utilizados para a cultura tem sido os Argissolos localizados em várzeas úmidas (AMORIM NETO & ANDRADE, 2008, LIMA & ZONTA, 2013).

A cultura do arroz no Estado do Rio de Janeiro passou, por profundas mudanças, com reflexos na área plantada. A área cultivada no Estado já chegou a mais de 80 mil ha na década de 60 (AMORIM NETO et al., 1999). Hoje de acordo com dados da CONAB (2014), na safra 2012/2013, a área destinada ao plantio deste cereal foi de 1,4 mil ha, produzindo 4,3 mil toneladas de grãos.

Uma das possíveis causas para o desinteresse pela Orizicultura no Estado do Rio de Janeiro foram os aumentos do custo de produção da cultura e os baixos preços praticados, o que levou muitos produtores a abandonarem o cultivo de arroz conforme citado por Amorim Neto & Andrade (2008). Segundo estes autores, a orizicultura no Rio de Janeiro só trará retorno econômico aos produtores quando se conseguir reduzir os custos de produção da cultura, por meio de medidas como, o uso de cultivares resistentes as doenças e adaptada a região de plantio, assim como o uso da adubação adequada.

A orizicultura requer uma grande quantidade de nutrientes para sua produção. Um dos fatores que mais limita a produção de arroz é a baixa disponibilidade de nitrogênio (N) nos solos característicos dessa cultura, devido as perdas característica dos sistemas de produção, ocorridas por desnitrificação, volatilização da amônia e lixiviação de nitrato (DOBEREINER, 1997; JEYABAL E KUPPUSWAMY, 2001; PEREIRA, 2002; CHOULHURY & KENNEDY, 2005).

2.2. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV)

As perdas de fertilizantes sintéticos podem ser minimizadas através de diferentes mecanismos, como por exemplo, a diminuição da quantidade aplicada e o aumento da eficiência na utilização do nutriente. Como uma dessas alternativas está o uso de microrganismos com características promotoras de crescimento vegetal, que podem atuar em diferentes mecanismos auxiliando a planta na captação de nutrientes e consequente diminuição do impacto ambiental gerado pela utilização excessiva de fertilizantes sintéticos (CHOULHURY & KENNEDY, 2005).

As BPVC podem ser encontradas em habitats naturais colonizando o interior e exterior de órgãos vegetais, nos quais exercem algumas funções benéficas como: controle biológico de pragas e doenças, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de fitohormônios, diminuição de estresse salino e, indiretamente por exercer antagonismos a fungos patogênicos mediados pela produção de diversos compostos como, por exemplo: sideróforos, quitinase e antibióticos (DOWNING et al., 2000; BALDANI et al., 2002; LEE et al., 2004; VIDEIRA, 2008, FIGUEREDO et al., 2010, ROJAS-TAPIAS, et al, 2012; ESTRADA et al., 2013).

2.2.1. Fixação biológica de nitrogênio

O Nitrogênio é o nutriente mais abundante na atmosfera, corresponde a aproximadamente 78% da fração gasosa do ar atmosférico na forma de N_2 , um gás inerte, que não reage quimicamente nas condições naturais. Este elemento não está prontamente disponível nos solos, e sua entrada nos sistemas biológicos ocorre de três formas distintas: através do arraste, pela chuva, de óxidos de nitrogênio produzidos na atmosfera por descargas elétricas, que representa 10% da contribuição global, através da produção de adubo pela indústria de fertilizante devido ao processo industrial Haber–Bosch de transformação de N_2 em NH_3 que contribui com 25% da contribuição global e a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (BACA et al., 2000; SOUZA & FERNANDES, 2006).

No caso da FBN a contribuição global corresponde a 60%, sendo este processo, o maior responsável pelo fornecimento de nitrogênio disponível nos solos para a nutrição de plantas. A FBN é um processo complexo que ocorre em algumas células procariontas, bactérias e cianobactérias, as quais são capazes de transformar o N molecular (N_2) em NH_3 (BACA et al., 2000; BALDANI & BALDANI, 2005; KRAISER et al, 2011).

A conversão enzimática do N_2 a amônia é catalisada pela nitrogenase, um complexo enzimático redox-ativo altamente conservado em bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas. A forma mais comum de nitrogenase, conhecida como Mo-nitrogenase ou nitrogenase convencional que corresponde a um heterotetrâmero formado por duas subunidades, a dinitrogenase e a dinitrogenase redutase. A dinitrogenase é composta por duas subunidades, sendo a subunidade α aquela que contém o sítio ativo para a redução do nitrogênio no qual se liga um cofator composto de molibdênio, ferro e enxofre, chamado de FeMo-cofator. Alguns microrganismos contêm nitrogenases ditas alternativas, onde o Mo é substituído pelo Vanádio (V) ou Ferro (Fe) na biossíntese do cofator (REIS et al.,2006; FRANCHE, 2009).

A enzima nitrogenase é extremamente versátil, pois além de transformar o N_2 em amônia, ela também catalisa a redução de vários outros substratos, tais como o acetileno. Em função disto, a atividade de redução do acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4), tem particular importância no estudo dos sistemas fixadores de N_2 servindo como base de uma técnica para estimar indiretamente a atividade da nitrogenase (BODDEY et al,1990; STOLTZFUS et al., 1997; MOREIRA E SIQUEIRA, 2002).

Os fertilizantes nitrogenados não são utilizados eficientemente em muitas partes do mundo o que pode acarretar grandes perdas para o ambiente por volatilização e lixiviação desse nutriente causando degradação ambiental. Estudos têm apresentado considerações sobre a contribuição dos sistemas biológicos e o aporte de N via fertilizantes sintéticos e demonstrando que entrada de fertilizantes sintéticos nitrogenados em sistemas agrícolas mundiais é abaixo da fixação biológica global estimada em 175 Tg N (milhões de Mg), bastante significativa, chegando a 82 Tg de N (milhões de Mg). Enquanto a eficiência do uso de fertilizantes nitrogenados foi estimada em aproximadamente 50% (MOSIER, 2002).

A cultura do arroz remove grandes quantidades de N para seu crescimento e produção de grãos que pode variar de 16-17 kg para a produção de uma tonelada de arroz em casca, incluído a palha. Por isso, o fornecimento de nitrogênio assume uma particular importância para a cultura do arroz, assim como a associação desta cultura com diversas bactérias fixadoras de nitrogênio, que podem contribuir com parte do nitrogênio requerido pela planta (CHOULHURY & KENNEDY, 2005).

Em plantas de arroz, muitos gêneros de bactérias diazotróficas têm sido isolados nos últimos anos, como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Sphingomonas*. Muitos trabalhos em regiões tropicais têm demonstrado resultados positivos da inoculação destes diazotrófos em muitas variedades, seja ela irrigada ou de sequeiro (BALDANI et al., 2000; TRAN VAN et al, 2000; BALDANI & BALDANI, 2005; RODRIGUES et al, 2006; RODRIGUES et al, 2008; PEDRAZA et al., 2009; ARAÚJO et al, 2013).

Dentre os gêneros supracitados *Azospirillum* e *Herbaspirillum* assumem vital importância em estudos de inoculação e quantificação da FBN na cultura de arroz. As espécies *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* foram isoladas associadas cereais de importância alimentar, incluído o arroz (BALDANI, 1984; BALDANI et al., 1986, BALDANI & BALDANI, 2005).

A primeira espécie de *Azospirillum* foi descrita em 1925 e em 1976 houve o primeiro relato de isolamento associado a gramíneas Tropicais por Dobereiner e Day. (BASHAN e LEVANONY, 1990). As bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de colonizar a raiz dos vegetais. Por isso são chamadas associativas, como é o caso de *A. brasiliense* e *A. lipoferum* (TARRAND et al., 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983).

A espécie *H. seropedicae* foi isolada de milho, trigo e arroz em 1984 em Seropedica, RJ, é uma bactéria endofítica capaz de associar-se a uma ampla gama de plantas incluído o arroz e participar na promoção do crescimento desse vegetal (BALDANI et al., 1986; BALDANI et al, 2000; BALDANI & BALDANI, 2005).

Trabalhos de inoculação de bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em plantas de arroz têm demonstrado resultados bastante interessantes como: crescimento da parte aérea e ramificações radiculares. Aumento no número de perfilho, produção de grãos e N-total dos grãos (DIDONET et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2003; FERREIRA et al., 2010; ISAWA et al., 2010; PUNSCHKE & MAYANS, 2011).

2.2.2. Produção de auxinas

As plantas usam grande variedade de moléculas reguladoras para a realização de suas funções vitais, incluindo esteróides e peptídeos, sendo o sinergismo, antagonismos e balanço quantitativo, ferramenta do vegetal para o controle de suas funções de crescimento, diferenciação e desenvolvimento. Fitohormônios são classificados em cinco classes de acordo com suas funções nas plantas, são eles auxinas, ácido abscísico, citocininas, etileno e giberelinas. Estes compostos são importantes reguladores de crescimento e mediam na planta as respostas a estresses bióticos e abióticos (TEALE et al., 2006; SANTNER et al, 2009).

As auxinas são um grupo importante de fitormônios, o nome auxina do grego "crescer", se refere a uma classe de pequenas moléculas que apresentam a capacidade de induzir resposta de crescimento em plantas. Elas regulam a embriogênese, a diferenciação de órgãos, arquitetura de raízes e parte aérea, a dominância apical, tropismos entre outras (TAIZ e ZEIGER, 2006).

O ácido indol-acético (AIA) é a auxina mais abundante e um fitohormônio indispensável capaz de regular diversos aspectos do desenvolvimento da planta (TEALE et al., 2006). A diversidade de funções que tem o AIA nas plantas é refletida pela complexidade de sua biossíntese, transporte e vias de sinalização. É sintetizado a partir do triptofano através, de pelo menos, duas vias: a da via triptamida (TAM) e a do indol-3-piruvato (IPA) (SANTNER et al., 2009). Nas bactérias, as vias metabólicas predominantes são: a via do indol-3-acetamida (IAM) e a do indol-3-piruvato (IPA) (SPAEPEN, 2009).

Neste contexto as bactérias sintetizadoras de ácidos indólicos, assumem grande importância em ensaios de inoculação com plantas e, tem-se buscado isolados eficientes e capazes de produzir este hormônio, visando uma possível aplicação das bactérias em diversas culturas. Estudos têm revelado grande variabilidade entre as estirpes quanto à capacidade de produzir auxinas. Estas estirpes quando inoculadas em plantas podem promover o aumento do crescimento vegetal em relação aos tratamentos controle (ASGHAR et al., 2002; KHALID et al., 2004; KUSS et al., 2007; RICHARDSON et al., 2009).

2.2.3. Solubilização de fosfatos inorgânicos

O fósforo (P) depois do nitrogênio é o segundo nutriente mais exigido pelas plantas, pois participa de vários processos metabólicos, como a transferência de energia, fotossíntese, respiração celular e, é o constituinte fundamental do ATP (Adenosina Trifosfato) o principal composto de transferência de energia do metabolismo. Porém no solo o P é o nutriente menos prontamente disponível para a assimilação pelas plantas. Mesmo quando fertilizantes são aplicados, a maior parte do P adicionado é adsorvido em colóides do solo e torna-se não disponível na forma de compostos de baixa solubilidade, que não propiciam uma contribuição imediata para a produção vegetal. (ARAÚJO & MACHADO, 2006).

A solubilização de fosfatos é uma característica apresentada por muitas bactérias e fungos do solo em associação com a rizosfera de diferentes espécies de plantas. Esses microrganismos desenvolveram processos metabólicos que são efetivos na solubilização e mineralização do P a partir de formas pouco disponíveis de fósforo inorgânico como as rochas fosfáticas e orgânicas como a matéria orgânica. Os processos metabólicos envolvidos na solubilização e mineralização de P incluem a excreção de íons de hidrogênio, a liberação de anions orgânicos, produção de sideróforos e liberação de fosfatases (RICHARDSON et al., 2001).

Vários gêneros bacterianos são relatados com capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos *in vitro* como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Exiguobacterium*, *Cornybacterium*, *Vibrio*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Pantoea*, inclusive gêneros de bactéria diazotróficas como *Burkholderia*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* (NAUTIYAL, 1999; DEUBEL et al., 2007; SARAVANAN et al., 2008; KUDU et al., 2009; COLLAVINO et al., 2010; XIANG et al., 2011; GHOSH et al., 2012; ROJAS-TAPIAS et al., 2012; ESTRADA et al., 2013).

Microrganismos solubilizadores de fosfato podem desempenhar importante papel no fornecimento de fosfato para as plantas de uma forma mais favorável ao meio ambiente. A solubilização dos compostos fosfatados é muito comum em condições laboratoriais e em

condições de campo não tem sido relatado com frequência, devido às dificuldades de se trabalhar em um ambiente não controlado (KHAN, et al., 2007; BONILLA, 2011).

2.2.4. Produção de sideróforos

O Ferro (Fe) é um nutriente essencial às plantas, e no solo se apresenta na forma divalente (Fe^{2+}) e trivalente (Fe^{3+}), dependendo do estado de oxi-redução do sistema. Muitos solos cultivados apresentam baixo teor de Fe, tanto em solução como adsorvido ao solo em forma trocável. Nas plantas, o ferro participa em reações fundamentais de óxido-redução, tanto em hemoproteínas (citocromos, leghemoglobina, catalase, peroxidase, superóxido dismutase, etc) como em proteínas não-hémicas com ligação Fe-S como ferredoxina e enzimas redutase, nitrogenase e sulfato redutase (DECHER & NACHTIGALL, 2006).

Os microrganismos apresentam diversas estratégias para a aquisição de ferro e, ao mesmo tempo, proteger-se de seus potenciais efeitos tóxicos. Dentre as estratégias utilizadas por bactérias e fungos para aquisição do ferro está a produção e utilização de sideróforos, que são moléculas de baixo peso molecular ($< 1,500$ Da) capazes de complexar o ferro. Os microrganismos produtores de sideróforos captam o Fe do ambiente e o disponibiliza para a planta. Este fato pode melhorar o crescimento vegetal aumentando a disponibilidade de Fe para a planta através de sua captação impedindo o crescimento de patógenos de solo devido à limitação do ferro no ambiente (RACHID & AHMED, 2005; CHAIHARN et al., 2009; TORTORA et al., 2011).

Neilands (1995) definiu sideróforos (do grego: "carreadores de ferro"), como moléculas de baixo peso molecular quelante específico de íon férrico, elaboradas por bactérias e fungos que crescem sob baixa concentração de ferro. Sua função é sequestrar o ferro do ambiente, o que é quase sempre essencial, e fazer o mineral acessível à célula microbiana.

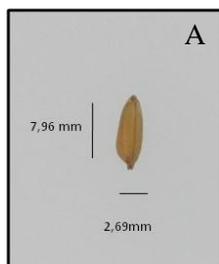
Um método bem conhecido e amplamente difundido e utilizado para a detecção da produção de sideróforos por microrganismos em meio sólido é o universal cromo azurol S (CAS)-agar. É muito empregado na avaliação de bactérias e fungos (SCHWYN & NEILANDS, 1987; TORTORA et al, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

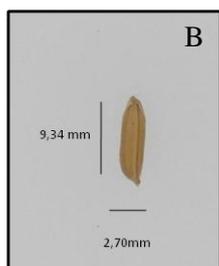
3.1. Métodos Gerais Utilizados nos Experimentos

3.1.1. Cultivares de arroz utilizadas

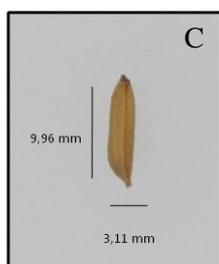
Neste estudo foram utilizadas duas cultivares de arroz de sistemas irrigados por inundação indicadas e/ou produzidas no Estado do Rio de Janeiro e uma como referência a interação planta-bactéria (Figura 1).



IR42, lançada na década 70, pelo IRRI (International Rice Research Institute), para pequenos agricultores do sul e sudeste da Ásia, a cultivar espalhou pelo mundo e foi plantada em muitos países. No Brasil é referência em estudos de inoculação com bactérias diazotróficas devido ao seu alto potencial para a fixação biológica de nitrogênio, ciclo longo (130 dias), alta capacidade de perfilhamento e rendimentos de grãos. (OLIVEIRA, 1994; KUNDU e LADHA, 1995).



EPAGRI-109, lançada em 1996, pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária E Extensão Rural de Santa Catarina). É uma cultivar de tipo moderno e destaca-se pelo excelente potencial em produtividade tendo alta capacidade de perfilhamento, boa qualidade de grãos, alto rendimento, ciclo longo (142 dias). Foi produzida em vários estados Brasileiros (VIEIRA et al, 2007). Esta cultivar está indicada pela PESAGRO-RJ para plantio no Estado do Rio de Janeiro.



BRS TROPICAL, lançada em 2007, pela EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, foi indicada para plantio no Estado do Rio de Janeiro. A cultivar possui um bom potencial produtivo e características agrônômicas e culinárias. A cultivar BRS Tropical é produtiva, tem boa tolerância às doenças de arroz, ciclo longo (140 dias) e excelente qualidade dos grãos (CUTRIN et al., 2008).

Figura 1. Fotografias de grãos de arroz das cultivares IR42 (A), EPAGRI-109 (B) e BRS TROPICAL (C).

3.1.2. Estirpes utilizadas como padrões bacterianos nas análises morfológicas, fisiológicas e moleculares.

As seguintes estirpes foram usadas como referências para a comparação nas análises: *Azospirillum brasilense* (Sp245), *A. amazonense* (CBAmC), *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94) e ainda *Burkholderia tropica* (Ppe8) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5), para alguns testes fisiológicos.

3.2. Contagem e Isolamento de Bactérias Diazotróficas

Os isolados foram originários de plantas de arroz das cultivares EPAGRI 109 e BRS TROPICAL cultivadas em Campos dos Goytacazes em condições de campo e em Seropédica em condições de casa de vegetação, respectivamente.

3.2.1. Isolamento de bactérias diazotróficas a campo

Após levantamento junto aos órgãos de assistência técnica de produtores de arroz nas Regiões norte e noroeste do Estado do Rio de Janeiro foi possível saber que a cultivar mais plantada atualmente no estado era EPAGRI 109, recomendada pela PESAGRO, RJ. O produtor de arroz Jayme Landin que utilizava esta cultivar em sua propriedade, localizada no município de Campos dos Goytacazes, foi contactado. E algumas plantas desta localidade foram coletadas, com permissão verbal do dono da terra.

A coleta de material para isolamento e contagem de bactérias fixadoras na cultivar EPAGRI- 109. Foi realizada no final do período vegetativo, no dia 15 de janeiro de 2013 em dois talhões presente na propriedade, talhão 103, que foi plantado em 15 de Setembro de 2012 e talhão 104 que foi plantado em 15 de Outubro de 2012 (Em anexo a análise de terra, cedida pelo produtor).

Amostras integrais de plantas entre 100 e 120 dias após o plantio (fase final do estágio vegetativo) foram coletadas, acondicionadas individualmente em sacos plásticos e encaminhadas para o laboratório de preparo e lavagens de amostras da Embrapa Agrobiologia. No laboratório as plantas foram lavadas, separadas em solo rizosférico e tecidos vegetais (Parte aérea e Raiz) e preparadas de acordo com a metodologia proposta por DÖBEREINER et al. (1995) para o isolamento de bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum sp.* e *Herbaspirillum sp.*

3.2.2. Isolamento de bactérias diazotróficas em experimento em casa de vegetação

Como não foi encontrado, em nosso processo de busca, produtor de arroz da cultivar BRS TROPICAL, recomendada para plantio no Estado do RJ pela Embrapa (CUTRIM et al, 2004), foi conduzido um experimento em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia exclusivamente para o isolamento das bactérias alvo deste estudo. As sementes desta cultivar foram gentilmente doadas pela Embrapa Arroz e Feijão. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com um tratamento de inoculação com *Azospirillum brasilense* (Sp 245).

O plantio das sementes foi feito em vasos com capacidade para 20 kg, contendo terra originária dos primeiros 20 cm do horizonte A de um Argissolo Série Ecologia, não estéril, oriundo do Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia. O plantio foi feito utilizando 16 plantas por vaso. As plantas foram colhidas, separadas em solo rizosférico e tecidos vegetais (Parte aérea e Raiz) e preparadas para o isolamento de acordo com a metodologia proposta por DÖBEREINER et al. (1995).

3.2.3. Preparo das amostras

O solo presente na rizosfera das plantas foi coletado, homogeneizado, pesado e utilizado como uma amostra composta de 10 g. Esta amostra foi transferida para frascos contendo 90 ml de solução salina (Anexo A). As raízes e parte aérea foram lavadas com água destilada, fragmentadas em pedaços menores e em seguida 10 g dos mesmos foram pesados. Após as etapas anteriores, as amostras foram trituradas com 90 ml de solução salina em liquidificador de uso doméstico.

Depois as amostras originais correspondentes à suspensão em solução salina foram diluídas em série, transferindo 1 ml da suspensão anterior a tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina, até a diluição 10^{-6} para a Parte aérea, raiz e solo rizosférico. Em seguida uma amostra de 0,1 ml de cada diluição foi utilizada para inocular, em triplicata, frascos contendo 5 ml dos respectivos meios semi-sólidos.

3.2.4. Meios de cultura e condições de cultivos para obtenção dos isolados

Em meio de cultura semi-sólido as bactérias diazotróficas formam película na superfície, característica comum entre elas. Para o primeiro isolamento (com plantas provenientes de Campos de Goytacazes) foram utilizados os meios semi-sólidos JNFb, NFb e LGI semi-específicos para os gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e a espécie *Azospirillum amazonense*, respectivamente (Anexo B).

Já para o segundo isolamento (Seropédica) resolveu-se usar somente os meios JNFb e NFb. Os frascos inoculados foram incubados a 30°C por um período de 5 dias, até o desenvolvimento da película na região superficial do meio. Após o desenvolvimento da película foram realizadas, cerca de cinco reinoculações para confirmação da capacidade das bactérias formarem película e purificação das mesmas. Após, as culturas bacterianas foram inoculadas em placas de meio sólido (NFb 3X) e LGI.

A confirmação da pureza dos isolados foi realizada em meio batata sólido (Anexo B) (BALDANI & DÖBEREINER., 1980; DÖBEREINER et al., 1995; BALDANI., 1996; Videira, 2007). A tabela de McCrady (Döbereiner et al., 1995) foi utilizada para a contagem do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por grama de tecido fresco, seguido da transformação dos dados para $\log_{(10)}$.

3.3. Caracterização Fisiológica

3.3.1. Atividade de redução de acetileno (ARA)

A atividade da nitrogenase dos isolados foi avaliada pelo método de Redução de Acetileno (ARA) (BODDEY et al., 1990). As bactérias *Azospirillum brasilense* (sp245), *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94) e *Azospirillum amazonense* (CBAmC), foram utilizadas como controles positivo.

Uma alíquota de 10µl da cultura bacteriana foi transferida para frascos de 10 ml contendo 5 ml dos meios semi-sólidos sem indicador NFb, JNFb, e LGI, cada isolado foi inoculado em quadruplicata. Estes frascos foram incubado a 30°C, por até 4 dias, e avaliado as 24, 48, 72 e 96 horas (Anexo C).

Os frascos foram fechados com rolhas de borracha esterilizada e injetados 10% de sua fase gasosa com gás acetileno seguido de incubação por 1 hora a 30°C. Posteriormente, 0,5 ml da fase gasosa foram retiradas do frasco e injetado no cromatografo a gás com ionização de chama, modelo Perkin Elmer F11, utilizando uma coluna Poropak N de 50 cm a 40°C para a leitura do etileno formado (VIDEIRA, 2008).

Para a determinação de proteína total foi utilizada a metodologia descrita por Bradford et al (1976). Logo após a determinação do ARA, as películas foram misturadas com o meio de cultura e retirada uma alíquota de 20 µl. A esta amostra foi adicionada 20 µl de NaOH 1M e 60 µl de água destilada estéril, logo foram colocadas em banho Maria a 90 °C, por 5 minutos para favorecer a ruptura celular. Posteriormente, foi adicionados 900 µl do reagente de Bradford, em seguida os tubos foram agitados no vortex e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente.

O teor de proteína foi estimado em espectrofotômetro (Labsystems iEMS Reader MF) pela leitura de absorvância a 595 nm. Como controle foi utilizadas as mesmas amostras de meio de cultivo não inoculadas. As leituras foram normalizadas por meio de uma curva padrão previamente obtida com concentrações de 7,5-150 µg ml⁻¹ de soro-albumina bovina (BSA) (Videira, 2008).

3.3.2. Avaliação da produção de compostos indólicos (AIA)

A quantificação dos compostos indólicos foi realizada conforme o método descrito por Sarwar e Kremer (1995) em microplaca. Uma colônia característica de cada estirpe foi cultivada em meio líquido DYGS sob agitação a 150 rpm por 24 a 30°C e normalizada a D.O.600=0,9-1. Posteriormente, 1 µl da cultura bacteriana foi inoculada em 6 ml de meio DYGS suplementado com L-triptofano na concentração final de 200µg ml⁻¹. Os tubos foram mantidos no escuro sob agitação de 150 rpm em uma temperatura de 30°C e foram realizadas medições as 24, 48 e 72 horas após o crescimento das culturas.

Para cada avaliação, alíquotas de 1 ml foram centrifugadas a 5,000 x g por 15 minutos. E em microplacas, 150µl do sobrenadante foi misturado a 100µl do reagente de Salkowski (1 ml de 0,5 M FeCl₃ em 49 ml de ácido perclórico 35 %), sendo as mesmas incubadas no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período foram realizadas leituras a 540 nm utilizando um espectrofotômetro (Labsystems iEMS Reader MF). As estirpes *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) e *Azospirillum brasilense* (Sp245), *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94) e *Azospirillum amazonense* (CBAmc) foram utilizadas como controles positivos. As leituras foram quantificadas por meio de uma curva padrão com concentrações conhecidas de ácido 3-indol-acético (10-80 mg.ml⁻¹).

Para normalizar os valores da determinação dos compostos indólicos, o conteúdo de proteínas foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976). As células centrifugadas durante o procedimento de determinação dos compostos indólicos foram ressuspensas em 1 mL de solução salina, alíquotas de 100 µL desta suspensão foram transferidas para um tubo contendo 100 µL de NaOH 1M. A mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente para lise das células. Posteriormente, 100 µL da solução anterior foi adicionado a 900 µL de solução de Bradford e incubada no escuro a temperatura ambiente por 30 minutos.

As leituras foram feitas em leitor de microplaca com comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteína foi determinada usando a curva padrão obtida pelos valores de absorvância das quantidades conhecidas de BSA (soro-albumina bovina), nas seguintes concentrações: 7,5-150 µg mL⁻¹. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o resultado foi decorrente de uma média das 3 leituras.

3.3.3. Solubilização de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato inorgânico foi testada em meio de cultura NBRIP sólido com Ca₃(PO₄)₂ (NAUTIYAL, 1999) de acordo com os protocolos estabelecidos pelo Laboratório de Solos da Corporação Colombiana de Investigação Agropecuária (Corpoica – sede Tibaitata, Col mbia) onde foi realizado um treinamento de

curta duração. As bactérias foram previamente cultivadas em meio DYGS líquido, permanecendo sob temperatura de 30°C por 24 horas com agitação constante a 150 rpm. Após esse período, foi medida a densidade óptica, normalizada a $D.O.600=0,9-1$.

Para a avaliação da capacidade de solubilização de fosfato, uma alíquota de 20 µl foi inoculada na superfície da placa de Petri, em forma de pontuações. Foram feitas três inoculações por placa, cada placa foi inoculada com o mesmo isolado, perfazendo assim as três repetições por isolado. As placas foram incubadas a 30°C logo após a inoculação. A avaliação da solubilização de fosfato foi feita, medido o diâmetro da colônia e do halo de solubilização, assim estabelecendo a eficiência pelo índice de solubilização em: diâmetro do halo - diâmetro da colônia como descrito em Nautiyal (1999). O halo foi percebido como uma área translúcida em torno da colônia, até o 15º dia após inoculação, e medido entre o intervalo de 48 horas.

3.3.4. Produção de sideróforos

A avaliação de sideróforos foi feita baseando-se no protocolo de SCHWYN y NEILANDS (1987), modificado por TORTORA et al (2011). Os isolados foram inoculados em triplicata, em meio NFb líquido livre de ferro e sem azul de bromotimol com NH_4Cl a 1%, incubados sob agitação de 150rpm por 48 horas. Após o crescimento os mesmos foram inoculados por triplicata em placas de Petri contendo meio NFb sólido, sem azul de bromotimol e com NH_4Cl a 0,1% e Cromo AzurolS (CAS) e incubada a 30°C. A concentração celular foi ajustada em uma $DO_{560} = 0,2$. A avaliação da formação de sideróforos foi realizada aos 7 e 14 dias de incubação. As vidrarias utilizadas nesta avaliação foram previamente lavadas com HCl a 10% para retirada de resíduos orgânicos, de acordo com o método usado.

3.4. Caracterização Morfológica

Os isolados foram caracterizados por plaqueamento em meio mínimo (NFb, JNFb e LGI) e em meio rico (BATATA) para o conhecimento da morfologia das colônias. As colônias formadas nos diferentes meios foram avaliadas aos cinco dias de incubação e as diferenças de cor, tipo e tamanho foram registradas por fotografia digital.

A reação de Gram foi feita de acordo com o protocolo sugerido por Yano et al. (1991), as bactérias foram crescidas em meio Batata e o esfregaço preparado a partir de uma colônia. A técnica consistiu na preparação de um esfregaço em lâmina de vidro, secagem ao ar e fixação das células em chama. Após a fixação se aplicou cristal violeta por 1 minuto, lavagem com água destilada, cobertura da lâmina com lugol por 1 minuto, lavagem com água destilada, descoloração com solução de álcool-cetona e lavagem com água destilada, cobertura com safranina por 30 segundos, lavagem com água destilada e secagem. A avaliação da coloração das células foi feita em microscópio óptico de contraste de fase com a objetiva de 100X com uso de óleo de imersão.

3.5. Caracterização Molecular

3.5.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi feita baseada no protocolo de solubilização e posteriormente precipitação, utilizando CTAB (SAMBROOK et al., 1989). Os isolados foram inoculados em meio DYGS líquido, permanecendo sob temperatura de 30 °C por 24 horas com agitação constante. Posteriormente, uma alíquota de 2 ml da cultura de bactérias foi transferida para um microtubo tipo Eppendorf e procedeu-se uma centrifugação a 4.000 x g por 8 minutos. Após o precipitado foi suspenso em 567 µl de $T_{10}E_1$ (10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM Na_2EDTA) sendo o material homogeneizado vigorosamente e, em seguida, foi adicionado 30

μl de SDS 10% e novamente homogeneizado por inversão adicionando-se também 3 μl de Proteinase K (20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Repetiu-se a homogeneização por inversão e em seguida procedeu-se a incubação a 65°C por 20 minutos.

Finalizado o período de incubação foi adicionado 100 μl de cloreto de sódio 5M e, novamente, homogeneizou-se por inversão, em seguida adicionou-se ao material 80 μl de CTAB/NACL (CTAB 10% em NACL 0,7 M) e novamente procedeu-se a incubação a 65°C por 20 minutos. Após a incubação foi, adicionado a esse material um volume de 700 μl de fenol-clorofórmio-alcool isoamílico (25:24:1); logo após deixou-se o material overnight no homogeneizador.

Transcorrido esse período o material foi centrifugado por 10 min a 4°C a 13.000 x g. O sobrenadante proveniente da centrifugação foi transferido para um novo microtubo ao qual adicionou-se 700 μl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugado por 10 min a 4°C a 13.000 x g. Em seguida o sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo microtubo de 1,5 ml ao qual adicionou-se 0,6 volume de Isopropanol gelado. O material foi incubado a 20 °C por 30 minutos. Após esse tempo o material foi novamente centrifugado por 10 min a 4°C a 13.000 x g e o sobrenadante foi descartado. O material ainda foi submetido a centrifugações de lavagens por 10 min a 4°C a 13.000 x g, com etanol 70% gelado. Cessadas as lavagens o material seco a temperatura ambiente e em seguida suspenso em 100 μl de T₁₀E₁ (10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM NA₂EDTA).

A seguir foi feita a quantificação e qualificação do DNA por eletroforese em gel de agarose 0,7%, Utilizou-se 5 μl de amostra, juntamente com 2 μl de tampão de amostra (0,25 % de azul de bromofenol e 40% de sacarose), e ainda 3 μl de padrão de peso molecular 1 kb Plus DNA ladder (invitrogen® Cat. No. 10787-018).

Após o preparo das amostras, e para promover a migração das amostras, o gel foi submetido à voltagem de 80 volts por 90 minutos em tampão TAE 1X (0,04 M Tris acetato e 1 mM de EDTA). Em seguida o gel foi corado com uma solução de brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e visualizado com luz ultravioleta em fotodocumentador KODAK® Gel Logic 100 (KODAK Scientific Imaging Systems, Cat. N°. 172.8468) e um computador.

A análise dos géis foi realizada com o programa de aquisição e análise de imagens da KODAK® 1D Image Analysis (KODAK Molecular Imaging Systems, Cat. N°. 811.2344).

3.5.2. Amplificação do gene que codifica RNAr 16S (DNAr 16S)

Para a amplificação gene 16S DNAr foi utilizada a combinação de iniciadores AMP F e AMP R (Tabela 1). As condições utilizadas foram para uma reação com volume final de 50 μl , que continha 10% do volume final de tampão de PCR 10X; 3 μl de MgCl₂ (50 mM); 1 μl de dNTP (200 mM); 1 μl , de cada iniciador(5 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), 0,25 μl , da enzima Taq DNA polimerase (INVITROGEN®)(1,25U. μl^{-1}) e de 1 μl de DNA, completando o volume para 50 μl com água para PCR.

O procedimento foi aplicado de maneira asséptica e mantendo o material em gelo (4°C). Em seguida o material preparado foi colocado no termociclador e submetido à seguinte programação: um ciclo de desnaturação (95°C por 5 minutos), seguidos de 34 ciclos intermitentes (94°C por 15 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos), e um ciclo final de extensão (72°C por 30 minutos), seguidos por resfriamento (4°C por 24 horas).

Após o término do programa, os produtos desta amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 %. Utilizou-se 5 μl de amostra, juntamente com 2 μl de tampão de amostra (0,25 % de azul de bromofenol e 40% de sacarose), e ainda 3 μl de padrão de peso molecular 1 kb Plus DNA ladder (invitrogen® Cat. No. 10787-018). Após o preparo das amostras e para promover a migração, o gel foi submetido a voltagem de 100 volts por 60 minutos em tampão TAE 1X (0,04 M Tris acetato e 1 mM de EDTA).

Tabela 1. Indicadores utilizados nas reações para amplificação do gene 16S DNAr.

Iniciador	Sequencia 5'→ 3'	Referência
Amp - F	GAG AGT TTG ATY CTG GCT CAG	(WANG et al., 1996)
Amp - R	AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA	(<i>apud</i> WANG et al., 2002)

Em seguida, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídeo (0,5 µg. ml⁻¹) e visualizado com luz ultravioleta em fotodocumentador KODAK[®] Gel Logic 100 (KODAK Scientific Imaging Systems, Cat. N°. 172.8468) e um computador. A análise dos géis foi realizada com o programa de aquisição e análise de imagens da KODAK[®] 1D Image Analysis (KODAK Molecular Imaging Systems, Cat. N°. 811.2344).

3.5.3. Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados

A purificação dos produtos de amplificação foi feita usando o kit de purificação de DNA (Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit cat. A1120). Após a purificação, as amostras contendo os isolados purificados foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Genoma da Embrapa Agrobiologia. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o Kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems). Os iniciadores utilizados na reação foram AmpR ou AmpF (Tabela 1). As condições de reação de amplificação para sequenciamento foram: 96°C por 1 minuto, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão de 60°C por 4 minutos. O equipamento 3500 Applied Biosystems foi utilizado para obtenção das sequências.

3.6. Ensaios de Interação Planta – Bactéria

3.6.1. Seleção dos isolados de trabalho

Dos 39 isolados obtidos nas cultivares de arroz EPAGRI-109 e BRS TROPICAL, foram selecionados 18 isolados com base na análise de redução de acetileno (ARA). Estes isolados foram nomeados como: “isolados de trabalho” e foram utilizados para a seleção como promotores de crescimento vegetal (PCV) por meio de testes *in vitro*. Na seleção dos isolados como PCV foi possível escolher 12 isolados para serem testadas em condições gnotobioticas.

3.6.2. Experimento de inoculação em tubos de ensaio em condições gnotobioticas

Neste experimento de seleção de estirpes foram utilizados os 12 isolados mais promissores como promotores de crescimento vegetal.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial (3 x 20) em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 4 repetições, onde foram analisados três Cultivares de arroz irrigado (IR42, EPAGRI-109 e BRS TROPICAL) inoculadas com 12 isolados diazotróficos (TR-I1; TR-N1; EP3-1L; EP3-2L; EP3-7L; EP3-13J; EP3-14J; EP3-16N; EP4-1L; EP4-2J; EP4-5J; EP4-7J) e duas misturas contendo alguns desses isolados, MIX 1 (EP4-2J; EP3-13J e EP3-14J) e MIX 2 (TR-I1; TR-N1; EP4-1L; EP4-5J e EP3-14J), Além das bactérias padrões Z94 de *H. seropedicae*; Sp245 de *A. brasilense* e CBAMC de *A. amazonense*. Um inoculante comercial AZOTOTAL e a duas testemunhas não inoculadas, uma sem nitrogênio e outra com 2,60 mM na forma de Nitrato de amônio.

As estirpes foram reativadas em Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio DYGS, a 30° C sob agitação a 150 rpm por 24 horas. Nesse momento foi feita a contagem de

NMP como de acordo com Dobereiner et al, (1995) nos respectivos meio semi-sólido de isolamento de cada estirpe.

O experimento foi conduzido em tubos de ensaio com capacidade para 120 mL, contendo 50 mL de solução de Hoagland's - agar (6g L⁻¹), sem nitrogênio. Os tubos, contendo a solução nutritiva agarizada, foram tampados com uma rolha de algodão e esterilizados em autoclave. Após a esterilização e antes solidificação do agar, cada tratamento foi inoculado com 2 mL de cultura bacteriana previamente crescida. Os tratamentos controle foram inoculados com o meio de cultura estéril. As sementes descascadas foram desinfestada de acordo com Hurek et al. (1994) e pré germinada em placas Agar- água (1%) durante 48 horas. Cada tubo foi plantado com uma semente pré- germinada.

Após 30 dias da inoculação o experimento foi avaliado e os parâmetros massa fresca e seca da parte aérea e raiz das plantas de arroz, relação raiz/parte aérea e porcentagem de incremento foram utilizados para verificar a eficiência dos isolados utilizados.

Foi testada a normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Bartlett) dos dados no programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983). Logo, foram feitas análises de variância usando o programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2003) e comparação de médias pelo teste Scott-Knott (SCOTT e KNOTT, 1974) a 5 % de probabilidade.

3.6.3. Experimento de inoculação em casa de vegetação

a) Descrição do experimento

O experimento de inoculação em plantas de arroz com bactérias diazotróficas foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ. Implantado no dia 25 de Setembro de 2013 e colhido no dia 25 de janeiro de 2014. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com quatro repetições, em arranjo fatorial 6 x 4 x 2 x 2 com 6 tratamentos de inoculação, 4 doses de N (30, 60, 90 e 120 kg/ha), 2 épocas de coleta (Estádio vegetativo e maturação de grãos) e 2 variedades totalizando 384 vasos. Foram selecionadas para esse experimento as cultivares de arroz EPAGRI 109 e BRS TROPICAL.

Os tratamentos de inoculação consistiram em dois isolados promissores selecionados no experimento gnotobiótico, (o isolado EP4-1L e o isolado EP4-2J de *Azospirillum*), as estirpes de referência *Azospirillum brasilense* (Sp245) e *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94), o inoculante comercial AZOTOTAL e a testemunha não inoculada.

b) Preparo do inoculante

As estirpes foram reativadas em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio DYGS, a 30° C sob agitação a 150 rpm por 24 horas. Em seguida foram semeadas em placas de Petri com meio batata. Após a verificação da pureza, as estirpes foram multiplicadas em tubos contendo meio DYGS nas condições citadas anteriormente. As células foram lavadas com solução salina e a D.O. 600 foi ajustada para 0,9-1 e 5 ml da cultura foi inoculado em erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml do meio DYGS a 30° C sob agitação a 150 rpm por 24 horas. O número de células viáveis foi determinado pelo método de microplaca, no respectivo meio mínimo específico para cada bactéria.

O inoculante foi preparado, à base de turfa previamente moída, seca e com a acidez corrigida com carbonato de cálcio. A turfa passou por análise e um processo de esterilizações (FERREIRA et al., 2003; GUIMARÃES., 2006). Os inoculante, com exceção do inoculante comercial, foram preparados com a adição de 15 ml de suspensão bacteriana em sacos de polipropileno contendo 35 g de turfa. Este foi homogeneizado e incubado a 30°C por um período de 24 horas. Após esse período foi inoculado nas sementes de arroz com uma solução açucarada para dar aderência (FERREIRA et al., 2003; GUIMARÃES, 2006). Todos os

inoculantes foram usados para se fazer a contagem de NMP de acordo com Dobereiner et al. (1995) nos respectivos meio semi-sólido de isolamento de cada estirpe.

c) Implantação do experimento

Como substrato do experimento foi utilizado terra oriunda dos primeiros 20 cm do horizonte A de um Argissolo Vermelho Amarelo, Série Itaguaí do Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia. A partir da análise química do solo (Tabela 2), foi feita a adubação de plantio do experimento que consistiu de: 90 kg ha⁻¹ de P₂O₅, na forma de superfosfato simples e de 70 kg ha⁻¹ de K₂O na forma de cloreto de cálcio e 0,3 g.kg⁻¹ de FTE-BR12.

Tabela 2. Análise química da terra utilizada no experimento.

pH em H ₂ O	Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K	N	M.O
	cmolc dm ⁻³				mg dm ⁻³		%	
5,62	0,04	2,87	1,92	0,95	3,71	40	0,09	0,72

O plantio foi feito em vasos com capacidade para seis kg e contendo cinco kg de solo não estéril. Foram semeadas quatro sementes por vaso, sendo feito, 25 dias após o plantio, o desbaste deixando-se duas plantas por vaso. Os vasos foram inundados aos 30 dias sendo mantida lâmina de água de 2 cm sempre na mesma altura na realização do experimento.

A adubação nitrogenada foi parcelada em três vezes, sendo 25% no plantio, 37,5% no estágio vegetativo e 37,5% na floração, na forma de sulfato de amônio. No total foram usadas quatro adubações diferentes de N: 15 mg de N kg⁻¹ (30 Kg ha⁻¹); 30 mg de N kg⁻¹ (60 Kg ha⁻¹); 45 mg de N kg⁻¹ (90 Kg ha⁻¹); e 60 mg de N kg⁻¹ (120 kg ha⁻¹) para cada quilo de solo.

d) Determinação do número de bactérias

O número mais provável (NMP) de bactérias presentes nas raízes de plantas de arroz foi realizado em duas épocas, no período vegetativo (60 DAP) e no período de maturação dos grãos (120 DAP), na dose de 30 Kg ha⁻¹ de nitrogênio. E procedida de acordo com metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995). Os meios NFb, JNFb e LGI foram utilizados de acordo com seu respectivo tratamentos de inoculação. Nos tratamentos controle foram utilizados todos meios de cultura utilizados no experimento.

e) Parâmetros agronômicos analisados e apresentados

A colheita do material vegetal foi feita em duas épocas, no período vegetativo (60 DAP) e maturação o grão (120 DAP). Os parâmetros agronômicos analisados foram número de panículas, massa seca total, peso de 100 grãos e produção de grãos, que foram determinados após incubação em estufa de ventilação forçada a 65°C. O numero de perfilhos por planta e a altura das plantas foram avaliados aos 60 DAP.

f) Análise estatística dos dados

Foi testada a normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet) dos dados no programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983). Logo, foram feitas análises de variância usando o programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2003) e comparação de médias pelo teste Scott-Knott (SCOTT e KNOTT, 1974) a 5 % de probabilidade. Além do uso da análise de regressão para descrever a resposta das plantas aos diferentes níveis de adubação.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Contagem e Isolamento de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio

4.1.1. Número mais provável (NMP) de bactérias em diferentes partes das plantas e solo rizosférico associado às cultivares de arroz EPAGRI 109 e BRS TROPICAL

O isolamento e contagem de bactérias diazotróficas associado a cultivares de arroz indicadas para o plantio no Estado do Rio de Janeiro, seguiu diferentes estratégias desde a coleta de material a campo no caso da cultivar EPAGRI-109, ao plantio em casa de vegetação para a cultivar BRS TROPICAL.

A contagem do número mais provável (NMP) de bactérias mostrou que a associação de BD na cultivar EPAGRI -109, foi maior nas raízes e solo rizosférico das plantas, variando de 10^4 a 10^6 células por grama de massa fresca (Tabela 3). Na parte aérea das plantas, foram encontrados os menores valores variando de 10^3 a 10^4 células por grama de massa fresca. Porém houve uma pequena diferença entres os locais de isolamento, sendo o talhão 104 onde foram recuperados os maiores valores de BD na parte aérea desse experimento.

KUSS et al. (2007), em trabalho de isolamento e quantificação pela técnica de NMP de bactérias diazotróficas associadas a raízes de cultivares de arroz irrigado obteve valores de NMP na cultivar EPAGRI-109, variando de 10^6 a 10^7 células por grama de massa fresca de raiz, utilizando os meios de cultura NFb, JNFb e LGI como referência. O que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho.

Tabela 3. Número de bactérias presentes em partes aéreas, raiz e solo rizosférico de arroz da cultivar EPAGRI-109, cultivado em condições de campo. Dados expressos em Log_{10} por grama de massa fresca.

Tratamentos	Parte Aérea			Raiz			Solo Rizosférico			
	Meios	LGI	NFB	JNFb	LGI	NFB	JNFb	LGI	NFB	JNFb
Talhão 103		4,15	3,65	4,04	6,04	5,15	5,15	6,04	6,04	4,15
Talhão 104		5,15	4,65	5,15	6,04	6,15	6,04	4,65	6,04	5,15

O Número mais provável (NMP) da população de bactérias presentes na parte aérea, raiz e solo rizosférico da cultivar BRS TROPICAL, inoculada com *Azospirillum brasilense* (Sp 245) e não inoculada cultivada em casa de vegetação (Tabela 4).

Mostrou que a associação de Bactérias diazotróficas nesse experimento foi maior nas raízes permanecendo acima de 10^6 células por grama de massa fresca, para os dois tratamentos e nos dois meios utilizados, demonstrando assim uma maior associação desses microorganismos na rizosfera dessas plantas. Os menores valores foram encontrados na parte aérea e solo rizosférico das plantas não inoculadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Pedraza et al. (2009) onde a contagem de NMP nas folhas das plantas foi superior nos tratamentos inoculados quando comparado ao tratamento controle sem inoculação.

VIANA, (2012) em trabalho de isolamento e inoculação de bactéria diazotróficas em arroz cultivado na Bahia, recuperou diazotrofos pela técnica de NMP na parte aérea e nas raízes da cultivar BRS TROPICAL, com valores bastante similares aos reportados nesse trabalho. O autor verificou maiores valores na raiz variando de 10^6 a 10^7 células por grama de massa fresca e menores valores na parte aérea variando de 10^3 a 10^5 células por grama de massa fresca utilizando os meios NFb e JNFb como referência.

Tabela 4. Número mais provável de bactérias fixadoras de nitrogênio por grama massa fresca (Log_{10}) presente em diferentes partes das plantas e solo rizosférico de arroz da cultivar BRS TROPICAL, cultivada em casa de vegetação.

Tratamento	Parte Aérea		Raiz		Solo Rizosférico	
	NFB	JNFB	NFB	JNFB	NFB	JNFB
Inoculado	5,65	5,04	6,04	6,04	5,15	5,15
Não inoculado	3,40	4,14	6,15	6,15	4,65	4,04

Resultado de NMP como os deste trabalho tem sido reportado por vários autores, onde números mais elevados de BD provenientes da rizosfera da planta são maiores quando comparado os números de NMP provenientes da parte aérea da planta de arroz (BARRAQUIO et al., 1997; BACA et al., 2000; RODRIGUES et al., 2006; VIDEIRA, 2008).

KNIEF et al. (2011) analisando a microbiota da filosfera e rizosfera de planta de arroz por técnicas moleculares. Encontraram grande diversidade de genes da nitrogenase em ambos os habitats. Porém a expressão do gene foi encontrado exclusivamente na rizosfera da planta.

Recuperou-se bactérias diazotróficas em todos os meios utilizados nos isolamentos, JNFB, semi-seletivo para o gênero *Herbaspirillum*, meio semi-sólido NFB, semi-seletivo para o gênero *Azospirillum* e LGI, semi-seletivo para *Azospirillum amazonense* (usado somente no isolamento da cultivar EPAGRI-109).

4.1.2. Isolamento de bactérias diazotróficas a campo e casa de vegetação

Foi possível obter isolados de bactérias diazotróficas em diferentes partes das plantas e solo rizosférico das cultivares EPAGRI-109 e BRS-TROPICAL (Tabela 5). Na cultivar EPAGRI-109 foram obtidos 27 isolados destes, 17 isolados foram obtidos no talhão 103 e 10 isolados obtidos no talhão 104. Foram obtidos isolados na parte aérea, raiz e associado ao solo rizosférico dessa cultivar, nos dois locais de isolamento. Dos 27 isolados obtidos das plantas de arroz, 10 foram obtidos da parte aérea, 8 de raízes e 9 de solo rizosférico.

Na cultivar BRS TROPICAL foram obtidos 12 isolados com características de bactérias diazotróficas. Dos isolados obtidos somente o isolado TR-II foi obtido de planta inoculada com a estirpe Sp 245 de *A. brasilense*., os onze isolados restantes foram obtidos da cultivar BRS TROPICAL não inoculada. A maioria dos isolados obtidos nesse isolamento foi proveniente da parte aérea de arroz, sendo somente três isolados, originário das raízes das plantas. Nenhum isolado foi obtido do solo rizosférico dessa cultivar nas condições experimentais utilizadas.

HARDOIM et al. (2011) observaram que algumas cultivares de arroz possuem forte influência sobre a composição populacional de comunidades bacterianas em sua rizosfera, tendendo a selecionar comunidades bacterianas similares enquanto outros genótipos selecionam comunidades bacterianas divergentes. Tanto a adaptação bacteriana como o genótipo da planta contribui para a formação das comunidades bacterianas associados a raízes de arroz.

Tabela 5. Identificação dos isolados de bactérias diazotróficas obtidas em diferentes partes das plantas e solo rizosférico das cultivares de arroz EPAGRI-109 e BRS TROPICAL.

Isolados	Cultivar	Local de Isolamento	Meio utilizado
EP3-1L	EPAGRI-109	P.A	LGI
EP3-2L	EPAGRI-109	P.A	LGI
EP3-3L	EPAGRI-109	P.A	LGI
EP3-4L	EPAGRI-109	P.A	LGI
EP3-5L	EPAGRI-109	S.R	LGI
EP3-6L	EPAGRI-109	S.R	LGI
EP3-7L	EPAGRI-109	P.A	LGI
EP3-8J	EPAGRI-109	P.A	JNFb
EP3-9J	EPAGRI-109	P.A	JNFb
EP3-10J	EPAGRI-109	P.A	JNFb
EP3-11J	EPAGRI-109	RAIZ	JNFb
EP3-12J	EPAGRI-109	RAIZ	JNFb
EP3-13J	EPAGRI-109	RAIZ	JNFb
EP3-14J	EPAGRI-109	S.R	JNFb
EP3-15N	EPAGRI-109	S.R	NFb
EP3-16N	EPAGRI-109	S.R	NFb
EP3-17N	EPAGRI-109	S.R	NFb
EP4-1L	EPAGRI-109	RAIZ	LGI
EP4-2J	EPAGRI-109	RAIZ	JNFb
EP4-3J	EPAGRI-109	RAIZ	JNFb
EP4-4J	EPAGRI-109	S.R	JNFb
EP4-5J	EPAGRI-109	S.R	JNFb
EP4-6J	EPAGRI-109	S.R	JNFb
EP4-7J	EPAGRI-109	P.A	JNFb
EP4-8N	EPAGRI-109	P.A	NFb
EP4-9N	EPAGRI-109	RAIZ	NFb
EP4-10N	EPAGRI-109	RAIZ	NFb
TR-I1	BRS TROPICAL	RAIZ	NFb
TR-N1	BRS TROPICAL	RAIZ	JNFb
TR-N2	BRS TROPICAL	RAIZ	JNFb
TR-N3	BRS TROPICAL	P.A	JNFb
TR-N4	BRS TROPICAL	P.A	JNFb
TR-N5	BRS TROPICAL	P.A	JNFb
TR-N6	BRS TROPICAL	P.A	JNFb
TR-N7	BRS TROPICAL	P.A	JNFb
TR-N8	BRS TROPICAL	P.A	JNFb
TR-N9	BRS TROPICAL	P.A	JNFb
TR-N10	BRS TROPICAL	P.A	JNFb
TR-N11	BRS TROPICAL	P.A	JNFb

P.A= Parte Aérea e S.R= Solo Rizosférico.

Ao todo foram obtidos 39 isolados, sendo que destes 49% foram obtidos da parte aérea de arroz e 28% associado às raízes e 23% provenientes do solo rizosférico. Contrariando os dados observados na contagem, onde foram obtidos maiores valores de NMP em raízes e solo rizosférico das cultivares utilizadas.

Porém os resultados de isolamento aqui reportados se devem à maior fase de purificações utilizadas, o que levou os microorganismos presente na parte aérea maior vantagem pela baixa competição com outros microorganismos que poderiam estar presente nesta fase, facilitando seu isolamento. Já que nos isolados provenientes da parte aérea foram feita poucas repicagens, na fase de purificação.

Obteve-se isolados bacterianos em todos os meios usados no isolamento, na fase de purificação. Houve bastante similaridade fenotípica dos isolados recuperados com as estirpes dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*.

4.2. Resultados da Caracterização Fisiológica

4.2.1. Atividade de redução de acetileno (ARA) dos isolados obtidos nas cultivares de arroz testadas

A análise de ARA foi feita nos isolados obtidos das cultivares EPAGRI -109 e BRS TROPICAL que formaram película superficial nos meios semi-sólidos de isolamento (NFb, JNFb e LGI). As análises foram feitas a cada 24 horas durante quatro dias, para conhecer o comportamento de cada isolado quanto a capacidade de redução de acetileno. Para apresentar os resultados foram usados os dados onde os isolados apresentaram a maior atividade de redução de acetileno normalizado com a proteína total do momento da determinação.

Todos os isolados testados foram capazes de reduzir acetileno, demonstrando capacidade de fixação de nitrogênio *in vitro* (Anexo C). Nos isolados obtidos da cultivar EPAGRI-109, foi possível obter isolados com atividade de ARA que variavam de 0,36 á 1462 nmol de C₂H₄ por mg de proteína por hora de incubação (Figura 2).

As estirpes usadas como padrão das análises foram: Sp245 de *A. brasilense* (702 nmol de C₂H₄ h⁻¹ por mg de proteína), Z94 de *H. seropedicae* (305 nmol de C₂H₄ h⁻¹ por mg de proteína); CBAmC de *A. amazonense* (53 nmol de C₂H₄ h⁻¹ por mg de proteína).

Os isolados EP4- 2J e EP4-3J apresentaram resultados superiores a todos os padrões utilizados, 1021 e 1462 nmol de C₂H₄ h⁻¹ por mg de proteína, respectivamente. Os isolados EP3-8J, EP4-4J, EP4-6J, EP4-7J, EP4-9N e EP4-10N, não foram testados pela falta de crescimento quando retirados do estoque, posteriormente estes isolados foram descartados.

Para os isolados obtidos na cultivar BRS TROPICAL, a atividade da redução de acetileno dos isolados variou de 3,16 á 416 nmol de C₂H₄ h⁻¹ por mg de proteína (Figura 3). E nessa análise foram utilizados como padrões as bactérias Sp245 de *A. brasilense* e Z94 de *H. seropedicae* que apresentaram valores de 601 nmol de C₂H₄ h⁻¹ por mg de proteína e 198 nmol de C₂H₄ h⁻¹ por mg de proteína, respectivamente.

O isolado TR-II apresentou atividade de 416 nmol de C₂H₄ h⁻¹ por mg de proteína h⁻¹, com o valor mais alto nessa análise, valor próximo ao apresentado pelo padrão de *Azospirillum* (Sp 245). Os demais isolados apresentaram ARA que variaram de 3,16 a 10,81 nmol de C₂H₄ h⁻¹ por mg de proteína, muito inferior as bactérias usadas como padrões.

Houve grande variabilidade na quantidade de etileno produzido pelos diferentes isolados das cultivares de arroz EPAGRI-109 e BRS TROPICAL tendo valores que variaram de 0,36 á 1462 nmol de C₂H₄ por mg de proteína por hora de incubação em atmosfera de acetileno. Vários autores têm encontrado valores variáveis dentro de isolados diazotróficos, inclusive valores diferentes dentre isolados do mesmo gênero bacterianos. (VIDEIRA et al, 2012; ESTRADA et al, 2013).

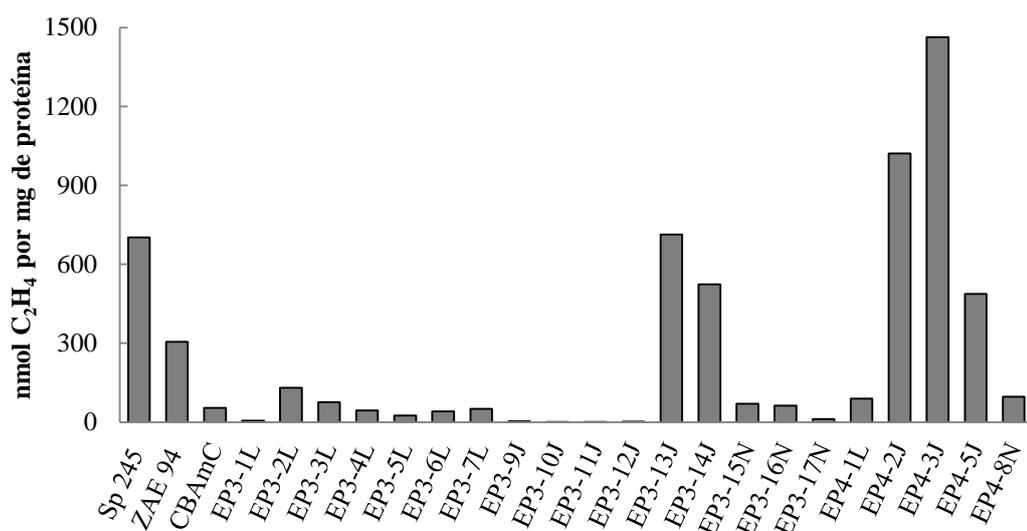


Figura 2. Atividade de redução de acetileno (ARA) dos isolados bacterianos obtidos na cultivar EPAGRI -109 e estirpes padrões utilizadas: *Azospirillum brasilense* (Sp254), *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94) e *A. amazonense* (CBAmC). Média de três repetições.

A avaliação da redução de acetileno como ferramenta para seleção de microrganismos com potencialidades para a promoção de crescimento vegetal tem sido bastante relatada, em trabalhos de seleção de bactérias diazotróficas. (VIDEIRA et al, 2012; ARAUJO et al, 2013).

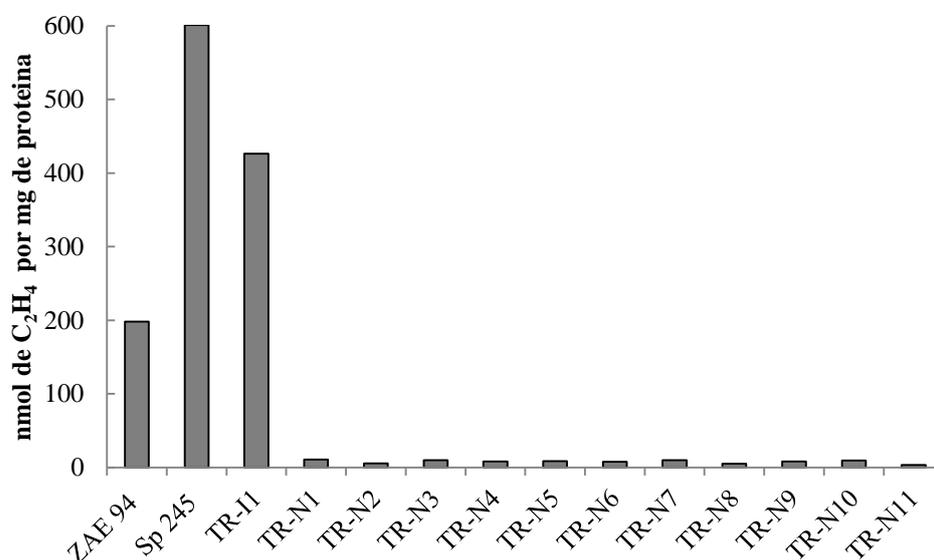


Figura 3. Atividade de redução de acetileno (ARA) dos isolados bacterianos obtidos na cultivar BRS TROPICAL e estirpes padrões utilizados: *Azospirillum brasilense* (Sp245), *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94). Média de três repetições.

O método de redução de acetileno tem sido usado, pois é uma técnica rápida e de baixo custo, que avalia indiretamente a atividade da nitrogenase. Porém muitos fatores interferem nos resultados, sendo pouco precisa, dando um aspecto mais qualitativo do que quantitativo aos resultados das análises (STAAL et al, 2001; VIDEIRA et al, 2012).

Com os dados da redução de acetileno dos isolados obtidos nas cultivares EPAGRI-109 e BRS TROPICAL foi possível selecionar, entre os isolados que apresentaram melhores resultados de ARA e também melhores características de crescimento que foram denominados de “isolados de trabalho” (Tabela 6).

Os isolados foram pré- selecionados e nomeados como ‘isolados de trabalho’, os quais foram usados para análises de outras características promotoras de crescimento vegetal, para selecionar entre os mesmos os melhores como PCV com base na produção de compostos indólicos, solubilização de fosfato e produção de sideróforos. Foram selecionados 3 isolados da cultivar BRS TROPICAL e 15 isolados obtidos na cultivar EPAGRI-109.

Tabela 6. Isolados de bactérias diazotróficas provenientes das duas cultivares de arroz utilizadas, e selecionados com base na capacidade de reduzir acetileno.

Isolados de trabalho	Cultivar	ARA (nmol de C ₂ H ₄ h ⁻¹ por mg de ptn)
TR-I1	BRS TROPICAL	426,30
TR-N1	BRS TROPICAL	10,81
TR-N7	BRS TROPICAL	9,72
EP3-1L	EPAGRI-109	5,62
EP3-2L	EPAGRI-109	130,42
EP3-3L	EPAGRI-109	76,47
EP3-4L	EPAGRI-109	44,78
EP3-6L	EPAGRI-109	40,31
EP3-7L	EPAGRI-109	49,82
EP3-13J	EPAGRI-109	712,94
EP3-14J	EPAGRI-109	523,97
EP3-15N	EPAGRI-109	69,87
EP3-16N	EPAGRI-109	61,97
EP4-1L	EPAGRI-109	89,85
EP4-2J	EPAGRI-109	1021,21
EP4-3J	EPAGRI-109	1462,90
EP4-5J	EPAGRI-109	487,37
EP4-8N	EPAGRI-109	96,95

4.2.2. Avaliação das estirpes selecionadas quanto à produção de auxinas

O ácido indol-3-acético (AIA) é reconhecido como a auxina mais importante nas plantas. É sintetizado a partir de triptofano que é considerado o principal precursor da biosíntese desse fitohormônio (WOODWARD & BARTEL, 2005). Por isso foi utilizado nesse experimento. Os resultados mostraram que a maioria dos isolados testados apresenta a capacidade de produzir compostos indólicos (AIA) na presença de L-triptofano 200 µg ml⁻¹.

No entanto, os isolados apresentaram comportamento distinto quanto à produção de compostos indólicos, observou-se que nenhum isolado teve maior produção de composto índol com menos de 24 horas de crescimento (Figura 4). Os isolados EP3-13J, EP3-14J, EP3-16N e EP4-8N apresentaram produção máxima de compostos indólicos após 48h de cultivo, variando de 3,30 á 24,94 µg de AIA por mg de proteína. Já os isolados TR-I1, TR-N, TR-N7, EP3-1L, EP3-2L, EP3-6L, EP3-7L, EP3-15N, EP4-1L, EP4-2J, EP4-3J e EP4-5J

apresentaram produção máxima de compostos indólicos após 72 h de cultivo, variando de 0,32 á 22,68 µg de AIA por mg de proteína.

As bactérias usadas como padrões nos testes, ZAE94 e PAL-5 apresentaram produção máxima de compostos indólicos após 48h de cultivo, respectivamente 21,09 e 46,39 µg de AIA por mg de proteína. A estirpe Sp245 apresentou produção máxima de 4,19 µg de AIA por mg de proteína após 72 h de cultivo. A estirpe CBAmC de *A. amazonense* não apresentou produção de compostos indólicos nesse experimento, quando suplementado com 200 µg /ml de triptofano. Os isolados EP3-3L e EP3-4L de *A. amazonense* tiveram o mesmo comportamento dessa estirpe e também não apresentaram produção de auxina.

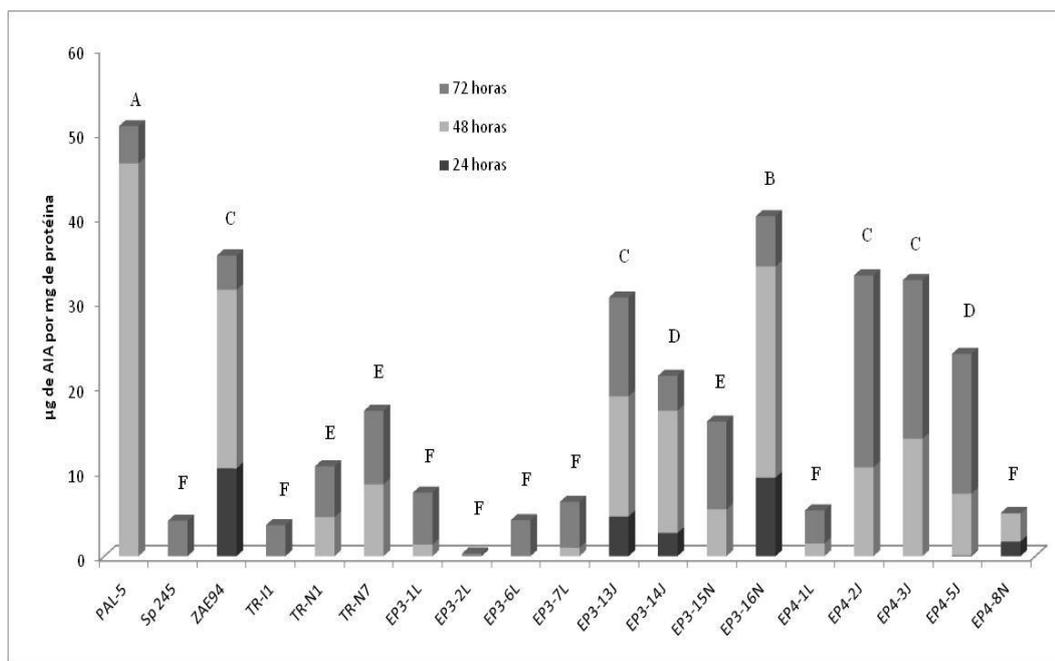


Figura 4. Produção de compostos indólicos dos isolados bacterianos das cultivares EPAGRI-109 E BRS TROPICAL em diferentes estágios de cultivos (24, 48 e 72 horas) em meio Dyg's suplementado com 200 ug/ml de L-Triptofano, Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott knott a 5% de probabilidade. Media de três repetições.

Muitos trabalhos apresentam uma grande variabilidade de resultados na produção de compostos indólicos por bactérias isoladas de plantas de arroz, apresentando uma média de produção de 1,8 a 53 µg de AIA ml⁻¹ (KUSS et al., 2007; ARAÚJO et al., 2013; BAL et AL, 2013; LAVAKUSH et al., 2014).

Neste trabalho pode-se verificar que os isolados originários da parte aérea de arroz (EP3-1L; EP3-2L; EP3-3L; EP3-4L; EP3-7L e EP4-8N) produziram as menores taxas de compostos indolicos variando de 0 á 6,13 µg de AIA por mg de proteína, quando comparamos com as taxas produzidas pelos isolados associados as raízes (TR-I1; TR-N1; TR-N7; EP3-13J; EP4-2J e EP4-3J), que variaram de 3,68 a 22, 68 µg de AIA por mg de proteína e provenientes do solo rizosférico (EP3-6L; EP3-14J; EP3-15N; EP3-16N; e EP4-1L e EP4-5J) que variaram de 3,90 a 24,94 µg de AIA por mg de proteína.

Os resultados obtidos indicaram que as bactérias apresentavam taxas diferenciadas de produção de compostos indólicos de acordo com o crescimento microbiano. Os maiores valores encontrados na produção de AIA ocorreram nos estágios mais tardios de cultivo entre 48 e 72 horas de cultivos. Também foi possível observar em alguns isolados que apresentam a maior taxa de produção de compostos indólicos ás 48 horas, a degradação dos mesmos na

análise posterior. Efeitos como, este da capacidade do microorganismo degradar a própria produção de compostos indólicos, foi reportada por Leveau & Gerards (2008).

4.2.3. Avaliação da solubilização de fosfato

A maioria dos isolados apresentou capacidade de solubilização de fosfato inorgânico em meio NBRIP, com valores variando de 0,33 a 2,45 mm durante as quatro avaliações (Tabela 7). Os resultados das análises mostraram que os isolados tiveram índices de solubilização muito próximos das estirpes Sp245 de *A. brasilense*, e CBAmC de *A. amazonsense* que apresentaram valores entre 0,84 e 1,87mm entre as avaliações. E inferiores as estirpes PAL-5 de *G. diazotrophicus*, Ppe-8 de *Burkholderia tropica* e ZAE94 de *H. seropedicae* que apresentaram valores entre 2,34 a 11,40 mm entre as avaliações (Figura 5).

Nas avaliações feitas ao longo do tempo, até aos 16 dias não foi possível estabelecer uma tendência universal no padrão de solubilização dos isolados alguns produziram maior halo de solubilização nos primeiros dias e outros produziram os maiores halos de solubilização nos últimos dias de análise.

Tabela 7. Determinação da capacidade de solubilização de fosfato inorgânico (Pi) pelas estirpes padrões e isolados de plantas de arroz em meio sólido NBRIP.

Bactérias	4º dia	8º dia	12º dia	16º dia
	Halo (mm)	Halo (mm)	Halo (mm)	Halo (mm)
Ppe-8	4,68	6,73	7,8	9,46
PAL-5	9,65	11,4	11	10,96
Sp 245	1,76	1,41	1,11	0,84
ZAE94	2,34	7,19	9,73	11,32
CBAmC	1,97	1,15	1,02	0,84
TR-I1	1,45	1,08	1,15	0,85
TR-N1	1,8	0,96	0,96	1,01
TR-N7	1,67	1,11	1,05	0,98
EP3-1L	1,99	1,2	0,94	0,94
EP3-2L	-	-	-	-
EP3-3L	0,7	0,72	0,44	0,33
EP3-4L	0,88	0,54	0,73	0,46
EP3-6L	0,57	0,46	0,59	0,94
EP3-7L	1,42	1,22	1,17	0,87
EP3-13J	1,81	1,77	1,86	2,07
EP3-14J	1,92	2,2	1,95	1,49
EP3-15N	1,74	2,07	1,61	1,55
EP3-16N	1,77	1,12	1,09	1,05
EP4-1L	1,52	1,3	1,04	1,04
EP4-2J	1,25	2,18	2,44	2,4
EP4-3J	1,17	1,55	1,67	1,61
EP4-5J	0,98	1,4	1,64	2,45
EP4-8N	-	-	-	-

Legenda: * Medias de 4 repetições, -Ausência de halo.

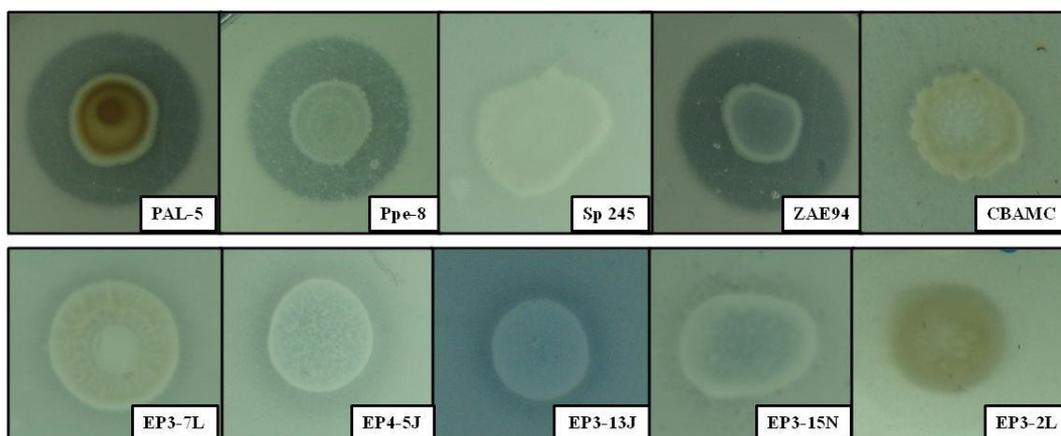


Figura 5. Formação do halo de solubilização de Pi pelas estirpes padrões e alguns isolados de plantas de arroz aos 16 dias de cultivo.

4.2.4. Avaliação da produção de sideróforos

Somente alguns isolados dos “isolados de trabalho” apresentaram ao redor da colônia um halo de coloração amarelo-alaranjado, característico da produção de sideróforos (Figura 6). Todos os isolados positivos para o teste de sideróforos, foram provenientes do meio de cultivo cuja fonte de carbono ácido málico (NFb e JNFb). Os isolados provenientes de LGI não apresentaram crescimento no meio e, portanto nenhuma atividade (Tabela 8). Nesse experimento não foi possível fazer a avaliação do halo de solubilização como reportado em Tortora et al. (2011) então a avaliação se deu, por comparação com a estirpe Sp245 de *A. brasilense*, nas comparações feitas o isolado EP4-8N mostrou-se superior e formou a maior zona de produção de sideróforos de todos os isolados testados.

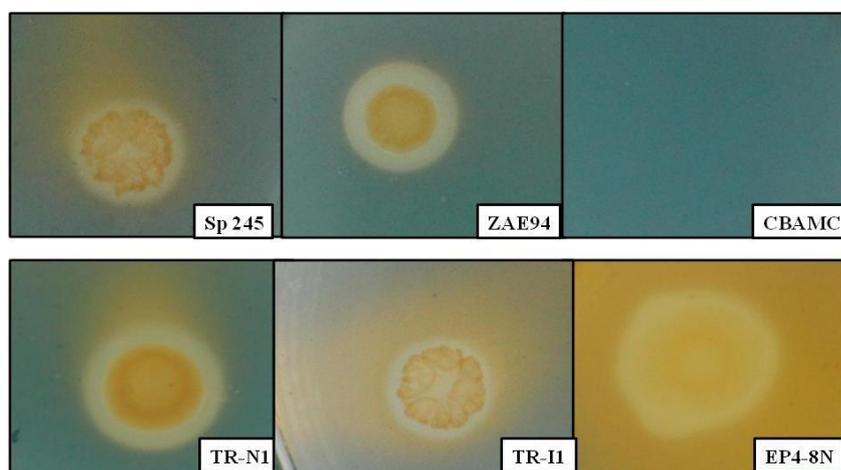


Figura 6. Formação de halo amarelo-alaranjado em meio NFb sólido, sem azul de bromotimol e com NH_4Cl a 0,1% e CAS, de estirpes padrões e alguns “isolados de trabalho” de plantas de arroz aos 12 dias de crescimento.

Tabela 8. Indicação de produção de sideróforos de diferentes isolados de arroz, usando meio NFB sólido, sem azul de bromotimol e com NH₄Cl a 0,1% e CAS. Utilizando a estirpe Sp245 de *A. brasilense* como controle aos 7 e 12 dias após incubação.

Bactérias	7º dia	12º dia
Sp 245	+	++
ZAE94	+	+
CBAMC	N.d	N.d
TR-I1	+	+++
TR-N1	+	++
TR-N7	+	++
EP3-1L	N.d	N.d
EP3-2L	N.d	N.d
EP3-3L	N.d	N.d
EP3-4L	N.d	N.d
EP3-6L	N.d	N.d
EP3-7L	N.d	N.d
EP3-13J	-	+
EP3-14J	-	+
EP3-15N	-	+
EP3-16N	-	+
EP4-1L	N.d	N.d
EP4-2J	-	+
EP4-3J	-	+
EP4-5J	-	++
EP4-8N	+++	+++

Legenda: + (Produz), ++ (boa produtora), +++ (ótima produtora), - (não produz) e N.d (Não houve crescimento).

Chaiharn et al. (2009) buscando bactérias produtoras de sideróforos com potencial para o biocontrole de doenças fúngicas em arroz na Tailândia, testou 134 isolados, destes apenas 23,1% produziram sideróforos, e encontrou dentre os mesmos, bactérias com atividade antagônica significativa a patógenos fúngicos. Posteriormente esses isolados foram classificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*.

Os testes fisiológicos mostraram que a maioria dos isolados produziram *in vitro* compostos capazes de contribuir para o desenvolvimento das plantas de arroz (Tabela 9).

Tabela 9. Propriedades benéficas dos isolados obtidos das cultivares de arroz EPAGRI-109 e BRS TROPICAL.

Isolados	Propriedades de PCV dos isolados testados <i>in vitro</i>			
	Atividade da nitrogenase	Prod. de compostos indolicos	Solubilização de fosfatos	Produção de Sideroforos
TR-I1	++	+	+	+++
TR-N1	+	+	+	++
TR-N7	+	+	+	++
EP3-1L	+	+	+	-
EP3-2L	++	+	N.d	-
EP3-3L	+	N.d	+	-
EP3-4L	+	N.d	+	-
EP3-6L	+	+	+	-
EP3-7L	+	+	+	-
EP3-13J	+++	++	++	+
EP3-14J	+++	++	+	+
EP3-15N	+	++	+	+
EP3-16N	+	+++	+	+
EP4-1L	+	+	+	-
EP4-2J	+++	+++	++	+
EP4-3J	+++	++	+	+
EP4-5J	++	++	++	++
EP4-8N	+	+	N.d	+++

1) Atividade da nitrogenase, + < 100; ++ ≥100; +++ ≥500 nmol C₂H₄ h⁻¹ mg proteína⁻¹ 2) Produção de compostos indólicos, + entre 0,3 – 10; ++ entre 10 e 20; > 20 ug de compostos indolicos por mg proteína. 3) Solubilização de fosfatos, + < 2,0; ++ entre 2,0 e 5,0; +++ >5,0 halo de solubilização(mm). 4) Indicação de produção de Sideroforos, + regular; ++ boa e +++ muito boa. (N.d) não detectado e (-) não houve crescimento para a avaliação

4.3. Resultados da Caracterização Fenotípica dos Isolados

4.3.1. Morfologia das colônias

As colônias apresentaram coloração variada de acordo com o meio de cultivo utilizado. Nesta fase se observou que todos os isolados apresentaram colônias individuais nos meios utilizados, porém com características de colônias diferentes entre os diferentes meios empregados NFb (3x) e LGI (Figura 7). Em meio Batata houve maior produção de goma quando comparado com outros meios de cultivos, isso devido a maior disponibilidade de nutrientes nesse meio que ofereceu um rápido crescimento das colônias. De forma geral houve similaridade de morfologia com as bactérias utilizadas como padrões no experimento.

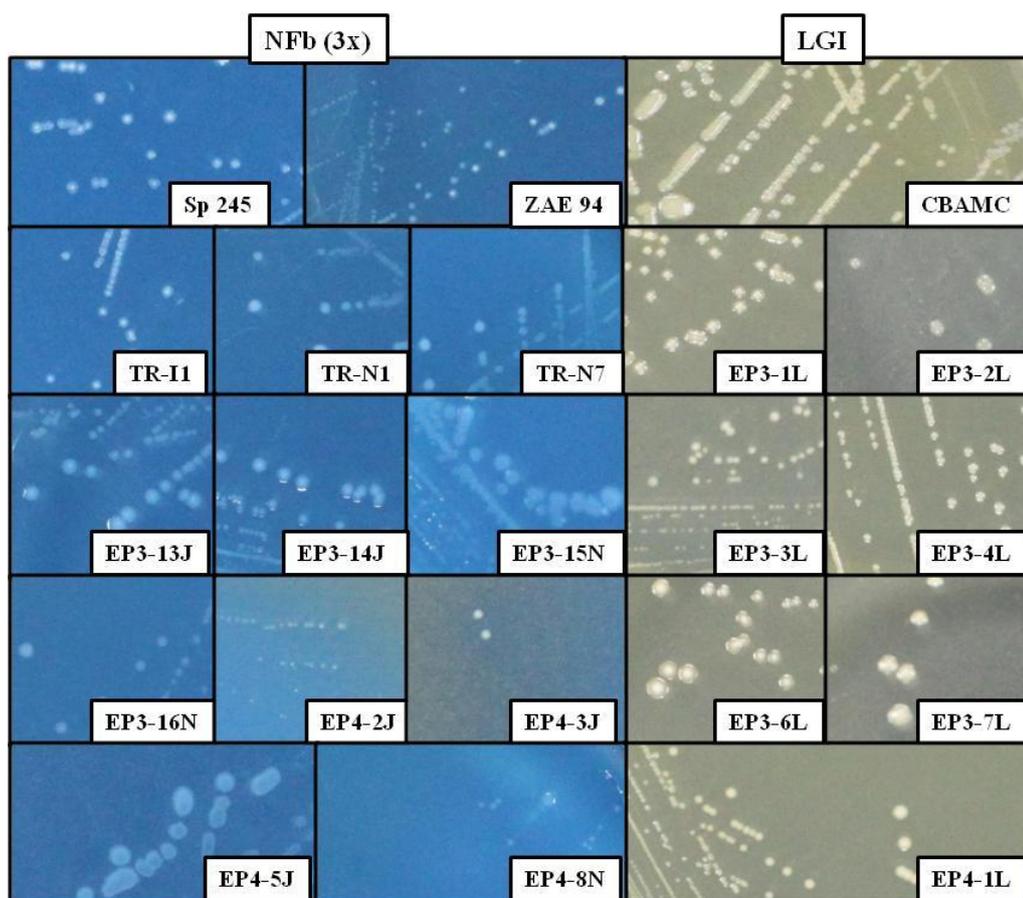


Figura 7. Morfologia das colônias dos isolados obtidos nas cultivares de arroz EPAGRI-109 e BRS TROPICAL. Observação realizada no quinto dia de crescimento em meio NFb (3x) e LGI.

4.3.2. Reação de Gran

Na reação de Gram realizada foi possível verificar que todos os isolados obtidos foram classificados como Gram negativos, apresentaram células individualizadas em forma de bastonetes semelhantes aos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*. (Figura 8).

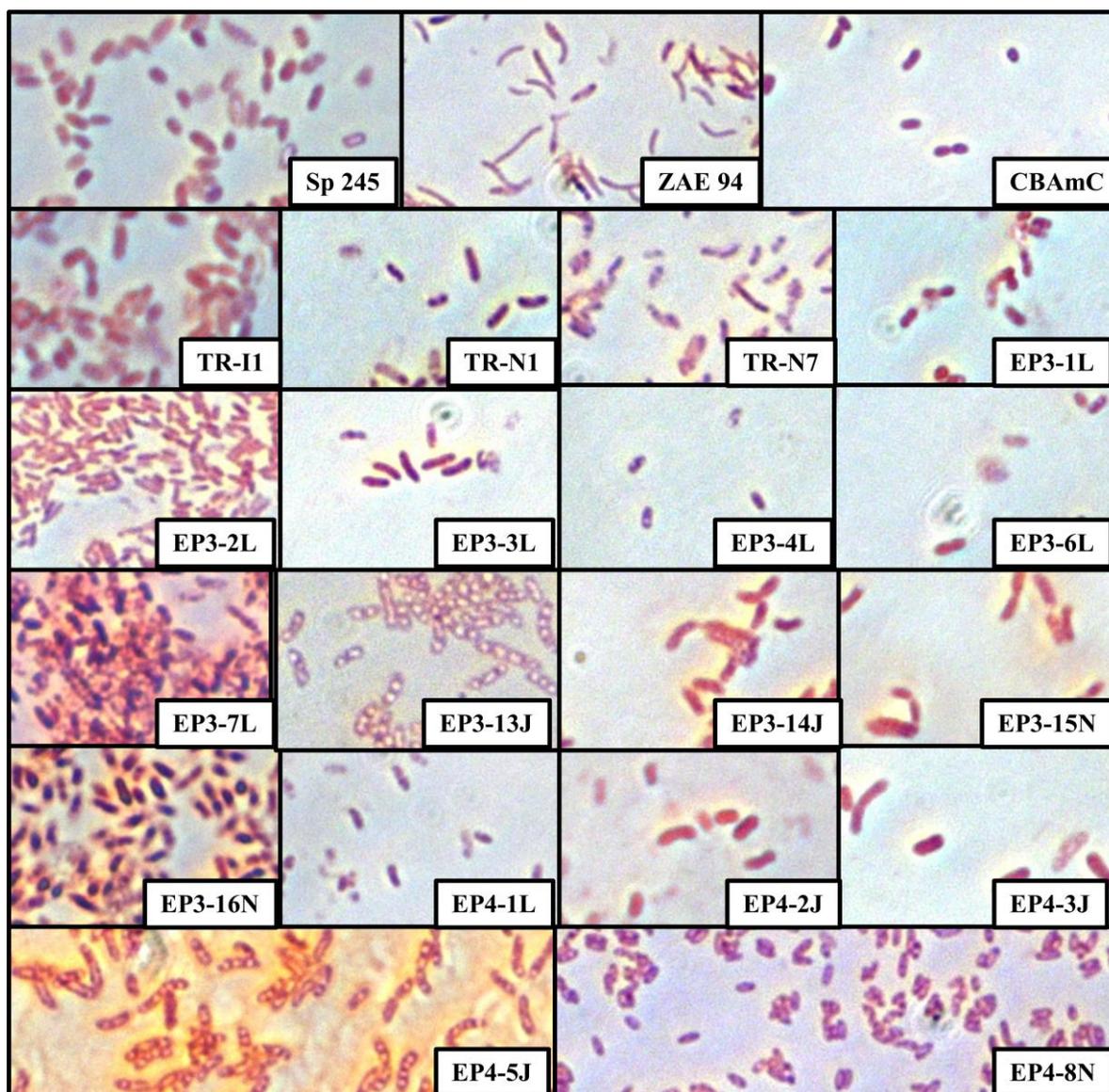


Figura 8. Morfologia celular dos isolados bacterianos, Gran colorido, obtidos em cultivares de arroz irrigado (BRS TROPICAL e EPAGRI-109), observadas em microscópio ótico (aumento de100X).

4.4. Resultados da Caracterização Molecular

4.4.1. Qualidade do DNA genômico

O método utilizado possibilitou a obtenção de DNA de boa qualidade para as análises moleculares, sem a necessidade de etapas de purificações posteriores.

4.4.2. Análise do gene 16S DNAr

A amplificação por PCR do gene 16S DNAr utilizando os iniciadores AMP F e AMP R, nos 27 isolados obtidos da cultivar EPAGRI-109 (Figura 9) e os 12 isolados obtidos na cultivar BRS TROPICAL (Figura 10) permitiu amplificar um fragmento único de aproximadamente 1500 pb, que corresponde ao tamanho esperado para o gene 16S DNAr .

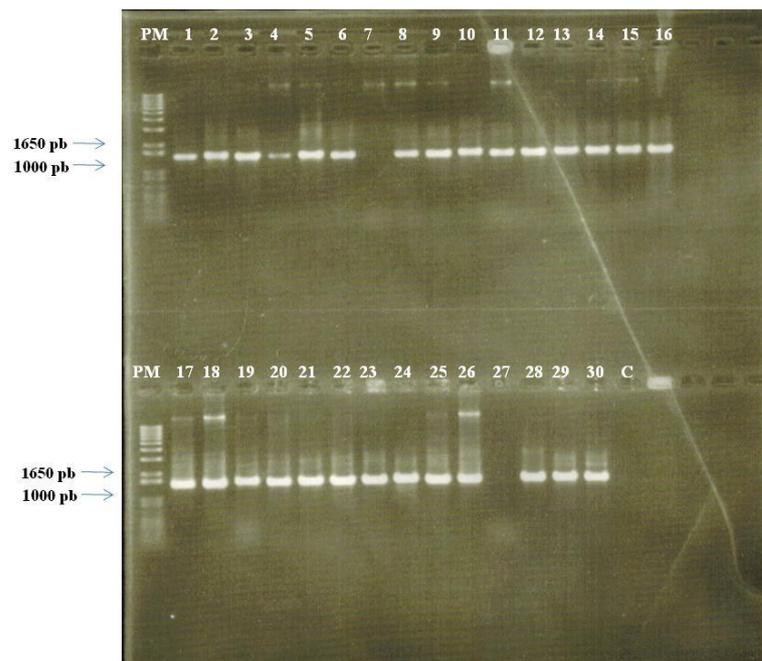


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose (1%) do produto da amplificação do gene 16S rDNA dos isolados obtidos na cultivar EPAGRI-109. PM (1kb Plus DNA Ladder), 1 (Sp 245) *Azospirillum brasilense*, 2 (ZAE 94 *Herbaspirillum seropedicae*), 3 (CBAmC, *Azospirillum. amazonense*), 4 (EP3-1L), 5 (EP3-2L), 6(EP3-3L), 7 (EP3-4L)* ,8 (EP3-5L), 9 (EP3-6L), 10 (EP3-7L), 11 (EP3-8J), 12 (EP3-9J),13(EP3-10J), 14(EP3-11J), 15(EP3-12J), 16 (EP3-13J),17(EP3-14J), 18 (EP3-15N),19(EP3-16N), 20 (EP3-17N), 21 (EP4-1L), 22 (EP4-2J), 23 (EP4-3J), 24 (EP4-4JL), 25 (EP4-5J), 26 (EP4-6J), 27 (EP4-7N)*, 28 (EP4-8N), 29 (EP4-9N), 30 (EP4-10N) e C (Controle Negativo). *Os isolados EP3-4L e EP4-7N não apresentaram amplificação do gene16S DNAr.

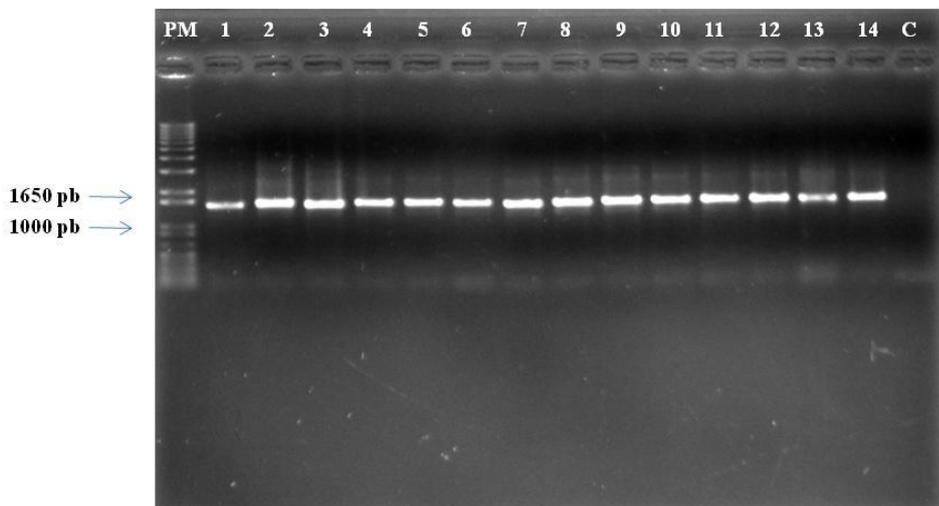


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose (1%) do produto da amplificação do gene 16S DNAr dos isolados obtidos na cultivar BRS TROPICAL. PM (1kb Plus DNA Ladder), 1 (Sp 245) *Azospirillum brasilense*, 2 (ZAE 94 *Herbaspirillum seropedicae*), 3 (TR-I1), 4 (TR-N1), 5 (TR-N2), 6 (TR-N3), 7 (TR-N4), 8 (TR-N5), 9 (TR-N6), 10 (TR-N7), 11 (TR-N8), 12 (TR-N9), 13 (TR-N10), 14 (TR-N11) e C (Controle Negativo).

4.4.3. Sequenciamento

Todos os “isolados de trabalho” (Tabela 6) foram enviados para o sequenciamento, porém só obtivemos sequências de 13 dos 18 isolados. Não foi possível determinar as sequências dos isolados EP3-1L, EP3-6L, EP3-7L, EP4-3J e EP4-5J.

As sequências obtidas a partir do produto de PCR foram submetidas às análises comparativas no banco de dados do NCBI, usando a ferramenta BLAST, para que pudessem ser identificadas e classificadas (Tabela 10). As estirpes apresentaram índice de similaridade, variando entre 92 a 99%, com sequências depositadas no banco de dados, o tamanho de pares de bases das sequências variaram de 1208 a 1479 pb.

Os isolados TR-N1 e TR-N7 apresentaram elevado grau de similaridade com sequências do gene 16S DNAr de *Herbaspirillum seropedicae*, já os isolados EP3-4L e EP4-1L apresentaram alta similaridade com *Azospirillum amazonense*, em quanto que os isolados EP3-3L; EP3-13J; EP3-14J; EP3-15N e EP4-2J com o gênero *Azospirillum sp.*, o isolado TR-II apresentou similaridade com *Azospirillum brasilense*. Os isolados EP3-2L, EP3-16N e EP4-8N apresentaram similaridade com os seguintes gêneros respectivamente: *Ideonella sp.*, *Paenibacillus pasadenensis* e *Pseudomonas fluorescens*.

Considerando os resultados apresentados e pela comparação entre as sequências dos isolados e as sequências depositadas no banco de dados GenBank, foi detectada maior homologia entre os isolados com gêneros de bactérias já descritas como fixadoras de nitrogênio (BALDANI & BALDANI, 2005).

Tabela 10. Similaridade entre as sequências do gene que codifica o 16S RNAr das bactérias isoladas com as sequências depositadas no banco de dados (GenBank).

Isolados	Número de acesso	Descrição	E-value	Max. Identidade
TR-II	HE577329,1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0,0	95%
TR-N1	NR029329,1	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	0,0	99%
TR-N7	NR029329,1	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	0,0	99%
EP3-2L	AB049107,1	<i>Ideonella sp.</i>	0,0	99%
EP3-3L	DQ387440,1	<i>Azospirillum sp.</i>	0,0	99%
EP3-4L	AY741146,1	<i>Azospirillum amazonense</i>	0,0	97%
EP3-13J	AY118222,1	<i>Azospirillum sp.</i>	0,0	92%
EP3-14J	AY118222,1	<i>Azospirillum sp.</i>	0,0	94%
EP3-15N	AY118222,1	<i>Azospirillum sp.</i>	0,0	96%
EP3-16N	AB681404,1	<i>Paenibacillus pasadenensis</i>	0,0	99%
EP4-1L	AY741146,1	<i>Azospirillum amazonense</i>	0,0	99%
EP4-2J	AB049110,1	<i>Azospirillum sp.</i>	0,0	98%
EP4-8N	JN679857,1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,0	99%

4.5. Efeito da Inoculação de Bactérias Diazotróficas no Desenvolvimento Inicial de Plantas de Arroz em Tubos de Ensaio

Para testar a capacidade dos isolados selecionados como potenciais PCV em plantas de arroz. Foram escolhidos os isolados TR-II e TR-N1 isolados da cultivar BRS TROPICAL e identificados como *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* respectivamente.

Os isolados obtidos na cultivar EPAGRI-109 selecionados para o teste de interação com a planta foram os isolados: EP3-13J, EP4-2J identificados como pertencentes ao gênero *Azospirillum sp.*; o isolado EP4-1L identificado como *Azospirillum amazonense*; os isolados EP3-2L, EP3-16N e EP4-8N identificados como *Ideonella sp.*, *Paenibacillus pasadenensis* e *Pseudomonas fluorescens* respectivamente. Os isolados EP3-1L; EP3-7L e EP4-5J que não foram seqüenciados mais foram incluídos no teste de interação com a planta.

A população de bactérias diazotróficas, utilizadas como inoculante, variou de 10^7 a 10^{10} células por ml de meio de cultura (Tabela 11). O que está de acordo com as normas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Tabela 11. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas na ocasião da inoculação do experimento gnotobiótico.

Bactéria	Meio semi - sólido	Log do numero de células ml ⁻¹
Sp 245	NFb	10,14
ZAE 94	JNFb	10,14
CBAmC	LGI	10,14
AZOTOTAL	NFb	7,87
TR-II	NFb	10,04
TR-N1	JNFb	10,14
EP3-1L	LGI	10,14
EP3-2L	LGI	8,39
EP3-7L	LGI	10,14
EP3-13J	JNFb	10,04
EP3-14J	JNFb	9,39
EP3-16N	NFb	10,14
EP4-1L	LGI	10,14
EP4-2J	JNFb	7,39
EP4-5J	JNFb	10,14
EP4-8N	NFb	10,14
MIX 1	JNFb	10,04
MIX 2	LGI	7,39
	NFb	10,14
	JNFb	10,14

Os resultados da inoculação de bactérias diazotróficas em condições gnotobióticas mostraram respostas significativas quanto à inoculação em cultivares de arroz irrigado recomendadas para o plantio no Estado do Rio de Janeiro, quando avaliados as massa fresca e seca de partes aéreas e raízes dessas cultivares (Tabelas 12 e 13).

Na análise da massa fresca da parte aérea, foi possível observar que as cultivares BRS TROPICAL e EPAGRI-109 foram responsivas a inoculação, em comparação a cultivar IR42 que não apresentou respostas significativas a inoculação com nenhum dos tratamentos avaliados (Tabela 12). Os tratamentos com os isolados TR-II, EP3-13J, EP3-14J, EP4-1L, EP4-8N, MIX 2, a estirpe de *A. brasilense* (Sp245) e controle nitrogenado, apresentaram respostas significativas e foram superiores ao controle sem nitrogênio na cultivar BRS TROPICAL, apresentando valores de incremento que variaram de 7% a 38%. Já na cultivar EPAGRI-109, somente os tratamentos EP3-16N e o controle com nitrogênio apresentaram resposta significativas a inoculação, na variável massa fresca da parte aérea com incrementos de 31% e 35%, respectivamente.

Tabela 12. Massa fresca de parte aérea e raiz de plantas de arroz irrigado, cultivadas em condições gnotobióticas e inoculadas com bactérias diazotróficas aos 30 dias após a inoculação (média de quatro repetições).

Tratamentos	Massa fresca da parte aérea. (mg.pl ⁻¹)			Massa fresca da raiz (mg.pl ⁻¹)		
	IR42	BRS TROPICAL	EPAGRI-109	IR42	BRS TROPICAL	EPAGRI-109
S. inoc	75,0 A a	84,0 B a	98,0 B a	47,0 B a	65,0 A a	53,0 A a
Sp 245	77,0 A b	116,0 A a	101,0 B a	48,0 B a	54,0 A a	42,0 B a
ZAE 94	63,0 A a	71,0 B a	88,0 B a	58,0 A b	59,0 A b	79,0 A a
CBA mC	67,0 A a	78,0 B a	83,0 B a	50,0 B a	45,0 B a	36,0 B a
AZO TOTAL	60,0 A a	71,0 B a	79,0 B a	76,0 A a	61,0 A a	61,0 A a
TR-I1	77,0 A a	104,0 A a	88,0 B a	41,0 B a	50,0 B a	31,0 B a
TR-N1	54,0 A b	80,0 B a	97,0 B a	43,0 B a	63,0 A a	50,0 A a
EP3-1L	54,0 A b	86,0 B a	94,0 B a	37,0 B a	41,0 B a	42,0 B a
EP3-2L	71,0 A a	78,0 B a	95,0 B a	40,0 B a	38,0 B a	38,0 B a
EP3-7L	64,0 A b	103,0 A a	90,0 B a	32,0 B a	42,0 B a	29,0 B a
EP3-13J	47,0 A b	90,0 A a	88,0 B a	36,0 B a	44,0 B a	52,0 A a
EP3-14J	66,0 A a	84,0 B a	85,0 B a	46,0 B a	54,0 A a	48,0 A a

Continua...

Continuação da Tabela 12:

EP3-16N	61,0 A b	65,0 B b	129,0 A a	45,0 B a	47,0 B a	54,0 A a
EP4-1L	75,0 A a	91,0 A a	90,0 B a	70,0 A a	58,0 A a	52,0 A a
EP4-2J	70,0 A b	82,0 B b	100,0 B a	54,0 A a	46,0 B a	57,0 A a
EP4-5J	66,0 A b	87,0 B a	106,0 B a	44,0 B a	50,0 B a	55,0 A a
EP4-8N	61,0 A b	105,0 A a	97,0 B a	61,0 A a	53,0 A a	60,0 A a
MIX 1	68,0 A b	68,0 B b	92,0 B a	48,0 B a	59,0 A a	56,0 A a
MIX 2	42,0 A b	90,0 A a	70,0 B a	43,0 B b	71,0 A a	62,0 A a
COM. N	81,0 A b	93,0 A b	133,0 A a	39,0 B a	36,0 B a	32,0 B a
Média	65,0 b	86,0 b	95,0 a	48,0 a	50,0 a	52,0 a
C.V(%)		19,92			27,55	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Na análise da massa fresca da raiz, foi possível observar respostas significativas a inoculação e superiores ao tratamento sem inoculação na cultivar IR42, os isolados EP4-1L, EP4-2J, EP4-8N e os padrões bacterianos ZAE94 e o inoculante comercial AZOTOTAL apresentaram incrementos que variaram de 14% a 61%. Nas cultivares BRS TROPICAL e EPAGRI-109 foi possível observar respostas positivas a inoculação, porém não diferentes estatisticamente do tratamento não inoculado (Tabela 13).

Vários estudos têm mostrado que a inoculação de bactérias em condições gnotobióticas tem sido promissora na seleção de isolados, para serem utilizados em condições de casa de vegetação e futuramente a campo. Essa pré-seleção permite avaliar um grande número de estirpe além de selecionar isolados com potencialidades para a promoção de crescimento vegetal, além de permitir também avaliar o seu comportamento e o comportamento de interação com o vegetal. Nestes testes tanto é possível obter isolados que possam contribuir positivamente com incremento de produção quanto descartar isolados que possam ter valores negativos de interação (BALDANI et al, 2000; GUIMARÃES et al, 2007; ARAUJO et al, 2013).

SABINO et al. (2012) avaliando a influência da inoculação de bactérias diazotróficas no desenvolvimento inicial de plantas de arroz em condições gnotobioticas, encontraram grande variabilidade de resultado da inoculação de bactérias diazotróficas nas cultivares de arroz IR42 e IAC440, com resultados positivos e negativos de estirpes de diazotrofos nesse experimento. Porém, os autores concluíram que a inoculação de estirpes de bactérias diazotróficas com a aplicação de nitrogênio propiciou maiores acúmulos de biomassa fresca nas cultivares de arroz testadas.

Na análise da massa seca da parte aérea foi possível observar que a cultivar EPAGRI-109 foi responsiva a inoculação, em comparação com as cultivares BRS TROPICAL e IR42 que não apresentaram respostas significativas a nenhum dos tratamentos avaliados (Tabela 13). Os tratamentos EP3-16N e o Controle com nitrogênio (COM. N) apresentaram respostas significativas e foram superiores ao Controle sem nitrogênio na cultivar EPAGRI-109 variando de 30% a 39% respectivamente.

Os resultados de massa seca da raiz mostraram respostas significativas superiores ao controle sem inoculação na cultivar IR42 inoculada com o isolado EP4-1L e com o inoculante comercial AZOTOTAL, com incrementos de 27% e 31%, respectivamente. Nas cultivares BRS TROPICAL e EPAGRI-109 foi possível observar respostas positivas a inoculação, porém não diferentes estatisticamente do tratamento não inoculado.

Baldani et al. (2000) selecionando isolados de bactérias diazotrofos em plantas de arroz em condições gnotobióticas, visando a promoção do crescimento vegetal. Selecionou em quatro experimento nessas condições, seis estirpes de *Herbaspirillum seropedicae*, para serem testadas utilizando a técnica da diluição isotópica com ^{15}N . Os autores encontraram efeitos positivos da inoculação das estirpes de até 54% na cultivar Guarani quando inoculado a estirpe ZAE 94.

ARAUJO et al. (2013) utilizando a inoculação de bactérias diazotrofos em condições gnotobióticas para a seleção de isolados e cultivares a serem testadas em casa de vegetação. Encontraram incrementos de biomassa de 48, 28 e 21%, nas variedades Cana Forte, Cana Roxa e IR42 respectivamente, quando inoculadas com a estirpe AR3122 de *A. amazonense*. Os autores também verificaram efeito negativo na acumulação de biomassa quando da inoculação da estirpe de AR1122 de *B. vietnamiensis*. Além de terem verificados que algumas variedades respondem melhor a inoculação que outras. Justificando a pré seleção como método eficaz para se obter resultados mais robustos de inoculação com bactérias diazotróficas.

Tabela 13. Massa seca de parte aérea e raiz de plantas de arroz irrigado, cultivadas em solução de Hoagland inoculadas com bactérias diazotróficas aos 30 dias após a inoculação, (média de quatro repetições).

Tratamentos	Massa fresca da parte aérea (mg.pl ⁻¹)			Massa seca da raiz (mg.pl ⁻¹)		
	IR42	BRS TROPICAL	EPAGRI-109	IR42	BRS TROPICAL	EPAGRI-109
S. inoc	9,80 A b	12,80 A a	13,30 B a	5,40 B a	5,60 A a	6,50 A a
Sp 245	10,30 A b	16,60 A a	14,10 B a	5,40 B a	6,60 A a	5,00 B a
ZAE 94	7,70 A b	12,10 A a	13,10 B a	5,50 B a	5,00 B a	6,10 A a
CBAMC	8,80 A a	11,60 A a	11,50 B a	5,10 B a	5,00 B a	4,50 B a
AZO TOTAL	8,40 A b	11,40 A a	13,00 B a	6,90 A a	6,60 A a	6,10A a
TR-I1	10,20 A a	13,90 A a	12,60 B a	5,50 B a	5,30 B a	4,10 B a
TR-N1	7,90 A b	11,80 A a	13,80 B a	4,90 B a	6,30 A a	5,70 A a
EP3-1L	7,20 A b	13,00 A a	13,60 B a	4,10 B a	5,30 B a	5,60 A a
EP3-2L	9,30 A a	10,90 A a	13,00 B a	5,10 B a	4,30 B a	4,80 B a
EP3-7L	7,60 A b	13,80 A a	12,50 B a	4,80 B a	5,20 B a	4,50 B a
EP3-13J	5,70 A b	12,70 A a	13,20 B a	4,00 B b	4,80 B b	6,30 A a
EP3-14J	8,60 A a	10,80 A a	11,70 B a	5,30 B a	5,10 B a	5,80 A a

Continua...

Continuação da Tabela 13:

EP3-16N	8,30 A b	9,50 A b	17,30 A a	5,20 B a	5,00 B a	5,40 A a
EP4-1L	9,70 A b	13,90 A a	12,90 B a	7,10 A a	6,10 A b	5,20 B b
EP4-2J	9,10 A b	11,90 A a	13,60 B a	5,40 B b	5,60 A b	6,80 A a
EP4-5J	8,50 A b	13,20 A a	15,00 B a	5,10 B a	4,10 B a	5,50 A a
EP4-8N	7,90 A b	14,00 A a	13,20 B a	5,00 B a	5,50 A a	5,30 B a
MIX 1	8,80 A b	10,00 A b	12,90 B a	5,70 B a	5,60 A a	5,50 A a
MIX 2	5,50 A b	12,80 A a	9,90 B a	4,50 B b	6,60 A a	5,50 A b
COM. N	10,80 A b	13,40 A b	18,50 A a	3,70 B a	3,60 B a	4,40B a
Média	8,50 c	12,50 b	13,50 a	5,20 a	5,40 a	5,50 a
C.V(%)		19,91			17,59	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

A relação raiz/parte aérea da massa seca foi afetada significativamente pelo efeito dos tratamentos de inoculação nas cultivares IR42 e BRS TROPICAL, e não provocou respostas para a cultivar EPAGRI-109 (Tabela 14), de modo geral, alguns tratamentos apresentaram incrementos na relação raiz/parte aérea em relação à testemunha para a cultivar IR42, destacando os tratamentos de inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum* (AZO TOTAL, EP3-14J e EP4-1L) e *Herbaspirillum* (ZAE-94). Para a cultivar BRS TROPICAL se destacaram os tratamentos bacterianos TR-N1 do gêneros *Herbaspirillum* e EP3-16N pertencente ao gênero *Paenibacillus*.

Mudanças na arquitetura de raízes de trigo pela inoculação de *Azospirillum* spp estão associadas ao aumento de pêlos radiculares, e raízes laterais, relacionada principalmente pela síntese de AIA (DOBBELAERE et al., 2003). Em contraste, Rodrigues et al. (2008) encontrou que a inoculação de *A. amazonense* em condições gnotobióticas reduziu o crescimento da raiz e parte aérea, quando comparado ao controle, mostrando efeitos negativos do excesso de AIA no meio.

Tabela 14. Relação Raiz/Parte aérea da massa seca plantas de arroz irrigado, cultivadas em solução de Hoagland inoculadas com bactérias diazotróficas aos 30 dias após a inoculação, (média de quatro repetições).

Tratamentos	Relação Raiz/Parte aérea		
	IR42	BRS TROPICAL	EPAGRI-109
S. inoc	0,55 Ba	0,48 Aa	0,50 Aa
Sp 245	0,52 Ba	0,40 Ba	0,37 Aa
ZAE 94	0,75 Aa	0,44 Bb	0,48 Ab
CBAmC	0,58 Ba	0,45 Ba	0,40 Aa
AZO TOTAL	0,85 Aa	0,58 Ab	0,47 Ab
TR-II	0,55 Ba	0,39 Bb	0,34 Ab
TR-N1	0,64 Ba	0,53 Aa	0,41 Aa
EP3-1L	0,60 Ba	0,41 Ba	0,45 Aa
EP3-2L	0,55 Ba	0,40 Ba	0,37 Aa
EP3-7L	0,63 Ba	0,37 Bb	0,37 Ab
EP3-13J	0,76 Aa	0,38 Bb	0,49 Ab
EP3-14J	0,63 Ba	0,48 Aa	0,53 Aa
EP3-16N	0,62 Ba	0,52 Aa	0,32 Ab
EP4-1L	0,73 Aa	0,44 Bb	0,42 Ab
EP4-2J	0,61 Ba	0,47 Aa	0,52 Aa
EP4-5J	0,60 Ba	0,30 Bb	0,39 Ab
EP4-8N	0,64 Ba	0,40 Bb	0,40 Ab
MIX 1	0,67 Ba	0,57 Aa	0,43 Ab
MIX 2	0,84 Aa	0,53 Ab	0,56 Ab
COM. N	0,37 Ba	0,27 Ba	0,24 Aa
Média	0,63 a	0,45 b	0,42 b
C.V(%)		22,89	

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

De um modo geral, pode-se observar incrementos positivos da inoculação com os tratamentos Sp 245, EP4-1L, ZAE94; AZO TOTAL, TR-II; EP3-7; EP3-16N; EP4-1L, EP4-2J; EP4-5J; EP4-8N e MIX 2 (Tabela 15). Nesses tratamentos foram obtidos incrementos de

biomassa superiores ao tratamento não inoculado e não adubado. Já os tratamentos CBAmC; TR-N1; EP3-1L; EP3-2L; EP3-13J; EP3-14J e MIX 1, foram inferiores aos controles usados no experimento. Esses resultados foram utilizados para selecionar os isolados EP4-1L de *Azospirillum amazonense* e EP4-2J de *Azospirillum sp.*, além das estirpes padrões *Azospirillum brasilense* (Sp245) e *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94), e o inoculante comercial AZOTOTAL para serem usados em experimento em casa de vegetação.

Tabela 15. Incremento na biomassa de plântulas de arroz das cultivares IR42, BRS TROPICAL e EPAGRI-109.

Tratamentos	Porcentagem de incremento na biomassa total (%)					
	Biomassa fresca			Biomassa seca		
	IR42	BRS TROPICAL	EPAGRI-109	IR42	BRSTROPICAL	EPAGRI-109
Sp 245	2,4	12,4	-5,6	3,2	20,7	-3,7
ZAE 94	-0,8	-14,6	9,6	-15,2	-7,6	-3,1
CBAmC	-4,3	-21,1	-26,9	-9,4	-10,8	-23,8
AZO TOTAL	10,3	-12,9	-7,9	0,7	-2,2	-3,7
TR-II	-3,4	3,2	-26,9	3,2	4,2	-18,6
TR-N1	-25,8	-4,2	-2,7	-18,8	-1,7	-1,5
EP3-1L	-34,1	-17,3	-11,0	-34,5	-0,5	-3,1
EP3-2L	-9,9	-28,4	-13,5	-5,6	-21,1	-11,2
EP3-7L	-27,1	-2,8	-26,9	-22,6	3,2	-16,5
EP3-13J	-47,0	-11,2	-7,9	-52,0	-5,1	-1,5
EP3-14J	-8,9	-8,0	-13,5	-9,4	-15,7	-13,1
EP3-16N	-15,1	-33,0	17,5	-12,6	-26,9	12,8
EP4-1L	15,9	0,0	-6,3	9,5	8,0	-9,4
EP4-2J	1,6	-16,4	3,8	-4,8	-5,1	2,9
EP4-5J	-10,9	-8,8	6,2	-11,8	-6,4	3,4
EP4-8N	0,0	5,7	3,8	-17,8	5,6	-7,0
MIX 1	-5,2	-17,3	-2,0	-4,8	-17,9	-7,6
MIX 2	-43,5	7,5	-14,4	-52,0	5,2	-28,6
COM. N	-1,7	-15,5	8,5	-4,8	-8,2	13,5

4.6. Inoculação de Bactérias Diazotróficas em Diferentes Variedades de Arroz e Doses de Nitrogênio em Vasos em Casa de Vegetação

A população de bactéria diazotróficas presente na terra utilizada como substrato para a implantação do experimento foi baixa (Tabela 16), bem diferente dos valores encontrados nesse trabalho quando isolou bactéria diazotróficas associado à rizosfera da planta de arroz. Já que os exsudatos vegetais na rizosfera, tais como aminoácidos e açúcares, fornecem uma rica fonte de energia e nutrientes para as bactérias, resultando em populações bacterianas maior na rizosfera do que fora da área de influencia da mesma (GRAY e SMITH, 2005).

Tabela 16. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas presente na terra utilizada como substrato.

Amostra	Log do nº de células g ⁻¹ de terra		
	NFb	LGI	JNFb
Terra	3,65	4,18	3,65

O meio LGI semi-seletivo para *Azospirillum amazonense* recuperou maior valor de bactérias diazotróficas, quando comparados aos meios NFb (semi seletivo para *A. brasilense* e *A. lipoferum*) e JNFb (semi seletivo para *Herbaspirillum spp.*).

A contagem do número de células viáveis presentes nos inoculantes mostrou uma população acima de 10^8 células tanto na contagem de UFC, quanto na contagem de NMP realizadas (Tabela 17). A recomendação de inoculação é que a população no inoculante seja superior a 10^8 células g^{-1} para que os microorganismos sejam capazes de se estabelecerem no solo e de competir com os microorganismos nativos e sobreviver às condições adversas no solo (BASHAN, 1998; HUNGRIA et al., 2005). FERREIRA et al., (2010) selecionando inoculantes a base de turfa concluíram que a sobrevivência das bactérias diazotróficas utilizadas no inoculante turfoso foi mantida em 10^8 células g^{-1} de inoculante até 110 dias de armazenamento, e foi independentemente do tipo de turfa utilizada.

Os resultados mostraram valores inferiores para a contagem de unidades de células formadoras de colônia (UFC) quando comparamos com os resultados de números mais provável (NMP) realizados nos inoculantes após 24 horas de maturação. Porém em todas as contagens foram encontrados valores superiores a 10^8 células por grama ou mL de inoculante.

Tabela 17. Contagem de bactérias realizadas no inoculante produzido e utilizado no experimento em vasos em casa de vegetação.

Tratamentos	Log ₍₁₀₎ do número de células				
	meios de cultura		UFC ml ⁻¹	meios de cultura	
	sólido			semi sólido	
Sp245	NFB 3X		8,25	NFb	
ZAE 94	NFB 3X		8,36	JNFb	
60 2	LGI		8,25	LGI	
68 2 B1	NFB 3X		8,14	NFb	
Azo Total	-		-	NFb	

- Não realizado.

A contagem do NMP de bactérias diazotróficas presentes nas raízes lavadas e adubadas com 30 kg N ha⁻¹, avaliadas durante o estágio de desenvolvimento vegetativo e maturação de grãos, mostrou a presença de bactérias diazotróficas em todos os tratamentos inoculados assim como nos tratamentos não inoculados (Tabela 18). Porém, não foram detectadas diferenças acentuadas entre a população de bactérias dos tratamentos inoculados e não inoculados. Em todos os tratamentos e épocas de coleta foi verificada concentrações de bactérias diazotróficas maior que 10^4 células por grama de massa fresca. Ferreira (2008) e Bonilla (2011) utilizando a técnica de NMP encontraram valores nas raízes de arroz similares aos reportados nesse trabalho. Esses autores também não observaram diferenças entre os tratamentos inoculados e não inoculados nas cultivares de arroz IR 42 e IAC 4440.

Vários autores têm reportado valores de NMP nas raízes de planta de arroz na ordem de 10^3 a 10^8 células por grama de massa fresca. Essa variabilidade de resultados se deve ao genótipo da planta; tipo de solo; estágio fonológico da planta e metodologia usada na contagem (KUSS et al., 2007; RODRIGUES et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008). VIDEIRA (2008) reportou influencia da adubação nitrogenada na contagem de NMP em plantas de arroz, quando do aumento da dose de nitrogênio aplicada. Por outro lado, FERREIRA (2008) não observou efeito da adubação nitrogenada sobre a população de bactérias diazotróficas nas plantas de arroz, independente da parte da planta e variedade.

Apesar da técnica do número mais provável (NMP), ser bom indicativo para verificar a inoculação, não é um método eficaz para a comprovação, pois não é capaz de discriminar se

a população presente foi oriunda ou não da inoculação. Técnicas moleculares como o DGGE são mais precisas em responder essas questões e quando possível devem ser utilizadas.

Tabela 18. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas presentes nas raízes de plantas de arroz das cultivares EPAGRI-109 e BRS TROPICAL nas fases de desenvolvimento vegetativo (60 DAP) e de maturação de grãos (120 DAP) adubadas com 30 kg de N há⁻¹.

Tratamento	Fase vegetativa		Fase de maturação dos grãos		
	Meio de Cultura	EPAGRI - 109	BRSTROPICA L	EPAGRI - 109	BRSTROPICA L
Não inoculado	NFb	4,63 ± 0,19	6,83 ± 0,56	5,74 ± 0,31	5,74 ± 0,31
	JNFB	4,94 ± 0,85	6,91 ± 0,51	5,88 ± 0,50	6,22 ± 0,76
	LGI	5,10 ± 0,95	6,59 ± 0,27	5,74 ± 0,31	6,08 ± 0,81
Sp245	NFb	5,92 ± 0,47	6,41 ± 0,78	6,48 ± 0,15	6,40 ± 0,24
ZAE 94	JNFB	5,63 ± 0,03	6,43 ± 0,71	5,67 ± 0,29	6,69 ± 0,33
EP4-1L	LGI	6,20 ± 0,75	6,01 ± 0,38	6,56 ± 0,15	6,78 ± 0,23
EP4-2J	NFb	6,22 ± 0,73	5,97 ± 0,33	6,74 ± 0,40	6,91 ± 0,23
Azo Total	NFb	6,03 ± 0,09	5,85 ± 0,63	6,78 ± 0,23	6,87 ± 0,42

A análise de variância (Anexo E) mostrou diferença significativa quanto à inoculação somente na variável número de panícula. Para as demais, altura e número de perfilho aos 60 DAP, massa seca total aos 60 e 120 DAP, peso de 100 grãos, produção de grãos por planta e biomassa total (incluído produção de grãos), não houve diferença (nível de 5%) (Tabela 19).

A inoculação de bactérias diazotróficas produziu incrementos significativos no número de panículas por planta, dependendo da estirpe inoculada, cultivar e dose de N. O inoculante comercial AZOTOTAL e as estirpes EP4-1L de *A. amazonense* e Sp245 de *A. brasilense* aumentaram significativamente a produção de panícula na cultivar EPAGRI-109 em 23,96%, 19,80% e 39,93%, respectivamente, na dose de 30 Kg ha⁻¹ (Tabela 19).

O desdobramento da inoculação proporcionou diferenças significativas dentro de doses de nitrogênio para as variáveis massas seca total 120 DAP e Biomassa total. E dentro de Cultivares proporcionou diferenças significativas para as variáveis massas seca total aos 60 DAP, massa seca total aos 120 DAP e para número de panículas.

As análises de massa seca total aos 60 e 120 DAP mostrou em ambas as variedades, que a inoculação promoveu aumentos nestes parâmetros, porém foi dependente da cultivar e doses de nitrogênio utilizadas. Para massa seca total aos 60 DAP as estirpes Sp245 de *A. brasilense* e ZAE94 de *H. seropedicae* promoveram incremento significativos de 16,80% e 23,65% na dose de 120 Kg ha⁻¹ na cultivar BRS TROPICAL e as estirpes EP4-1L de *A. amazonense* e EP4-2J de *Azospirillum sp.*, de 15,40% e 16,20% na cultivar EPAGRI-109 para a mesma dose. Para massa seca total aos 120 DAP as estirpes EP4-1L de *A. amazonense* e Sp245 de *A. brasilense* promoveram incrementos significativos de 30,77% e 36,30% respectivamente, na dose de nitrogênio de 60 Kg ha⁻¹ de N na cultivar EPAGRI-109.

Guimarães et al. (2003) analisando o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas em arroz de sequeiro encontrou no experimento em casa de vegetação diferenças de resposta a inoculação em plantas de arroz ao longo do tempo. Aos 40 dias após o transplântio foram observadas diferenças significativas quanto à inoculação chegando a 111% em relação ao não inoculado. Porém, 70 dias após o transplântio não foram observadas diferenças significativas em relação à matéria seca produzida. No campo, os autores observaram aumento na produção de grãos de até 50%, com inoculação da estirpe ZAE94 de *H. seropedicae*.

Tabela 19. Inoculação de bactérias diazotróficas nos parâmetros altura e perfilho aos 60 DAP, Massa seca total aos 60 DAP e aos 120 DAP; número de panícula; peso de 100 grãos e produção de grãos nas cultivares de arroz BRS TROPICAL e EPAGRI-109 em diferentes doses de adubação nitrogenada.

Dose	Inoculação	Altura 60 DAP (cm.planta ⁻¹)		Perfilho 60 DAP (Planta ⁻¹)		Massa seca total 60 DAP (g.planta ⁻¹)		Massa seca total 120 DAP (g.planta ⁻¹)		Panículas (Planta ⁻¹)		Peso100 Grãos (g)		Produção de Grãos (g.planta ⁻¹)	
		BRS	EPAGRI-	BRS	EPAGRI-	BRS	EPAGRI-	BRS	EPAGRI-	BRS	EPAGRI-	BRS	EPAGRI-	BRS	EPAGRI-
		TROPICAL	109	TROPICAL	109	TROPICAL	109	TROPICAL	109	TROPICAL	109	TROPICAL	109	TROPICAL	109
30 kg de N	Ñ INOC	74,81 Aa	69,38 Aa	4,25 Aa	4,00 Aa	12,00 Aa	12,54 Aa	27,45 Aa	28,44 Aa	3,50 Aa	3,13 Ba	2,83 Aa	2,76 Aa	7,96 Aa	5,89 Ab
30 kg de N	AZOTOTAL	68,19 Ba	66,69 Aa	3,88 Aa	3,50 Aa	12,76 Aa	11,11 Aa	24,32 Aa	26,15 Aa	2,88 Ab	3,88 Aa	2,74 Aa	2,74 Aa	8,09 Aa	7,51 Aa
30 kg de N	ZAE94	67,75 Ba	63,94 Aa	3,63 Aa	3,75 Aa	10,33 Ab	13,91 Aa	24,33 Aa	28,67 Aa	3,13 Aa	3,25 Ba	2,80 Aa	2,62 Aa	6,94 Aa	7,77 Aa
30 kg de N	Sp245	74,19 Aa	65,75 Ab	3,50 Aa	4,13 Aa	10,69 Aa	11,52 Aa	23,43 Aa	23,78 Aa	3,13 Ab	4,38 Aa	2,75 Aa	2,74 Aa	8,13 Aa	8,26 Aa
30 kg de N	EP4-IL	67,19 Ba	70,25 Aa	3,38 Aa	3,88 Aa	10,09 Aa	12,19 Aa	21,71 Ab	29,08 Aa	3,13 Aa	3,75 Aa	2,78 Aa	2,46 Aa	8,18 Aa	7,24 Aa
30 kg de N	EP4-2J	69,94 Ba	67,63 Aa	2,75 Aa	4,13 Aa	10,66 Ab	13,95 Aa	27,62 Aa	30,51 Aa	3,25 Aa	3,13 Ba	2,75 Aa	2,74 Aa	7,75 Aa	7,57 Aa
60 kg de N	Ñ INOC	74,44 Aa	71,31 Aa	3,63 Aa	4,88 Aa	11,61 Aa	13,42 Aa	27,37 Aa	25,31 Ba	3,50 Aa	3,63 Aa	2,75 Aa	2,82 Aa	9,00 Aa	7,70 Aa
60 kg de N	AZOTOTAL	77,56 Aa	72,69 Aa	3,88 Aa	5,25 Aa	12,37 Aa	15,19 Aa	26,68 Aa	29,70 Ba	3,38 Aa	4,00 Aa	2,90 Aa	2,72 Aa	8,81 Aa	8,37 Aa
60 kg de N	ZAE94	75,00 Aa	72,13 Aa	4,25 Aa	4,63 Aa	13,27 Aa	14,64 Aa	29,88 Aa	32,11 Aa	3,75 Aa	4,25 Aa	2,62 Aa	2,35 Aa	8,63 Aa	7,11 Aa
60 kg de N	Sp245	73,88 Aa	69,75 Aa	4,00 Aa	4,38 Aa	12,35 Aa	14,64 Aa	29,18 Ab	34,50 Aa	3,63 Aa	3,88 Aa	2,85 Aa	2,86 Aa	8,68 Aa	6,51 Ab
60 kg de N	EP4-IL	72,56 Aa	71,94 Aa	4,25 Aa	4,38 Aa	13,58 Ab	17,99 Aa	29,03 Aa	33,10 Aa	3,88 Aa	4,00 Aa	2,75 Aa	2,63 Aa	9,40 Aa	7,46 Ab
60 kg de N	EP4-2J	75,06 Aa	73,56 Aa	4,13 Aa	5,63 Aa	12,08 Ab	15,76 Aa	26,50 Aa	29,95 Ba	3,25 Aa	3,63 Aa	2,91 Aa	2,74 Aa	8,52 Aa	7,88 Aa
90 kg de N	Ñ INOC	82,44 Aa	74,75 Ab	5,25 Aa	6,63 Aa	14,06 Aa	16,01 Aa	26,95 Aa	29,09 Aa	3,88 Aa	4,25 Aa	2,72 Aa	2,64 Aa	9,19 Aa	8,90 Aa
90 kg de N	AZOTOTAL	78,94 Ba	70,75 Ab	5,00 Aa	6,50 Aa	15,61 Aa	14,57 Aa	28,61 Aa	27,61 Aa	4,13 Aa	4,38 Aa	2,72 Aa	2,72 Aa	10,22 Aa	9,10 Aa
90 kg de N	ZAE94	75,63 Ba	72,88 Aa	5,13 Aa	5,88 Aa	14,59 Aa	15,57 Aa	32,95 Aa	31,66 Aa	4,00 Aa	3,88 Aa	2,71 Aa	2,65 Aa	10,25 Aa	9,08 Aa
90 kg de N	Sp245	85,13 Aa	75,25 Ab	5,00 Aa	4,63 Aa	13,60 Aa	14,53 Aa	27,66 Aa	30,71 Aa	3,88 Aa	4,38 Aa	2,64 Aa	2,68 Aa	10,15 Aa	8,90 Aa
90 kg de N	EP4-IL	77,25 Ba	74,88 Aa	6,50 Aa	5,50 Aa	15,62 Aa	16,91 Aa	30,30 Aa	35,14 Aa	4,25 Aa	4,00 Aa	2,99 Aa	2,71 Aa	9,44 Aa	8,39 Aa
90 kg de N	EP4-2J	79,25 Ba	76,44 Aa	5,75 Aa	5,88 Aa	15,31 Aa	16,06 Aa	30,29 Aa	29,90 Aa	3,88 Aa	4,13 Aa	2,73 Aa	2,90 Aa	10,45 Aa	9,01 Aa
120 kg de N	Ñ INOC	81,75 Aa	76,00 Aa	6,63 Aa	7,38 Aa	14,16 Bb	17,40 Ba	35,52 Aa	36,07 Aa	4,50 Aa	4,50 Aa	2,43 Ab	2,86 Aa	10,90 Aa	9,74 Aa
120 kg de N	AZOTOTAL	81,00 Aa	76,63 Aa	6,63 Aa	6,50 Aa	14,49 Bb	18,03 Ba	32,97 Aa	37,97 Aa	4,50 Aa	5,13 Aa	2,66 Aa	2,69 Aa	10,31 Aa	10,90 Aa
120 kg de N	ZAE94	81,00 Aa	78,69 Aa	7,38 Aa	6,75 Aa	17,51 Aa	16,26 Ba	33,93 Aa	34,05 Aa	3,88 Aa	4,63 Aa	2,75 Aa	2,59 Aa	10,64 Aa	9,21 Aa
120 kg de N	Sp245	83,38 Aa	76,88 Ab	6,50 Aa	7,50 Aa	16,54 Aa	18,19 Ba	33,45 Aa	35,56 Aa	4,38 Ab	5,38 Aa	2,78 Aa	2,61 Aa	11,24 Aa	8,93 Ab
120 kg de N	EP4-IL	78,75 Aa	74,38 Aa	6,88 Ab	8,63 Aa	15,11 Bb	20,08 Aa	30,99 Ab	38,85 Aa	5,00 Aa	4,75 Aa	2,75 Aa	2,65 Aa	10,69 Aa	9,26 Aa
120 kg de N	EP4-2J	81,00 Aa	73,81 Ab	6,88 Aa	7,13 Aa	13,57 Bb	20,22 Aa	33,77 Aa	30,01 Ba	4,38 Aa	4,13 Aa	2,75 Aa	2,71 Aa	10,95 Aa	8,72 Ab
C.V		5,9		21		14,2		11,7		9,74		8,55		13,74	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha para cada parâmetro diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade

Ferreira (2008) avaliando a inoculação *Herbaspirillum seropedicae* em duas cultivares de arroz irrigado em condição de campo em diferentes doses de N, encontrou máxima resposta à inoculação no tratamento de 20 kg de N ha⁻¹ acrescido da inoculação em comparação ao tratamento não inoculado e não adubado, 14 % em relação ao que recebeu somente a inoculação e 20,5 % em relação ao que recebeu 20 kg de N ha⁻¹ na cultivar IR42. Já Guimarães et al. (2010) observaram que os maiores acúmulos de massa seca de plantas de arroz foram observados nos tratamentos adubados com 50 e 100 kg ha⁻¹ de N.

Embora não fora observado efeito significativo, o tratamento de inoculação com o inoculante comercial AZOTOTAL proporcionou incrementos positivos de 27,50%, 8,70%, 2,25% e 11,90% superior ao controle não inoculado na cultivar EPAGRI-109 na variável produção de grãos nas doses de 30, 60, 90 e 120 kg ha⁻¹ de N, respectivamente (Tabela 19). Na análise de Nitrogênio total desses grãos não houve diferença significativa quanto à inoculação (Anexo F).

Na análise de regressão para o desdobramento de doses e inoculação na variável biomassa total. Observou-se que a dose de nitrogênio proporcionou aumentos de biomassa total nas duas cultivares e a máxima resposta na dose de 120 kg ha⁻¹ da adubação (Figura 11). Na cultivar BRS TROPICAL a inoculação com bactérias diazotróficas foi efetiva até a dose de 90 kg ha⁻¹ de N e todos os isolados foram superiores ao tratamento não inoculado nessa dose. Para a cultivar EPAGRI-109 houve isolados superiores ao tratamento inoculado em todas as doses de nitrogênio.

FERREIRA (2008), trabalhando com diferentes doses de nitrogênio em trabalho de inoculação de bactérias diazotróficas, encontrou maiores resposta a inoculação em baixas doses de N, porém o autor também observou a partir da análise regressão que as maiores resposta a adubação ocorreu na maior dose usada no experimento (100 kg de N ha⁻¹).

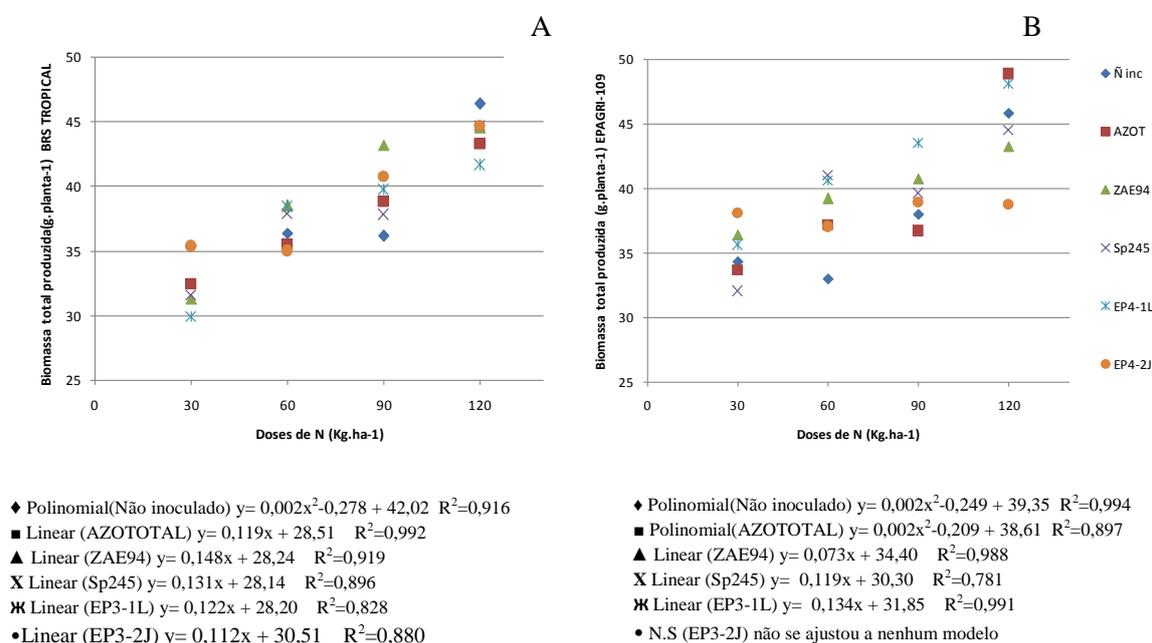


Figura 11. Análise de regressão da variável acúmulo de biomassa total em função das doses de nitrogênio (30, 60, 90 e 120 Kg. ha⁻¹) nas variedades BRSTROPICAL (A) e EPAGRI-109 (B). Inoculadas com AZOTOTAL, ZAE94, Sp245, EP3-1L, EP3-2J e um tratamento não inoculado. Sob condições de casa de vegetação (média de 4 repetições).

5. CONCLUSÕES

- Foram obtidos 39 isolados de bactérias diazotróficas nas cultivares EPAGRI-109 e BRS TROPICAL, sendo 49% da parte aérea de arroz e 28% associado às raízes e 23% provenientes do solo rizosférico.
- Foram obtidos oito isolados pertencente ao gênero *Azospirillum sp* e dois isolados identificados como *Herbaspirillum seropedicae*.
- Os isolados selecionados como Promotoras do crescimento vegetal (PCV) foram capazes de produzir incrementos em massa seca e fresca de arroz em condições gnotobioticas.
- A inoculação com bactérias diazotróficas em condições de casa de vegetação proporcionou aumento significativo no numero de panícula da cultivar EPAGRI-109.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM NETO, S.; ANDRADE, W. E. B.; ZAMPIER, J. A. L.; GONÇALVES, R. A.; PARENTE, F. C.; COLARES, S. A.; SOUZA, A. P.; ALEIXO, S. M.; FURTADO, P. R.; CANZIAN, C. A.; SILVA, V. R. Resposta do arroz irrigado ao nitrogênio nas regiões Norte/Nordeste fluminense. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, p. 227 - 233, 1999.

AMORIM NETO, S.; ANDRADE, W. E. de B. A cultura do arroz irrigado no Estado do Rio de Janeiro, . Niteroi: PESAGRO-RIO, 100p. Niteroi: PESAGRO-RIO, 2008.

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

ARAÚJO, A. P. & MACHADO, C. T. T. Fósforo in: FERNANDES, M. S. ed: Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 432p, 2006.

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

BACA, B.; SOTO, L.; PARDO, M. Fijación biológica de nitrógeno. **Elementos**, v.1, p. 39 – 49, 2000.

BAL, H. B.; DAS, S.; DANGAR, T. K.; ADHYA, T. K. ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. **J. Basic Microbiol.** v.53, p, 972–984, 2013.

BALDANI, J. I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz.** 1984, 110f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1984.

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

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSÉN, E.; BALDANI, V. L.D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.

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. **Biotechnologia**: avanços na agricultura e na agroindústria, Caxias do Sul: EDUCS, p. 195-232, 2002.

BALDANI, J. I., BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An. Acad. Bras. Cienc.** 77, 549–579, 2005.

BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980.

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 seropédica.** Itaguaí, RJ, 1996. 238 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

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

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

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v.16, p.729–77, 1998.

BASHAN, Y.; LEVANDONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as challenge for agriculture. **Can. J. Microbiology**, v. 36, p. 591-680, 1990.

BODDEY, R. M.; BODDEY, L. H.; URQUIAGA, S. A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio. Itaguaí: Editora Universidade Rural, 1990. 37p. (EMPRAPA-CNPBS. Documentos, 6).

BONILLA, German Andres Estrada. **Seleção de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fósforo e seu efeito no desenvolvimento de plantas de arroz.** Seropédica: UFRRJ, 2011. 70 p. (Dissertação, Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

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

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

CHAIHARN, M.; CHUNHALEUCHANON S.; LUMYONG, S. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. **World J Microbiol Biotechnol**, 25(11):1919–1928, 2009.

CHOULHURY , A. T. M. A.; KENNEDY, I. R. Nitrogen Fertilizer Losses from Rice Soils and Control of Environmental Pollution Problems. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 36: 1625–1639, 2005.

COLLAVINO, M. M.; SANSBERRO, P. A.; MROGINSKI, L. A.; AGUILAR , O. M. comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote phaseolus vulgaris growth. **Biol fertil soils**, v, 46:727–738, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento, julho 2013. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_07_09_09_04_53_boletim_graos_junho_2013.pdf Acesso em: 05 de Janeiro de 2014.

CUTRIM, V. DOS A; CORDEIRO, A. C. C.; LOPES, A. M.; PEREIRA, J. A.; FONSECA, J. R.; RANGEL, P. H. N.; AMORIM NETO, S. BRS Tropical: cultivar de arroz de ampla adaptação para as várzeas tropicais. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2008. 4 p. (Embrapa Arroz e Feijão. **Comunicado Técnico**, 163).

DECHER, A. R. & NACHTIGALL, G. R. Micronutrientes in: FERNANDES, M. S. ed: Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 432 p, 2006.

DEUBEL, A.; GRANSEE, A.; MERBACH, W. Tricalcium-phosphate solubilizing efficiency of rhizosphere bacteria depending on the P-nutritional status of the host plant. **Developments in Plant and Soil Sciences**,v, 102, p 257-260, 2007.

DIDONET, A. D.; DIDONET, C. C. G.M E GOMES, G. F. Avaliação de Linhagens de Arroz de Terras Altas Inoculadas com *Azospirillum lipoferum* Sp59b e *A.brasilense* Sp245. **Comunicado Técnico 69**, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, 2003.

DOBBELAERE S, V.; ANDELEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects ofndiazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.22: p.107-149, 2003.

DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**. Oford, 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. 60 p. Embrapa-SPI, Brasília, 1995.

DOWNING, K. J.; LESLIE, G.; THOMSON, J. A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac7 and *Serratina marcescens* chiA genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.7,p.2804-2810, 2000.

ESTRADA, G. A., BALDANI, V. L. D., OLIVEIRA, D. M., URQUIAGA, S. BALDANI, J. I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant Soil**, 369:115–129, 2013.

EUCLYDES, R. F. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema de Análise Estatística e Genética). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1983. 59p.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 5.0. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, p.255-258, 2003.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 179-185, 2010.

FERREIRA, J. S. **Qualidade de inoculante, inoculação e reinoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas cultivares de arroz irrigado**. 2008. 83p. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Revista Agronomia**, v.37, n.02, p.6-12, 2003.

FIGUEREDO, M. V. B.; SOBRAL, J. K.; STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M. Bactérias promotoras do crescimento de plantas estratégia para uma agricultura Sustentável. In: Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais/ editores técnicos, FIGUEREDO, M. V.B; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; ROSÁLIA E SILVA, C. E.; STAMFORD, N. P. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife, PE: Instituto Agrônomo de Pernambuco. 761 p, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). FAO Rice Market Monitor (RMM). Disponível em: <http://www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/rice-market-monitor-rmm/en/>. Acessado em: 22 de abril de 2014.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**. v.321, p.35–59, 2009.

GHOSH, U.; SUBHASHINI, P.; DILIPAN, E.; RAJA, S.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. Isolation and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Seagrass Rhizosphere Soil. J. Ocean Univ. China (**Oceanic and Coastal Sea Research**),v, 11 (1): 86-92, 2012.

GRAY, E.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions, in the plant bacterium signaling process. **Soil biology and soil biochemistry**, v.37, p.395–412, 2005.

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

GUIMARÃES, S. L. **Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral**. 2006. 52p Tese

(Doutorado em Agronomia - Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomica**, v37, n.2, p.25-30, 2003.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; JACOB – NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.3, p.393-398, 2007.

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

HARDOIM, P. R.; ANDREOTE, F. D.; REINHOLD-HUREK, B.; SESSITSCH, A.; OVERBEEK, L. S. V.; ELSAS, J. D. V. Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 77, p. 154-164, 2011.

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, M. F.; MENDES, I. C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM P. H. Inoculant preparation, production and application, In: WERNER, D.; NEWTON W. E. (Eds.). **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment**, Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 223–254, 2005.

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

ISAWA, T.; YASUDA, M.; AWAZAKI, H; MINAMISAWA, K.; SHINOZAKI, S, NAKASHITA, H. *Azospirillum* sp. Strain B510 Enhances Rice Growth and Yield. **Microbes Environ.** v. 25, p, 58–61, 2010.

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.

KENNEDY, G.; BURLINGAME, B. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. **Food Chemistry**, Barking, v. 80, n. 4, p. 589-596, 2003.

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

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

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of Phosphate Solubilizing Microorganisms in Sustainable Agriculture – A Review. **Agron. Sustain. Dev.** 27, 29–43, 2007.

KNIEF, C.; DELMOTTE, N.; CHAFFRON, S.; STARK, M.; INNEREBNER, G.; WASSMANN, R.; MERING, C. V.; VORHOLT, J. A. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. **The ISME Journal**, 1 – 13, 2011.

KRAISER, T.; GRAS, D. E.; GUTIE´ RREZ, A. G.; GONZA´ LEZ, B.; GUTIE´ RREZ, R. A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. REVIEW PAPER, **Journal of Experimental Botany**, Vol. 62, No. 4, pp. 1455–1466, 2011.

KUNDU, B. S.; NEHRA, K.; YADAV, R.; TOMAR, M. Biodiversity of phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere of chickpea, mustard and wheat grown in different regions of Haryana. **Indian J Microbiol.** v, 49:120–127, 2009.

KUNDU, D.K., LADHA, J.K. Engancing soil nitrogen use and biological nitrogen fixation em wetland rice. **Experimental Agriculture**, v. 31, n.3, p.261-278, 1995.

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. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.10, p.1459-1465, out. 2007.

LAVAKUSH.; YADAV, J.; VERMA, J. P.; JAISWAL, D. K.; KUMAR, A. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). / **Ecological Engineering**. v, 62, p, 123– 128,2014.

LEE, S.; FLORES-ENCARNACIÓN M.; CONTRERAS-ZENTELLA, M; GARCIA-FLORES, L.; ESCAMILLA, J. E.; KENNEDY, C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconactobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. **Journal of Bacteriology**, v.186, n. 16, p. 5384-91, 2004.

LEVEAU, J. H. J.; GERARDS, S. Discovery of a bacterial gene cluster for catabolism of the plant hormone indole 3-acetic acid. **FEMS Microbiology Ecology**, v.65, p.238–250, 2008.

LIMA, E.; ZONTA, E, Recomendações de Adubos, corretivos e de manejo da matéria orgânica para as principais culturas do Estado o Rio de Janeiro. Grandes culturas: Arroz (*Oryza sativa*). In: FREIRE, L. R. (Coor). Manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro. Brasilia, DF: Embrapa; Seropédica, RJ: **Editora Universidade Rural**. 430 p, 2013.

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

MILAGRES, A. M. F.; MACHUCA, A.; NAPOLEAO, D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. **Journal of Microbiological Methods**, v, 37, p;1–6, 1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA, Culturas, Arroz. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>, Acessado em 05 de Janeiro de 2014.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 626 p. Lavras: UFLA, 2002.

MOSIER, A. R. Environmental challenges associated with needed increases in global nitrogen fixation. **Nutrient Cycling in Agroecosystems** 63: 101–116, 2002.

NAUTIYAL, C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.265-270, 1999.

NEILANDS, J. B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. **J. Biol. Chem.**, 270:26723-26726, 1995.

OLIVEIRA, E. **Quantificação da fixação biológica de nitrogênio em arroz (*Oryza sativa* L.) inundado**. 1994. 135p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

PEDRAZA, R. O.; BELLONE, C. H.; BELLONE, S. C.; BOA SORTE, P. M. F.; TEIXEIRA, K. R. S. Azospirillum inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **European journal of soil biology** . v. 45, p. 36–43, 2009.

PEDRAZA, R. O.; MOTOK, J.; TORTORA, M. L.; SALAZAR, S.M.; DÍAZ-RICCI, J. C. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. **Plant and Soil**, v. 295, n. 1-2, 2007.

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

PÉREZ-MIRANDA, S.; CABIROL, N.; GEORGE-TÉLLEZ, R.; ZAMUDIO-RIVERA, L. S.; FERNÁNDEZ, F. J. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. **Journal of Microbiological Methods**, v, 70, p;127–131,2007.

PUNSCHKE, K.; MAYANS, M. Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. **Agrociencia Uruguay** , v.15 p,19-26 – 2011.

RACHID, D.; AHMED, B. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Biotechnology**, v, 4 (7), p. 697-702, 2005.

RASTOGI, G. & SANI, R. K. Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment. **Microbes and Microbial Technology**, p. 29-57, 2011.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação Biológica de Nitrogênio Simbiótica e Associativa *in*: FERNANDES, M. S. ed: Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 432p, 2006.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal Plant Physiology**, v. 28, p.897–906, 2001.

RICHARDSON, A.E.; BAREA, J. M.; MCNEILL, A. M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant Soil**, v, 321:305–339, 2009.

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 Soil** 302, 249–261, 2008.

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.

ROJAS-TAPIAS D., MORENO-GALVÁN A., PARDO-DÍAZ S., OBANDO M., RIVERA D., BONILLA R. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). **Appl Soil Ecol** 61: 264-272, 2012.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N. Y., **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989. 1659 p. ISBN 087969-309-6.

SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L. I. A.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology**, v,5;p 301-307, 2009.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M. SA T. M. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members their possible role in plant growth promotion. **Microb Ecol** 55:130–140, 2008.

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

SCHWYN B AND NEILANDS JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochem.** V. 160, p.47-56, 1987.

SCOOT, A. J.; KMOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Oxford, v. 30, p. 507-512, 1974.

SOUZA, R. R. & FERNANDES, M. S. Nitrogenio in: FERNANDES, M. S. ed: Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 432p, 2006.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y.; Plant Growth-Promoting Actions of *Rhizobacteria*. In: VAN LOON, L. C. (Ed.). **Advances in Botanical Research**, Burlington: Academic Press, v. 51, p.283-320, 2009.

STAAL, M.; TE LITEL-HEKKERT, S.; HARREN, F.; STAL, L. Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring. **Environmental Microbiology**, v.3, n. 5, p. 343-351, 2001.

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**, 194, p. 25 - 36, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Auxin: The Growth Hormone. In: **Plant physiology**, 2nd ed. Sinauer Associates Inc, Sunderland, p. 725-75, 2006.

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

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.7, p.847-859, 2006.

TORTORA M. L.; DÍAZ RICCI J.C.; PEDRAZA R. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Arch Microbiol** v.193, p.275-286, 2011.

TRAN VAN, V., BERGE, O., NGÔ KÊ, S., 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 Vietnan. **Plant Soil** 218, 273-284, 2000.

VASQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.E.; LOPEZ-CORTEZ,A.;BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.460-468, 2000.

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

VIDEIRA, S. S.; OLIVEIRA, D. M.; MORAIS, R. F.; BORGES, W. L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two Pennisetum purpureum Schum. genotypes grown in the field. **Plant Soil**. v. 356, p. 51-66, 2012.

VIDEIRA, S. S.; ARAUJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. (2007) Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não -Leguminosas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007 (**Série Documentos**).

VIDEIRA, Sandy Sampaio. **Taxonomia polifásica de bactérias diazotróficas do gênero *Sphingomonas* spp. e efeito da inoculação em plantas de arroz.** 2008. 126 p. Dissertação

(Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

VIDEIRA, S. S.; ARAUJO, J. L. S.; RODRIGUES, L. S. Baldani, V. L. D.; BALDANI, I. J. Occurrence and diversity of nitrogen fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. **FEMS Microbiol Lett.**, 293 p. 11-19, 2009.

VIEIRA, J.; MARSCHALEK, R.; SCHIOCCHET, M. A. Cultivares de arroz da EPAGRI – Descrição e caracterização. Florianópolis: 76 p, EPAGRI, 2007. (**EPAGRI, Boletim Técnico, 138**).

WANG, R. F., BEGGS, M. L., ERICKSON B. D., CERNIGLIA C. E. Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 213, p. 175-182, 2002.

WANG, R. F., CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. **Int J. Syst. Bacteriol**, v. 46, p. 341-343, 1996.

WOODWARD A. W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**. v. 95, p. 707-735, 2005.

XIANG, W. L.; LIANG, H. Z.; LIO, S.; LUO, F.; TANG, J.; LI, M. Y.; CHE, Z. M. Isolation and performance evaluation of halotolerant phosphate solubilizing bacteria from the rhizospheric soils of historic Dagong Brine Well in China. **World J. Microbiol Biotechnol.**, v. 27, p. 2629-2637, 2011.

YANO, D. M. Y.; ATTILI, D. S.; GATTI, M. S. V.; EGUCHI, S. Y.; OLIVEIRA, U. M. Técnicas de microbiologia em controle de qualidade. Campinas: **Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello"**, 1991.

7. ANEXOS

A – Soluções Utilizadas

Solução salina para diluição seriada

K ₂ HPO ₄	sol. 10 %	1 ml
MgSO ₄	sol. 10 %	0,5 ml
NaCl	sol. 10 %	0,2 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol. 1 %	0,5 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	1 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		0,5 ml
Ajustar o pH para 6,5 com solução de H ₂ SO ₄ a 5%		
Completar para 1000 ml com água destilada		

Solução de micronutrientes para meio de cultura

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,200 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,235 g
H ₃ BO ₃	0,280 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,008 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,024 g
Completar para 200 ml com água destilada	

Solução de vitaminas

Biotina	10 ml
Piridoxol – HCL	20 ml
Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100 ml com água destilada	

B – Meios de Cultivo

Meio JNFb (DÖBEREINER et al., 1995) Ácido málico	5 g	
K ₂ HPO ₄	sol. 10 %	6 ml
K ₂ HPO ₄	sol. 10 %	18 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10 %	2 ml
NaCl	sol. 10 %	1 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol. 1 %	2 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	2 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	4 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml
KOH		4,5 g
Extrato de levedura (somente para meio sólido)		20 mg

Meio LGI (MARGALHÃES et al., Anais da Academia Brasileira de Ciências. V. 55, p. 417 - 430, 1983)

Açúcar cristal		5 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10 %	2 ml
KH ₂ PO ₄	sol. 10 %	6 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10 %	2 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol. 10 %	2 ml
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	sol. 0,1 %	2 ml
FeCl ₃ .6H ₂ O	sol. 1 %	2 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	5 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	4 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml
Extrato de levedura (para meio sólido)		20 mg

Ajustar o Ph para 6,0 - 6,2 com solução de H₂SO₄ a 5%

Completar para 1000 ml com água destilada

Adicionar 1,4g l⁻¹ de agar para semi-sólido e 15g l⁻¹ para sólido

Para meio liquido 1g por Litro de KNO₃ (Nitrato de potássio)

Meio NFb (BALDANI & DOBEREINER, *Soil Biology & Biochemistry*. Oxford,. v. 12, n.4, p 433 - 439, 1980)

Ácido málico		5 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10 %	5 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10 %	2 ml
NaCl	sol. 10 %	1 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol. 1 %	2 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 %	2 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	4 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml
KOH		4,5 g
Extrato de levedura (para meio sólido)		50 mg

Ajustar o pH para 6,5 com solução de KOH a 10%

Completar para 1000 ml com água destilada

Adicionar 1,6g l⁻¹ de agar para semi-sólido e 15g l⁻¹ para sólido

Para meio liquido adicionar 1g por Litro de NH₄CL(Cloreto de amônio)

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

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

Ajustar o pH com solução de KOH a 10%, pH 6,0 % para *Herbaspirillum*, pH 6,0 % para *Gluconacetobacter* (menos ácido málico) ou pH 6,8 para *Azospirillum*.

Completar para 1000 ml com água destilada.

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

Batata cozida	200 g
Ácido málico	2,5 g
Açúcar cristal	2,5 g
Solução de micronutrientes	2 ml
Solução de vitaminas	1 ml

Pesar 200 g de batata e cozinhar em água destilada durante 30 minutos.

Paralelamente, adicionar o ácido málico em 50 ml de água destilada com 2 gotas de azul de bromotimol solução a 0,5 % em 0,2 N de KOH. Adicionar o açúcar cristal, o micronutriente e a vitamina e ajustar o pH com KOH até atingir pH 6,8 – 7,0. Filtrar a batata em algodão e juntar a solução preparada anteriormente ao filtrado. Completar o volume para 1000 ml. Adicionar 1,84 g l⁻¹ de agar para semi-sólido e 15 g l⁻¹ de agar para sólido.

Meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999)

Glicose	10 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
KCl	0,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g

Ajustar o pH para 7.

Para formação do precipitado, adicionar 100 ml K₂HPO₄ (10 %), 50 ml CaCl₂ (10 %) ou 5 g l⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂.

C – Redução de Acetileno

Isolados	ARA			
	(nmol de C ₂ H ₄ por ml h ⁻¹)			
	Média 24 h	Média 48 h	Média 72 h	Média 96 h
Sp245	0,12	161,14	36,99	-
ZAE94	0,00	0,43	57,54	1,17
CBAmC	0,00	0,53	1,08	31,06
EP3-1L	0,03	0,52	1,73	-
EP3-2L	1,45	6,79	13,86	37,81
EP3-3L	0,62	12,57	13,12	28,21
EP3-4L	0,00	0,26	5,30	8,53
EP3-5L	0,00	1,51	6,54	8,57
EP3-6L	2,09	8,37	10,72	26,29
EP3-7L	0,84	6,24	14,76	22,97
EP3-9J	0,00	0,00	0,05	0,33
EP3-10J	0,00	0,00	0,00	0,03
EP3-11J	0,00	0,00	0,01	0,08
EP3-12J	0,00	0,02	0,00	0,14
EP3-13J	0,00	137,72	23,28	-
EP3-14J	0,72	124,04	11,47	-
EP3-15N	0,93	8,59	1,03	-
EP3-16N	0,00	0,69	1,28	21,11
EP3-17N	0,00	0,00	0,95	0,58
EP4-1L	0,00	9,46	37,92	41,05
EP4-2J	0,00	194,75	9,42	-
EP4-3J	0,00	193,60	7,97	-
EP4-5J	0,27	102,96	4,98	-
EP4-8N	0,00	0,02	8,96	2,01
*	*	*	*	*
ZAE 94	0,00	0,46	44,01	1,48
Sp 245	0,00	119,78	105,26	0,00
TR-I1	0,00	60,66	149,79	0,00
TR-N1	0,00	0,14	1,19	0,42
TR-N2	0,00	0,04	1,02	0,03
TR-N3	0,00	0,01	0,68	0,01
TR-N4	0,00	0,00	0,69	0,01
TR-N5	0,00	0,00	1,14	0,10
TR-N6	0,00	0,00	1,09	0,16
TR-N7	0,00	0,00	1,29	0,38
TR-N8	0,00	0,00	0,73	0,23
TR-N9	0,00	0,00	0,37	0,00
TR-N10	0,00	0,00	0,95	0,44
TR-N11	0,00	0,00	0,32	0,23

D – Análises de Solo

		CENTRO DE ANÁLISES				UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO CAMPUS DR. LEONEL MIRANDA Rod. do Açúcar - km 5 Campos dos Goytacazes/RJ Tel.: (22) 2733 0505										Bairro: Penha CEP: 28022-560 Fax: 022 723 1324							
RESULTADOS DE ANÁLISES QUÍMICAS DE SOLOS																		Data: 23/07/2012					
Interessado: JAYME LANDIN																		Solicitação: 143/2012					
Identificação		pH	P *	K *	Ca	Mg	Al	H+Al	Na	C	MO	S.B.	T	t	m	V	Fe	Cu	Zn	Mn	S	B	
Lab.	Int.		mg/dm ³	_____ cmol c/dm ³ _____				%	g/dm ³	_____ cmol c/dm ³ _____			__ % __		mg/dm ³								
1297	.4	4,7	13	186	4,0	1,6	1,0	12,1	1,14	3,29	56,7	7,2	19,3	8,2	12	37							
1298	.5	4,6	7	121	4,3	2,0	1,5	13,5	1,14	3,21	55,3	7,7	21,2	9,2	16	36							
1299	.6	4,6	7	144	2,5	1,2	1,6	11,3	0,72	2,64	45,5	4,8	16,1	6,4	25	30							
1300	.7	4,6	20	117	9,6	3,0	0,6	9,6	1,74	2,42	41,7	14,6	24,2	15,2	4	60							
4 - Talhão 103 com Feijão 5 - Talhão 103 sem Feijão 6 - Talão 105 - Arroz - <i>sl/ calagem</i> 7 - Talão 106 - Arroz - <i>c/ calagem</i>																							
Cultura:												* Extrator Carolina do Norte											
* O Laboratório só se responsabiliza pelos dados analíticos																							
Local:																							
 Eng. Agr. Mauri dos Santos Manhães Responsável pelo Centro de Análises																							

S.B. = Soma de Bases

m = Saturação de Alumínio

V = Saturação de Base

T = CTC a pH 7,0

t = CTC Efetiva

CONVERSÕES:

mg/dm³ = ppm

cmol c/dm³ = meq/100 cm³

g/dm³ = % x 10



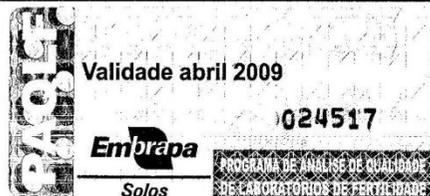
CENTRO DE ANÁLISES



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
 CAMPUS DR. LEONEL MIRANDA
 Rod. do Açúcar - km 5 Bairro: Penha
 Campos dos Goytacazes/RJ CEP: 28020-560
 Tel.: 022 733 0505 Fax: 022 723 1324

RESULTADOS DE ANÁLISES QUÍMICAS DE SOLOS																Data: 19/03/2009							
Interessado: JAIME VASCONCELOS																Solicitação: 035/2009							
Identificação		pH	P *	K *	Ca	Mg	Al	H+Al	Na	C	MO	S.B.	T	t	m	V	Fe	Cu	Zn	Mn	S	B	
Lab.	Int.	mg/dm ³			cmol _c /dm ³				%	g/dm ³	cmol _c /dm ³			%	mg/dm ³								
85	T-104	4,2	24	26	3,1	1,4	3,7	19,8	0,29	3,75	64,7	4,9	24,7	8,6	43	20							
fós - COLHEITA -																							
Cultura: Milho Feijão e Girassol												* Extrator Carolina do Norte											
Obs: O laboratório só se responsabiliza pelas análises laboratoriais																							
Local: Donana																							
																Eng. Agr. Dr. Mauri dos S. Manhães Responsável pelo laboratório							

S.B. = Soma de Bases
 T = CTC a pH 7,0
 t = CTC Efetiva
 m = Saturação de Alumínio
 V = Saturação de Base



CONVERSÕES
 mg/dm³ = ppm
 cmol_c/dm³ = meq/100 cm³
 g/dm³ = % x 10

E – Análise de Variância:

Fonte de variação	Altura 60 DAP (cm.planta ⁻¹)	Perfilho 60 DAP (Planta ⁻¹)	Massa seca total 60 DAP (g.planta ⁻¹)	Massa seca total 120 DAP (g.planta ⁻¹)	Paniculas (Planta ⁻¹)	Peso100 Grãos (g)	Produção de Grãos (g.planta ⁻¹)	Biomassa total (incl. Grãos) (g.planta ⁻¹)
Bacteria	0,1544	0.6055	0,1263	0,2119	0,0186	0,7130	0,6225	0,4476
Dose de N	0,0000	0.0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2596	0,0000	0,0000
Variedade	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0001	0,6432	0,0000	0,0573
Bac x DoseN	0,2085	0,7055	0,4989	0,0012	0,6335	0,0759	0,7529	0,0092
Bac x Var	0,0957	0,8145	0,0444	0,0193	0,0202	0,1417	0,5618	0,0700
DoseN X Var	0,3068	0,6854	0,0205	0,6282	0,5733	0,6226	0,2609	0,5398
C.V	5,90	21,00	14,20	11,70	9,74	8,55	13,74	9,93

F - Análise de Nitrogênio dos Grãos:

Dose	Inoculação	N total Grãos	
		BRS TROPICAL	EPAGRI-109
30 kg de N	Ñ INOC	1,12 Aa	1,10 Aa
30 kg de N	AZOTOTAL	1,02 Aa	1,11 Aa
30 kg de N	ZAE94	1,12 Aa	0,93 Ab
30 kg de N	Sp245	1,12 Ab	0,99 Aa
30 kg de N	EP4-1L	1,07 Aa	1,09 Aa
30 kg de N	EP4-2J	1,03 Aa	1,04 Aa
60 kg de N	Ñ INOC	1,06 Aa	1,11 Aa
60 kg de N	AZOTOTAL	1,00 Aa	1,14 Aa
60 kg de N	ZAE94	1,08 Aa	1,10 Aa
60 kg de N	Sp245	1,12 Aa	1,15 Aa
60 kg de N	EP4-1L	1,09 Aa	1,12 Aa
60 kg de N	EP4-2J	1,13 Aa	1,05 Aa
90 kg de N	Ñ INOC	1,10 Aa	1,14 Aa
90 kg de N	AZOTOTAL	1,15 Ab	1,14 Aa
90 kg de N	ZAE94	1,08 Aa	1,11 Aa
90 kg de N	Sp245	1,12 Aa	1,08 Aa
90 kg de N	EP4-1L	1,12 Aa	1,09 Aa
90 kg de N	EP4-2J	1,12 Aa	1,14 Aa
120 kg de N	Ñ INOC	1,17 Aa	1,08 Aa
120 kg de N	AZOTOTAL	1,17 Aa	1,16 Aa
120 kg de N	ZAE94	1,20 Aa	1,22 Aa
120 kg de N	Sp245	1,17 Aa	1,12 Aa
120 kg de N	EP4-1L	1,19 Aa	1,17 Aa
120 kg de N	EP4-2J	1,19 Aa	1,24 Aa
C.V		7,50	

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.