

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO PARA  
PLANTAS FORRAGEIRAS**

**Rafael Goulart Machado**  
**Tese**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO PARA  
PLANTAS FORRAGEIRAS**

RAFAEL GOULART MACHADO  
Engenheiro Agrônomo (UFSC)  
Mestre em Ciência do Solo (UFRGS)

Tese de doutorado apresentada como um dos requisitos para obtenção do  
Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil  
Abril, 2015

### CIP - Catalogação na Publicação

MACHADO, RAFAEL GOULART  
SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO  
PARA PLANTAS FORRAGEIRAS / RAFAEL GOULART MACHADO. --  
2015.  
123 f.

Orientador: ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Rizóbio. 2. Azospirillum. 3. Fixação Biológica de Nitrogênio. 4. Leguminosas nativas. 5. Gramíneas anuais de estação quente. I. SÁ, ENILSON LUIZ SACCOL DE , orient. II. Título.

RAFAEL GOULART MACHADO

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO PARA  
PLANTAS FORRAGEIRAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

Prof. Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá

Aprovada em 17 de abril de 2015  
Homologada em 23 de julho de 2015

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo  
UFRGS

Prof. Pedro Alberto Selbach  
UFRGS

Prof. Benjamin Dias Osório Filho  
UERGS

*“Eu creio em mim mesmo. Creio nos que trabalham comigo, creio nos meus amigos e creio na minha família. Creio que Deus me emprestará tudo que necessito para triunfar, contanto que eu me esforce para alcançar com meios lícitos e honestos. Creio nas orações e nunca fecharei meus olhos para dormir, sem pedir antes a devida orientação a fim de ser paciente com os outros e tolerante com os que não acreditam no que eu acredito. Creio que o triunfo é resultado de esforço inteligente, que não depende da sorte, da magia, de amigos, companheiros duvidosos ou de meu chefe. Creio que tirarei da vida exatamente o que nela colocar. Serei cauteloso quando tratar os outros, como quero que eles sejam comigo. Não caluniarei aqueles que não gosto. Não diminuirei meu trabalho por ver que os outros o fazem. Prestarei o melhor serviço de que sou capaz, porque jurei a mim mesmo triunfar na vida, e sei que o triunfo é sempre resultado do esforço consciente e eficaz. Finalmente, perdoarei os que me ofendem, porque compreendo que às vezes ofendo os outros e necessito de perdão.”*

Mahatma Gandhi

Aos meus pais, Jorge Rigoberto e Fátima Machado.

À minha irmã, Raquel de Cássia.

À minha avó, Áurea da Silva Goulart.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades profissionais recebidas, pela saúde para desenvolver as funções a mim atribuídas e por ter colocado pessoas brilhantes em meu caminho. Foram estes fatores fundamentais que possibilitaram o desenvolvimento do presente trabalho. Agradeço a meus pais, Jorge Rigoberto Aguiar Machado e Teresinha de Fatima Goulart Machado, pelas orientações que condicionaram a formação de meu caráter, certamente não teria condições de tomar decisões adequadas e sábias, sem uma boa base familiar, principalmente ao longo da infância e da adolescência. Por não medirem esforços para me proporcionar as melhores condições e ferramentas que estavam a seu alcance.

Agradeço a meu orientador, Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá, pelas oportunidades concedidas ao longo de minha vida científica, pelas orientações, pela transmissão de seu valioso conhecimento ao longo de todos estes anos, pela amizade e conselhos, que muito contribuíram para minha formação profissional. Também agradeço ao professor Enilson pela compreensão e pela confiança em mim depositadas em momentos decisivos ao longo de minhas escolhas profissionais. Muito obrigado, meu inesquecível orientador.

Agradeço à UFRGS, especialmente aos docentes do Departamento de Solos, os quais me ofereceram sedimentos fundamentais para melhor compreender e desenvolver teorias e raciocínios acerca da Ciência do Solo. Foram seis anos de um valioso aprendizado ao longo do Mestrado e do Doutorado, à luz do conhecimento de professores extremamente qualificados.

Agradeço ao amigo Dr. Renan Costa Beber Vieira, pela amizade de longa data, pelas longas conversas, às vezes filosóficas, acerca da Ciência do Solo e da vida; pela acolhida em minha chegada a Porto Alegre, no ano de 2009. Como diríamos: “é Copa do Mundo, meu amigo”.

Agradeço aos amigos da Microbiologia do Solo, especialmente ao Dr. Marcos Roberto Dobler Stroschein e ao Dr. Leandro Hahn, pelos trabalhos em conjunto e por sempre agregarem sabedoria e muita qualidade aos trabalhos juntamente desenvolvidos. Agradeço ao amigo Dr. Benjamin Dias Osório Filho, pelas valiosas contribuições ao presente trabalho e a outros trabalhos

desenvolvidos anteriormente. Também agradeço às amigas Msc. Bruna Winck e MSc. Raquel Garibaldi Damasceno, pela amizade, pelas colaborações e pelo senso de equipe.

Agradeço aos pesquisadores da Epagri: Dr. João Passos, Dr. Murilo Dalla Costa e Dr. Gilberto Dalagnol, os quais contribuíram grandemente para a execução do presente trabalho.

Ao amigo e laboratorista Márcio Silveira pelo auxílio, principalmente nas atividades na Estação Experimental Agrônômica (EEA) de Eldorado do Sul. Quanto ao auxílio nos trabalhos de campo, também agradeço ao professor Dr. Renato Levien e aos funcionários da EEA Celso e Bode.

Agradeço aos bolsistas de iniciação científica, que acompanharam de perto os trabalhos por mim desenvolvidos ao longo de minha Pós-Graduação. Esta conquista também é fruto do trabalho e dedicação de todos eles, a citar: Suélen Oldra, Wilian Sant´Ana, Wilian Silva, Neemias da Silva Santos, André Schönhoffen e Vanessa Silva.

Agradeço à Emater e aos colegas da Emater, que sempre tiveram palavras e atitudes de apoio, para a finalização do presente trabalho, especialmente: Romeu Cezar Deon, Milton Rossetto, Jorge Buffon, Oriberto Adami, Claudio Dóro, Marcia Andretta Deon e Giovana Guerra.

Agradeço com carinho especial à Geiseana Pohlmann, que vem me apoiando e compreendendo esta etapa final, de conclusão da presente obra.

Agradeço especialmente a meus pais, que com sua fé, vêm religiosa e mensalmente comparecendo à Catedral de Passo Fundo, para realizar suas orações, fruto de uma promessa iniciada em 2009, concomitantemente com meus estudos e pesquisas de Pós-Graduação. Agradeço à minha irmã, Raquel de Cássia Goulart Machado, pela amizade e palavras positivas.

Finalmente, porém não menos importante, agradeço a todos os outros colegas, professores e amigos que aqui não foram citados, mas que passaram por meus 30 anos de caminhada e muito contribuíram para minha formação, meu desenvolvimento e minha melhor compreensão da vida. Muito obrigado meus amigos!



# SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO PARA PLANTAS FORRAGEIRAS<sup>1</sup>

Autor: Rafael Goulart Machado

Orientador: Prof. Enilson Luiz Saccol de Sá

## RESUMO

Bactérias promotoras de crescimento de plantas podem ser agentes importantes para a sustentabilidade econômica e ambiental de cultivos agrícolas, podendo ser inseridas em sistemas de sucessão/consorciação de pastagens nativas e cultivadas. Neste trabalho foram realizados estudos para se avaliar a capacidade de promoção de crescimento de plantas por rizóbios e bactérias associativas, quando inoculadas em pastagens nativas e cultivadas. Os objetivos do trabalho foram: estudar o efeito da inoculação de bactérias promotoras de crescimento em azevém; capim áries; capim sudão; milho; sorgo; trevo branco; isolar, autenticar, selecionar e caracterizar rizóbios das leguminosas nativas adesmia e serradela; avaliar a capacidade promotora de crescimento de gramíneas cultivadas dentre os rizóbios selecionados de adesmia e serradela, bem como caracterizar e agrupar estes rizóbios quanto à diversidade genotípica. Foram obtidos 148 rizóbios isolados de serradela, sendo os rizóbios UFRGS Om57, UFRGS Om59 e UFRGS Om148 os mais eficientes quanto à nodulação e fixação de N, bem como quanto ao incremento da massa seca da parte aérea de serradela. Com as inoculações dos isolados EEL46210 e EEL1010 em adesmia, foram observados incrementos de massa fresca total e comprimento da parte aérea, comparativamente ao tratamento Controle + N e as estirpes recomendadas SEMIA 3007, SEMIA 6437 e SEMIA 6438. Os isolados UFRGS Os57, UFRGS Os148, EEL46.210, SEMIA929 e SEMIA6437 estimulam aumento na massa seca radicular de capim sudão. Em milho, a estirpe SEMIA 929 aumenta a massa seca da parte aérea e radicular, sendo o Índice de Eficiência Relativa (IER%) de 150 %. Em sorgo, a inoculação com o isolado UFRGS Om57 produz IER (%) de 179% e com EEL46210 de 124%, mostrando que ambos podem ser recomendados para a produção de inoculantes para a cultivar BRS810 de sorgo. Os isolados UFRGS Os57, UFRGS Os59, UFRGS Os148 e EEL 46.210, bem como as estirpes SEMIA905 e SEMIA929 pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* sp., enquanto a estirpe SEMIA6437 pertence ao gênero *Rhizobium* sp. Observando-se a similaridade dos fragmentos da região 16S DNAr, infere-se que os isolados EEL 46210, UFRGS Os57, UFRGS Os59 e UFRGS Os148 diferem genotipicamente entre si, bem como também diferem das estirpes SEMIA 905, SEMIA 929 e SEMIA 6437. Nos estudos à campo se observa estímulos na massa seca da parte aérea de milho inoculado com SEMIA222, VP16 e *A. brasilense*, após cultivo de azevém e trevo branco. Em trevo branco, também se observa estímulos na massa seca da parte aérea com a inoculação de *A. brasilense*, VP16 e SEMIA222. Os rizóbios VP16 e SEMIA 222, bem como a mistura de *A. brasilense* (Abv5 e Abv6) são indicados como promotores de crescimento de milho cultivar BRS1501.

<sup>1</sup> Tese de doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (107 p.) Abril, 2015. Trabalho realizado com apoio financeiro da CAPES e do CNPq.

# SELECTION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA FOR FORAGES<sup>1</sup>

Author: Rafael Goulart Machado

Orientador: Prof. Enilson Luiz Saccol de Sá

## ABSTRACT

Plant growth promoting bacteria can be important agents for economic and environmental sustainability of agricultural crops and may be inserted in succession systems of native and cultivated pastures. This work carried out studies to evaluate the growth-promoting ability of plants by rhizobia and associative bacteria when inoculated in native and cultivated pastures. The objectives were to study the effect of inoculation of plant growth promotion rhizobacteria in ryegrass, aries grass, sudan grass, millet, sorghum and white clover; isolate, authenticate, select and characterize the rhizobia adesmia and serradella native legumes; evaluate the growth promoting capacity of cultivated grasses among the rhizobia selected ademia and serradella and to characterize and group these rhizobia on the genotypic diversity. It was obtained 148 rhizobia isolated from root nodules of serradella. The rhizobia UFRGS Om57, UFRGS Om59 and UFRGS Om148 were the most efficient in nodulation and nitrogen fixation, as well as the increase of the dry mass of shoots serradella. With inoculations of EEL46210 and EEL1010 isolated on adesmia, were observed increments of total fresh mass and shoot length, compared to treatment Control + N and the recommended strains SEMIA 3007, SEMIA 6437 and SEMIA 6438. Thr rhizobia Isolates UFRGS Os57, UFRGS Os148, EEL46210, SEMIA929 and SEMIA6437 increased root biomass Sudan grass. In millet, the SEMIA 929 strain increases dry matter of shoot and root biomass, and the Relative Efficiency Ratio (RER%) there was greater than 150%. With the inoculation of the sorghum with UFRGS Om57, there was observed an RER (%) of 179%, whereas with isolated EEL46210 was found RER (%) of 124%. Both bacteria (UFRGS Om57 and EEL.46210) there are recommended for inoculant composition for cultivating sorghum BRS810. Isolated UFRGS Os57, UFRGS Os59, UFRGS Os148 and EEL 46,210, and SEMIA905 and SEMIA929 strains belong to the genus *Bradyrhizobium* sp., while SEMIA6437 strain belongs to the genus *Rhizobium* sp. With the similarity of 16S rDNA fragments there was inferred that the isolates EEL 46210, UFRGS Os57, UFRGS Os59 and UFRGS Os148 differ genotypically each other, and also differ from SEMIA 905, SEMIA 929 and SEMIA 6437. Studies carried on at field condition showed stimuli in the dry weight of shoots of millet inoculated with SEMIA222, VP16 and *A. brasilense*, after grass crop and white clover. In white clover plants, it was also observed stimuli in shoot dry mass by inoculation of *A. brasiliense*, VP16 and SEMIA222 compared to control treatments. The VP16 and SEMIA 222 rhizobia, and the mixture of *A. brasilense* are indicated as growth promoters bacteria of millet BRS1501.

---

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Soil Science. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (107 p.) April, 2015. Work performed with financial support from CAPES and CNPq.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
2.1 A importância das pastagens na alimentação de bovinos e a inserção das bactérias promotoras de crescimento de plantas nestes sistemas .....	5
2.1.1 O milho e suas características como forrageira .....	6
2.1.2 O sorgo e suas características como forrageira .....	7
2.1.3 O capim-sudão e suas características como forrageira .....	7
2.1.4. O capim áries e suas características como forrageira .....	8
2.1.5. O azevém e suas características como forrageira .....	8
2.1.6. O trevo branco e suas características como forrageira .....	9
2.2. As leguminosas nativas avaliadas no presente estudo .....	10
2.2.1. A adesmia ( <i>Adesmia latifolia</i> ) e sua utilização como pastagem ....	10
2.2.2. A serradela ( <i>Ornithopus micranthus</i> ) e sua utilização como pastagem .....	11
2.3. A importância do estudo das interações entre os microorganismos e as plantas cultivadas .....	13
2.3.1. O uso de bactérias do gênero <i>Azospirillum</i> como promotores de crescimento de plantas .....	15
2.3.2. Os rizóbios e a simbiose com leguminosas .....	15
2.3.3. A interação entre rizóbios e gramíneas.....	17
2.4. Referências Bibliográficas .....	18
<b>3. CAPÍTULO I – ISOLAMENTO, AUTENTICAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE SERRADELA (<i>Ornithopus micranthus</i>) .....</b>	<b>25</b>
3.1 Introdução .....	25
3.2 Material e Métodos .....	27
3.2.1 Maceração dos nódulos e obtenção de isolados .....	28
3.2.2 Identificação Morfológica dos isolados .....	29
3.2.3 Experimento de autenticação e seleção inicial em tubos .....	29
3.2.4 Avaliação da eficiência simbiótica dos rizóbios em plantas de serradela cultivadas em casa de vegetação .....	30

3.3 Resultados e Discussão .....	31
3.4 Conclusões .....	42
3.5 Referências Bibliográficas .....	42
<b>4. CAPÍTULO II – ISOLAMENTO, AUTENTICAÇÃO E SELEÇÃO INICIAL DE ISOLADOS DE ADESMIA (<i>Adesmia latifolia</i>) .....</b>	<b>44</b>
4.1 Introdução .....	45
4.2 Material e Métodos .....	46
4.2.1 Maceração dos nódulos e obtenção de isolados .....	47
4.2.2 Identificação Morfológica dos isolados .....	47
4.2.3 Experimento de autenticação e seleção inicial em tubos .....	48
4.3 Resultados e Discussão .....	49
4.4 Conclusões .....	55
4.5 Referências Bibliográficas .....	55
<b>5. CAPÍTULO III – RIZÓBIOS SIMBIONTES DE ADESMIA (<i>Adesmia latifolia</i>) E SERRADELA (<i>Ornithopus micrantus</i>) COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE CAPIM SUDÃO (<i>Shorghum sudanense</i>), MILHETO (<i>Pennisetum glaucum</i>), CAPIM ÁRIES (<i>Panicum maximum</i> cv. Áries) E SORGO (<i>Sorghum bicolor</i>) .....</b>	<b>56</b>
5.1 Introdução .....	57
5.2 Material e Métodos .....	58
5.2.1 Extração do DNAr 16S .....	61
5.2.2 Sequenciamento da região 16S do DNAr dos rizóbios de interesse .....	62
5.3 Resultados e Discussão .....	62
5.4 Conclusões .....	69
5.5 Referências Bibliográficas .....	70
<b>6. CAPÍTULO IV - RENDIMENTO À CAMPO DE PLANTAS DE MILHETO, AZEVÉM E TREVO-BRANCO INOCULADAS COM RIZÓBIOS E <i>Azospirillum</i> PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS .....</b>	<b>73</b>
6.1 Introdução .....	74

6.2 Material e Métodos .....	76
6.3 Resultados e Discussão .....	81
6.3.1 Resultados observados em milho .....	81
6.3.2 Resultados observados em azevém, trevo branco e consórcio .....	84
6.4 Conclusões .....	90
6.5 Referências Bibliográficas .....	90
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>95</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b> Localidades e georreferenciamento das coletas efetuadas .....	27
<b>Tabela 3.2.</b> Massa fresca total (MFT), número de folhas, número de nódulos, comprimento da parte aérea (PA) e comprimento radicular (Raiz) de plantas de serradela ( <i>Ornithopus micranthus</i> ), inoculadas com rizóbios .....	34
<b>Tabela 3.3.</b> Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR), massa seca de nódulos (MSN), nitrogênio total na parte aérea (N Total), Índice de Eficiência Relativa, número de nódulos e número de primórdios de plantas de serradela, cultivadas em casa de vegetação. Médias de quatro repetições, com duas plantas por vaso .....	41
<b>Tabela 4.1.</b> Massa fresca total (MFT), número de folhas, número de nódulos, comprimento da parte aérea (PA) e comprimento radicular (Raiz) de plantas de adesmia( <i>Ademia latifolia</i> ), inoculadas com rizóbios, aos 35 dias após germinação .....	50
<b>Tabela 5.1.</b> Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e altura de plantas (A15d; A30d e A45d) de capim sudão inoculadas com rizóbios isolados de serradela e adesmia .....	63
<b>Tabela 5.2.</b> Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e altura de plantas (A15d; A30d e A45d) de milho inoculadas com rizóbios isolados de serradela e adesmia .....	64
<b>Tabela 5.3.</b> Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e altura de plantas (A15d; A30d e A45d) de capim áries inoculadas com rizóbios isolados de serradela e adesmia .....	65
<b>Tabela 5.4.</b> Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e altura de plantas (A15d; A30d e A45d) de sorgo forrageiro inoculadas com rizóbios isolados de serradela e adesmia .....	66

**Tabela 6.1.** Rendimento de plantas de milho, cultivadas em sucessão a azevém, trevo branco ou consórcio, inoculadas com diferentes organismos fixadores de N e promotores de crescimento de plantas. MSPA: massa seca da parte aérea; MS: massa seca ..... 87

**Tabela 6.2.** Rendimento de plantas de azevém e trevo branco cultivadas isoladamente ou em consórcio após milho, inoculadas com diferentes organismos fixadores de N e promotores de crescimento de plantas. Valores seguidos por mesma letra na coluna, não diferem entre si a 15% de significância. MS: Massa seca da parte aérea ..... 88

**Tabela 6.3.** Teores de N na folha em plantas de azevém e trevo branco e teor de N.ha<sup>-1</sup> encontrado em folhas de azevém e trevo branco nos diferentes tratamentos ..... 89

## RELAÇÃO DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Características dos isolados de serradela ( <i>Ornithopus micrantus</i> ) obtidos no presente estudo .....	32
<b>Figura 3.2.</b> Planta de serradela inoculada com rizóbio eficiente à esquerda e plântula não inoculada, à direita, aos 35 dias após emergência .....	34
<b>Figura 4.1.</b> Características dos isolados de <i>Adesmia latifolia</i> obtidos no presente estudo .....	49
<b>Figura 5.1.</b> Índice de eficiência relativa (IER %) dos rizóbios quanto ao incremento da massa seca total de capim sudão, milho e sorgo forrageiro .....	67
<b>Figura 5.2.</b> Dendrograma de similaridade de isolados e estirpes de rizóbios. Agrupamento obtido por UPGMA .....	69
<b>Figura 6.1.</b> Representação esquemática da distribuição dos tratamentos em suas respectivas parcelas, combinando os fatores cobertura de inverno; inoculação e adubação nitrogenada mineral .....	80



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A necessidade de se proteger os recursos naturais em sistemas de produção agrícola aliada à necessidade de manutenção de elevadas produtividades e redução dos custos de produção, exige a adoção de sistemas integrados para a gestão de nutrientes no solo. Parte importante na gestão da fertilidade dos solos, e do manejo da adição de nutrientes e insumos na lavoura, reside na utilização de inoculantes microbianos. Tais inoculantes possuem potencial para reduzir a necessidade dos cultivos em certos nutrientes como o nitrogênio, em gramíneas e leguminosas, e também promover o crescimento das plantas, aumentando a exploração de maior volume de solo, melhorando o aproveitamento dos nutrientes e a eficiência no uso de fertilizantes.

As pastagens nativas constituem a principal fonte de alimento para bovinos em sistemas de produção de carne e leite, principalmente devido ao baixo custo de produção e à facilidade no estabelecimento, devido ao hábito de crescimento ou à ressemeadura natural. Por outro lado, no intervalo entre o final do ciclo das pastagens de verão e o início da oferta de pastagens de inverno, há escassez na oferta de massa verde aos animais, havendo grandes dificuldades que acarretam perda de peso dos animais e redução na produtividade. Dentre as possibilidades existentes para se reduzir as perdas inerentes a esta janela conhecida como vazio outonal, a utilização de organismos promotores de crescimento de plantas (PCP's) pode ser uma das estratégias a serem adotadas para se reduzir as perdas, na medida em que os PCP's são conhecidos por promover incrementos no rendimento de plantas cultivadas, mesmo no início ou no final do ciclo das culturas.

Os rizóbios são amplamente conhecidos pela capacidade promotora de crescimento de plantas. Este conhecimento é devido a estudos que se iniciaram no final da década de 90, com trabalhos onde foi comprovada a colonização de plantas de arroz por rizóbios oriundos da associação simbiótica com leguminosas forrageiras que eram cultivadas anteriormente ao arroz

(Yanni et al., 1997; Bisws, 2000). Foi comprovado que os rizóbios penetram ao interior do tecido de gramíneas através de fissuras radiculares ou inserções de raízes secundárias, podendo migrar até as folhas (Reddy et al., 1997; Dobbelaere et al., 2003). Estas bactérias que colonizam raízes e folhas de gramíneas não fixam N<sub>2</sub> atmosférico em seu interior, mas são capazes de produzir uma ampla gama de substâncias fitoestimuladoras que estão diretamente associadas ao incremento no rendimento não só de arroz, mas de diversas gramíneas recomendadas para a composição de pastagens no estado do RS (Matiru & Dakora, 2004; Hahn, 2013; Machado et al., 2013). Desta forma, quando os rizóbios são inseridos em sistemas de cultivo de pastagens pelo emprego da prática de inoculação de plantas leguminosas, os benefícios ao rendimento das plantas são decorrentes da fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizada nos nódulos das leguminosas e também pela produção de substâncias fito-estimuladoras, as quais podem aumentar a produção de forragem de leguminosas e gramíneas.

À medida em que o uso de organismos PCP's torna mais sustentável a utilização de pastagens na alimentação de ruminantes, a utilização destes organismos por meio de inoculações periódicas passa a constituir uma importante ferramenta para a redução dos prejuízos associados ao intervalo de vazio forrageiro. Desta forma, viabiliza econômica e ambientalmente a utilização de sistemas de rotação e sucessão de pastagens para oferta de energia e proteínas aos bovinos. Neste sentido, a inclusão de leguminosas nas dietas dos animais passa a ser fundamental não só para uma maior oferta de proteínas, mas também para promover o rendimento das gramíneas exploradas em sistema de sucessão e/ou consórcio de culturas devido ao aporte de N na rizosfera.

Por outro lado, apesar da grande importância das leguminosas e dos rizóbios para a composição de pastagens, de acordo com SHELTON et al. (2005), no Brasil apenas em torno de 2% dos 130 milhões de hectares de pastagens cultivadas possuem alguma participação de leguminosas. Entre os principais motivos que acarretam a baixa utilização de leguminosas na composição de pastagens estão o desconhecimento por agricultores e técnicos dos hábitos de crescimento, comportamento e fisiologia das leguminosas; e da especificidade da simbiose em leguminosas forrageiras, bem como das

técnicas de inoculação inadequadas; a dificuldade de acesso a sementes ou outros materiais propagativos, seja devido aos elevados custos, seja devido a barreiras comerciais ou divulgação ineficiente; o estabelecimento inicial lento da maior parte das leguminosas cultivadas, o que muitas vezes desanima o agricultor, principalmente quando se associa ao manejo inadequado; e o desinteresse comercial na divulgação de espécies que suprimam a utilização de adubos minerais.

Neste sentido, se faz muito importante o estudo e a divulgação dos grandes benefícios relacionados ao cultivo de leguminosas forrageiras inoculadas com rizóbios infectivos e efetivos, estudo este que vem sendo efetuado principalmente por instituições públicas de ensino e pesquisa, as quais visam a geração de conhecimento científico útil e de qualidade, sem necessariamente visar o lucro imediato.

Se faz necessário o estudo do efeito da inoculação de rizóbios eficientes nas leguminosas e gramíneas forrageiras mais amplamente cultivadas nos estados do RS e SC e a comparação destes rizóbios com outros organismos PCP's, como os do gênero *Azospirillum* para que conheça o efeito das inoculações em cada espécie vegetal. Apenas com o estudo minucioso e a divulgação destas informações no meio científico, será possível que conclusões importantes relacionadas ao tema cheguem a técnicos de campo, e conseqüentemente sejam transmitidas aos agricultores.

Outra importante área de conhecimento com grande potencial para a alimentação de ruminantes é o estudo de leguminosas forrageiras nativas, as quais já são adaptadas às condições de clima e solo dos estados do RS e SC. Por serem capazes de se desenvolver em ambientes com diversos fatores limitantes como elevada acidez, baixa fertilidade e alta umidade, e por apresentarem excelente rendimento forrageiro, a adesmia (*Adesmia latifolia*) e a serradela (*Ornithopus micranthus*) são duas leguminosas nativas de grande importância e grande potencial forrageiro.

Deste modo, levanta-se a hipótese geral de que é possível selecionar rizóbios infectivos e efetivos na fixação biológica de nitrogênio em associação com as leguminosas nativas serradela e adesmia, bem como, estes fixadores simbióticos de nitrogênio são capazes de incrementar o crescimento de gramíneas forrageiras associáveis a estas leguminosas nativas.

Adicionalmente, sob condições de campo, rizobactérias comprovadamente eficientes na fixação biológica de nitrogênio atmosférico podem ser inseridas em sistemas de sucessão de pastagens, incrementando o rendimento das culturas.

Para isto, os objetivos gerais do presente estudo foram:

I) Isolamento, autenticação, seleção e caracterização de rizóbios infectivos e efetivos às leguminosas nativas adesmia e serradela;

II) Avaliação dos rizóbios mais promissores de adesmia e serradela quanto à capacidade promotora de crescimento de gramíneas cultivadas capim áries, capim sudão, milho e sorgo;

III) Estudo do efeito da inoculação de rizóbios eficientes em sistemas de sucessão e consórcio de azevém, trevo branco, e milho, bem como a comparação destes rizóbios com outros organismos PCP's.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A importância das pastagens na alimentação de bovinos e a inserção das bactérias promotoras de crescimento de plantas nestes sistemas

Em sistemas de produção eficientes, um bovino leiteiro consome entre 12 a 14% de seu peso vivo diariamente, dependendo da pastagem disponível, do estágio de desenvolvimento da planta e da capacidade de ingestão do animal (Macari et al., 2012). Devido aos custos envolvidos, a complementação da alimentação de bovinos leiteiros com alimentos concentrados (rações), justifica-se apenas quando os animais estiverem produzindo mais leite do que a capacidade suporte do pasto, a qual pode ser de até 13 litros de leite/animal/dia (Macari et al., 2012). Sabendo-se que a produtividade média do rebanho leiteiro do RS e SC situa-se respectivamente em 7,9 litros/vaca/dia e 7,1 litros/vaca/dia (Pesquisa da Pecuária Municipal, IBGE, 2013). Deste modo, apenas com a oferta de pastagem em qualidade e quantidade adequadas, é possível aumentar o potencial produtivo dos rebanhos leiteiros destes estados.

Na alimentação de bovinos de corte, a deficiência de pastagens também acarreta sérios prejuízos. Segundo Pasciullo et al., (2008), o vazio outonal conduz à perda de peso dos animais. Neste sentido, o investimento em tecnologias que otimizem a qualidade e a quantidade de pastagens ofertadas aos bovinos produtores de leite ou carne, podem reduzir os prejuízos decorrentes do déficit alimentar.

Para isto, rizobactérias que apresentem mecanismos de promoção de crescimento de plantas se inserem perfeitamente em sistemas de sucessão e/ou rotação de pastagens destinadas à alimentação de bovinos. De alguma forma estas rizobactérias devem ser capazes de antecipar, alongar, ou incrementar a oferta de pastagens aos animais, ou ainda reduzir os custos de produção sem prejuízos à quantidade de pastagens produzidas. Devido à especificidade existente entre plantas e bactérias promotoras de crescimento, se faz necessário o estudo da interação e do efeito da inoculação destes

organismos sobre o rendimento das plantas, a partir de um nível mais isolado (interação planta e bactéria em condições axênicas), até a condição de campo. Para isto, com o presente estudo foi verificado o efeito da inoculação de diferentes rizobactérias sobre o rendimento de serradela, adesmia, trevo branco, milho, capim áries, capim sudão, sorgo e azevém. Todas estas, são forrageiras cultivadas ou nativas, de grande importância para a alimentação de bovinos nos estados do RS e SC. Abaixo, segue uma breve revisão acerca das espécies forrageiras avaliadas no presente estudo.

### **2.1.1. O milho e suas características como forrageira**

O milho (*Pennisetum americanum*) é uma planta exótica, de origem africana, que produz forragem de alta qualidade em um tempo curto, sendo ótima para a alimentação de bovinos (SEAGRI, 2008). É amplamente recomendado nos estados do RS e SC para a composição de pastagens e silagens, de acordo com sua aptidão, sendo altamente resistente à seca (Fontanelli, 2012).

O milho é uma forrageira de clima tropical, anual, de hábito ereto, porte alto e bom perfilhamento. Desenvolve-se bem em solos arenosos e pouco compactados (Fribourg, 1995). Apresenta excelente valor nutritivo (até 24% de proteína bruta quando em pastejo), boa palatabilidade e digestibilidade em pastejo (60% a 78%), sendo atóxica aos animais em qualquer estágio vegetativo (Kichel & Miranda, 2000). Quanto ao potencial produtivo de forragem, pode alcançar até 60 toneladas de massa verde e 20 toneladas de matéria seca por hectare, quando cultivado no início da primavera (Kichel & Miranda, 2000). A altura do colmo pode superar 3,0 m, podendo atingir 1,5 m aos 50 dias após emergência (Fontanelli et al., 2012).

É uma planta que se adapta bem a vários tipos de solos, apresentando boa persistência em solo de baixa fertilidade e déficit hídrico, embora responda com ótimas produtividades em solo de média a boa fertilidade e adubação (Kichel & Miranda, 2000). O milho consorcia-se bem com várias leguminosas, especialmente feijão miúdo e lab-lab, o que determina o aumento do volume de massa verde e proteína da pastagem (Fontanelli et al., 2012).

### **2.1.2. O sorgo e suas características como forrageira**

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é uma gramínea anual de estação quente e crescimento cespitoso, adaptando-se bem a solos de moderada fertilidade e acidez corrigida (Fontanelli et al., 2012). É originário da África, embora algumas evidências indiquem que possa ter havido duas regiões de dispersão independentes: África e Índia (Andrade Junior, 2010). Adaptado a regiões quentes e secas, foi introduzido no Brasil no início do século XX, como substituto do milho em vários usos (Emygdio et al., 2013). Quanto à produção de grãos, na safra 2014/2015, a área cultivada com sorgo no Brasil foi de mais de 750 mil ha, perspectivando-se uma produção total de mais de 2.000.000 t (CONAB, 2015). No estado do Rio Grande do Sul (RS), a colheita de grãos de sorgo é estimada em apenas 39.000 t (CONAB, 2015).

Apesar de não ser muito utilizado no RS para a produção de grãos, o sorgo é reconhecido por ser uma boa alternativa para compor pastagens de verão voltadas à bovinocultura leiteira, devido ao rápido crescimento (atinge o ponto de pastejo aos 40 dias após emergência) e ao teor de PB. Para o pastejo, recomenda-se uma altura mínima de corte de 0,60 m, para se evitar problemas de intoxicação (Fontanelli et al., 2012).

Devido ao fato de a maioria das variedades comerciais serem híbridas, o cultivo do sorgo não possibilita a produção de sementes na propriedade rural. Esta característica é vista como desvantagem pela maioria dos agricultores, quando comparam o sorgo a outras espécies anuais, tais como o milheto.

A variedade BRS 810 utilizada no presente estudo é um híbrido recomendado para pastejo e fenação, resultante do cruzamento entre as espécies *Sorghum bicolor* e *Sorghum sudanense*. Esta variedade pode atingir até 3,7 m de altura, sendo recomendável o pastejo com 1,0 m de altura, ponto em que se obtém proteína bruta (PB) de 15 a 19% (EMBRAPA, 2009).

### **2.1.3. O capim-sudão e suas características como forrageira**

O capim-Sudão (*Sorghum sudanense*) é uma espécie forrageira originária do Sudão e do sul do Egito, adaptada a climas secos e quentes (Bogdan, 1977). Caracteriza-se pelo ciclo anual, hábito de crescimento ereto, atingindo até 3 m de altura e produzindo, de acordo com (Bogdan, 1977), até 40 t.ha<sup>-1</sup> de massa verde.

No ano de 2013 foi lançada pela Embrapa Pecuária Sul a variedade BRS Estribo, a qual apresentou muitas vantagens comparativamente às anteriores, dentre elas o registro oficial junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a garantia de qualidade e de pureza das sementes (Silveira et al., 2013).

O teor de proteína bruta foliar da variedade BRS Estribo é de 19,1%, com produção de massa de 13,6 t.ha<sup>-1</sup> (Silveira et al., 2013). Comparativamente a outras espécies anuais de verão, a BRS Estribo tem o ciclo mais longo que o milheto e, conseqüentemente, oferta de alimentação aos animais por mais tempo (Silveira et al., 2013). Diferentemente do sorgo, o capim sudão não apresenta o risco de toxidade aos animais.

#### **2.1.4. O capim áries e suas características como forrageira**

O capim áries (*Panicum maximum* Jacq.) é uma gramínea perene de ciclo cespitoso, propagado reprodutivamente via pequenas sementes, podendo atingir altura de até 1,5 m e apresenta grande capacidade de perfilhamento. O capim áries foi obtido no interior do estado de São Paulo e do Mato Grosso do Sul, através de cruzamentos artificiais entre linhagens africanas de centauro e aruana (Rodrigues et al., 2007). Em 2000 e 2001, este novo cultivar foi avaliado quanto à oferta de pastagem a bovinos, demonstrando capacidade de suporte, resistência ao pisoteio, potencial de rebrota, persistência, tolerância à seca e potencial de produção de sementes (Rodrigues et al., 2007).

Devido à alta palatabilidade, digestibilidade e teor de proteína bruta (10 a 15%) (Rodrigues et al., 2007), o capim áries vem sendo disseminado com grande aceitação em propriedades produtoras de leite do norte do Rio Grande do Sul, em substituição a outras pastagens perenes de verão, tais como a tifton e a giggs.

#### **2.1.5. O azevém e suas características como forrageira**

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma gramínea anual de inverno, de hábito de crescimento cespitoso, que pode atingir até 1,20 m de altura (Derpsch & Calegari, 1992). Provavelmente originário do norte da Itália (Spedding & Diekmahns, 1972), foi trazido ao Brasil por colonizadores italianos que chegaram ao RS (Araújo, 1978).



Por ter raízes superficiais, o azevém é sensível à seca e ao encharcamento, preferindo solos de textura média (Fontaneli et al., 2012). O desenvolvimento mais vigoroso ocorre nos climas temperados e temperados frios, quando o seu maior desenvolvimento é no final do inverno e início da primavera, podendo ser cultivado em todo o RS (Fontaneli, 1984). Por ser mais adaptado a áreas mais úmidas, o azevém se desenvolve melhor em áreas de baixada (Kissmann, 1997). Quanto ao rendimento, é uma excelente forrageira, produzindo até 25 toneladas de massa verde por hectare, de boa palatabilidade e bom valor nutritivo (Kissmann, 1997), o teor de proteína bruta avaliado por Pellegrini et al. (2010) chegou a 21,6%. De acordo com (Fontaneli et al., 2012), o azevém é a forragem de inverno que apresenta maior produção de massa verde, porém é tardia, pois o rendimento da forragem é mais elevado a partir de setembro.

#### **2.1.6. O trevo branco e suas características como forrageira**

O trevo branco é uma leguminosa que se pereniza por ressemeadura natural, apresentando crescimento prostrado e caule estolonífero (Fontaneli et al., 2009). Tem origem mediterrânea, sendo atualmente disseminado e adaptado a regiões que variam do Ártico até os sub-trópicos, desde que a umidade do solo seja suficiente para seu crescimento e desenvolvimento (Williams, 1987; Gimenez, 2004).

O trevo branco é pouco resistente ao déficit hídrico, sendo que em algumas regiões do RS, a espécie chega a desaparecer em períodos muito extensos de falta d'água (Paim & Riboldi, 1994). Desenvolve-se bem em solos neutros (pH superior a 6,0) e com elevado nível de matéria orgânica (Fontaneli et al., 2012). Por meio da associação simbiótica com rizóbios da espécie *Rhizobium leguminosarum*, o trevo branco tem capacidade de aportar nitrogênio (N) atmosférico ao solo, colaborando com a ciclagem de elementos e o aumento da fertilidade do solo. Assim como no manejo de outras leguminosas, com o trevo branco é essencial a utilização de rizóbios infectivos e eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio, sendo dispensável o uso de adubos nitrogenados minerais.

O trevo branco é bem aceito pelos animais em todas as estações do ano, sendo uma excelente fonte de proteína e tendo rendimento de forragem

de até 5,0 t MS ha<sup>-1</sup> (Santos et al., 2012). Recomenda-se o pastejo quando o trevo branco estiver com 0,20 a 0,30 m de altura, retirando-se os animais quando a o pasto atingir altura de 0,10 m (Santos et al., 2012). Adicionalmente é aconselhável fornecer o trevo-branco aos bovinos em consórcio com gramíneas, no qual a composição da dieta deva ter ao menos 60% de gramíneas, para evitar o timpanismo (Ball et al., 2007).

## **2.2. As leguminosas nativas avaliadas no presente estudo**

Entre as leguminosas nativas do sul do Brasil, destacam-se a adesmia (*Adesmia latifolia*) e a serradela (*Ornithopus sativus*). Comparativamente a outras leguminosas forrageiras, as nativas adesmia e serradela apresentam vantagens adaptativas, como a capacidade de crescer e se desenvolver em solos ácidos e de baixa fertilidade natural, serem adaptadas a terrenos úmidos, terem boa capacidade de produção de massa verde e alta capacidade de acúmulo de proteínas. Estas vantagens adaptativas fazem destas leguminosas nativas espécies importantes dentre as que ocorrem naturalmente nos campos do RS e SC, havendo um amplo espaço a se evoluir quanto à produção de sementes em escala comercial, divulgação das características agronômicas destas espécies, bem como quanto ao estudo e à seleção de rizóbios infectivos e efetivos na FBN a campo e à inserção destas espécies em sistemas de sucessão/consorciação de pastagens.

### **2.2.1. A adesmia (*Adesmia latifolia*) e sua utilização como pastagem**

A adesmia é de hábito de crescimento estolonífero, típica de áreas úmidas, desde beira de rios e banhados até campos úmidos pantanosos e raramente ocorre em campos secos. Floresce de outubro a janeiro, sendo a floração mais intensa em novembro.

Segundo Miotto e Leitão Filho (1993), várias espécies do gênero *Adesmia* são potencialmente boas forrageiras para as regiões de clima temperado. Composto por espécies nativas da América do Sul, o gênero *Adesmia* contém mais de 230 espécies e é amplamente distribuído em regiões áridas do Chile, Argentina, Bolívia, Peru, sul do Brasil e Uruguai (Burkart, 1952).

A introdução da adesmia em campo nativo foi testada por Menezes et al. (1999), os quais obtiveram entre 110 e 201 kg MS.ha<sup>-1</sup>. Neste sentido, se faz necessário a seleção de rizóbios eficientes que venham a otimizar a oferta do N atmosférico por meio da simbiose rizóbio-leguminosa, e assim possibilitar incrementos no rendimento da adesmia em condições de campo.

Em experimentos em casa de vegetação, tem sido observada superioridade quanto à produção de massa da parte aérea da espécie *Adesmia latifolia* comparativamente a outros gêneros. Esta espécie é destacada pela maior exuberância de folhas, acúmulo de biomassa aérea, teor de proteína bruta (21,6%) e fixação de nitrogênio (Scheffer-Basso et al., 2001). A espécie *A. latifolia* também se mostrou tolerante a diferentes doses de alumínio em experimento conduzido em laboratório, o que não foi observado com *A. tristis* (Scheffer-Basso et al., 2000). Esta tolerância está relacionada à adaptação da *A. latifolia* a solos ácidos, característicos do Rio Grande do Sul, e é um importante potencial a ser explorado.

As espécies *A. latifolia* e *A. tristis* são as mais estudadas, porém para ambas os estudos sobre seu potencial forrageiro ainda estão na fase preliminar, com poucos dados sobre desempenho no campo (Scheffer-Basso et al., 2005). Uma dificuldade encontrada no estabelecimento da *A. latifolia* é a concorrência com espécies espontâneas como o azevém, conforme descrito por Scheffer-Basso et al. (2002). Neste sentido, é de fundamental importância para a maior competitividade desta leguminosa nativa em sistemas de cultivo o isolamento, a seleção e a caracterização genética de rizóbios eficientes quanto à fixação biológica de nitrogênio (FBN). Rizóbios eficientes quanto à FBN em adesmia, além de proporcionar uma vantagem adaptativa à leguminosa com relação a outras espécies que venham a competir por nutrientes, resultarão em menores custos com fertilizantes nitrogenados minerais.

### **2.2.2. A serradela (*Ornithopus micrantus*) e sua utilização como pastagem**

Outra espécie nativa pertencente à família Fabaceae considerada promissora em sistemas agrícolas é a serradela (*Ornithopus micrantus*). A serradela é uma leguminosa anual de inverno, com caule prostrado e pubescente, podendo atingir até um metro de comprimento. As folhas são

sésseis, com 6 a 15 pares de folíolos (Derpsch & Calegari, 1992), tenras e palatáveis aos bovinos, podendo atingir teor de PB próximo a 20% no período vegetativo (Fernandes & Reis, 2001), com produção de massa seca (MS) até 3,0 t MS ha<sup>-1</sup> (Santos et al. 2012). Lloveras & Iglesias (1998) relatam que as serradelas não produzem timpanismo, comparativamente com outras leguminosas, não contem estrógenos que poderiam afetar as funções reprodutivas dos animais e ainda contem taninos condensados que protegem as proteínas, incrementando a absorção e a eficiência digestiva deste alimento quando ingerido pelos ruminantes. A época de semeadura da serradela estende-se de abril a maio (Santos et al., 2012), sendo a planta utilizada como cobertura de inverno em sucessão a culturas anuais, como o arroz.

Atualmente desenvolve-se na Austrália um programa de melhoramento genético de cultivares comerciais de serradela, o qual é reconhecido mundialmente e produz cultivares que são reconhecidas por sua qualidade forrageira e são amplamente disseminadas em cultivos comerciais na Austrália, bem como na América Latina (Ovalle et al., 2006). Os nódulos radiculares das serradelas cultivadas na Austrália são predominantemente colonizados por bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, as quais são capazes de sobreviver sob condições de temperaturas acima de 40 °C e condições de umidade extremamente baixas (Bowman et al., 1995), apesar da reconhecida aptidão do gênero em nodular serradela também em terrenos alagados.

Em 2012, Freixial & Barros relataram o comportamento da serradela em solos ácidos do estado de *New South Wales* (NSW), na costa leste da Austrália. Segundo os autores, poucas leguminosas sobreviviam ou cresciam sob as condições de acidez dos solos deste estado e como consequência, esses solos eram pouco férteis, apresentavam muito baixas produções e estavam num processo gradual de degradação. Após o manejo adequado e implantação de pastagens cultivadas, hoje existem cerca de 400.000 ha de pastagens naquele estado, incluindo a serradela. Segundo os autores, a serradela atuou como planta recuperadora daqueles solos degradados.

Neste sentido, para a composição de pastagens do RS, é promissora a possibilidade de consorciação da serradela com gramíneas anuais de inverno, como o azevém. Este consórcio já foi observado em algumas propriedades do

RS (Menezes et al.,1994), tendo a serradela reconhecida importância na adubação verde.

Além disso, esta leguminosa é resistente ao frio e à geada, apresenta boa adaptação aos solos de várzea e tolera teores de umidade elevados no solo. Produz mais de 2 t.ha<sup>-1</sup> de matéria seca e aporta ao solo mais de 60 Kg de N.ha<sup>-1</sup> (Jandrey, 2008), tem bom sistema radicular e excelente capacidade de nodulação, porém é de desenvolvimento inicial lento (Menezes et al., 2001; Santos et al., 2012).

Nutricionalmente, a serradela tem grande importância na composição de pastagens para oferta de proteína aos animais, também é reconhecida como planta de cobertura em sucessão ao arroz irrigado, porém para que haja eficiência na inserção da serradela em qualquer um destes sistemas, há a necessidade de juntamente com a leguminosa, inserir bactérias específicas e comprovadamente efetivas, capazes de efetuar uma boa nodulação e fixação de nitrogênio. Adicionalmente se faz necessário o estudo do comportamento destas bactérias na interação com as gramíneas associáveis às leguminosas de interesse, para se obter o máximo rendimento possível das bactérias aportadas nos sistemas de cultivo de pastagens propostos no presente estudo.

### **2.3. A importância do estudo das interações entre os microorganismos e as plantas cultivadas**

A população microbiana habitante da rizosfera consiste-se em uma ampla gama de organismos, que em conjunto interagem direta e indiretamente com as plantas cultivadas. Apenas com relação ao número de bactérias, estima-se que haja cerca de 2 bilhões de células por grama de solo (Gans et al., 2005). Estes microorganismos tornam-se interessantes à espécie humana, à medida em que interferem no rendimento das plantas cultivadas, por meio de diversos mecanismos.

Um microorganismo é considerado promotor de crescimento de planta quando é capaz de incrementar o rendimento das culturas de interesse. Para se medir esta capacidade, a interação de determinado microorganismo com alguma planta de interesse deve ser primeiramente avaliada em condições axênicas e em comparação com plantas testemunhas. É fundamental esta etapa inicial onde se estuda isoladamente a interação da planta com o

organismo, para assim, isolando a interação de outros fatores como o clima, o ambiente e outros macro ou microorganismos edáficos ou epiedáficos, se certificar que o efeito sobre o rendimento da planta de interesse é única e exclusivamente em decorrência do microorganismo inoculado. Sem este *screening* inicial sob condições axênicas, seria impossível se certificar e comprovar que o efeito positivo observado na planta estudada seja em decorrência do microorganismo de interesse.

Apenas depois de ter sido comprovado o efeito positivo do microorganismo sobre a planta, esta interação passa a ser testada sob condições de maior interferência, como ambientes de casa de vegetação, adubação, ou solo com população microbiana original de campo (solo não esterilizado). Nestas condições, será testada a resistência da interação a diversos fatores de interferência. A última fase do teste da eficiência do microorganismo é a campo, sob todas as condições naturais, de solo, clima e competição, e apenas microorganismos aprovados em todos os estágios anteriores devem ser testado a este nível.

Diversos são os mecanismos pelos quais os microorganismos agem sobre o rendimento das plantas, podendo atuar diretamente como através da produção de hormônios (Bashan & Holguin, 1997) ou do suprimento de nutrientes, como o nitrogênio (Taiz & Zieger, 2004), ou ainda indiretamente, pela supressão de patógenos (Harman et al., 2000). O mais conhecido dos mecanismos é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), onde bactérias simbióticas ou associativas conseguem capturar o nitrogênio atmosférico sob condições microaeróbicas e por meio da enzima nitrogenase, desmembrá-lo a formas assimiláveis pelas plantas. Outros mecanismos conhecidos são a produção de substâncias fitoestimuladoras, como hormônios do grupo das auxinas (Biswas et al., 2000), citocininas (Persello-Cartieaux et al., 2003) e giberelinas (Erum & Bano, 2008).

A constante seleção e verificação do efeito de bactérias promotoras de crescimento de plantas sobre espécies de interesse agrônomo se faz necessário para a indicação de organismos infectivos e eficientes na composição de inoculantes microbianos. Deste modo, por meio de inoculações periódicas é possível se alterar a diversidade das populações microbianas que interagem com as plantas na rizosfera, favorecendo a infecção das raízes por

microorganismos eficientes e selecionados. Com relação à cultura da soja, por exemplo, nos estados brasileiros produtores deste grão, a reinoculação da cultura induziu resultados positivos, comparativamente com as testemunhas não reinoculadas, sendo que em alguns experimentos, foram constatados incrementos de até 23% no rendimento e de até 25% no teor de N dos grãos (Hungria, 2001).

### **2.3.1. O uso de bactérias do gênero *Azospirillum* como promotores de crescimento de plantas**

As bactérias do gênero *Azospirillum* são reconhecidas por fixarem nitrogênio endofiticamente no tecido de gramíneas cultivadas. Receberam este reconhecimento mundialmente na década de 1970, em decorrência da descoberta deste mecanismo pela pesquisadora Dra. Johanna Döbereiner (Hungria, 2011). Atualmente existem no mercado produtos comerciais à base de *Azospirillum*, com bactérias selecionadas para o milho, o trigo (Hungria, 2011) e a cana de açúcar (Reis et al., 2009).

Além desta fixação endofítica em gramíneas, também podem atuar endofiticamente em outras famílias vegetais, como em diversas espécies de monocotiledôneas, incluindo a família Orchidaceae, além de dicotiledôneas herbáceas, arbustivas e arbóreas (Lange & Moreira, 2002). Quando não estão em associação com alguma espécie vegetal, estas bactérias sobrevivem em vida livre no solo, também podendo efetuar a fixação de N em vida livre (Hungria, 2011). Por este motivo são consideradas fixadoras de nitrogênio associativas facultativas (Baldani et al., 1997).

Outros mecanismos de PCP reconhecidamente efetuados por bactérias do gênero *Azospirillum*, são a produção de substâncias fitoestimuladoras, como o ácido indol-acético, o ácido giberélico, o ácido abscísico e o etileno (Perrig et al., 2007).

### **2.3.2. Os rizóbios e a simbiose com leguminosas**

Os primeiros estudos de avaliação de bactérias fixadoras de N no Brasil datam de 1920 (Silva, 1948). Nas décadas de 60 e 70 foi dada à FBN sua devida importância, com a adoção generalizada ao uso de rizóbios eficientes na cultura da soja. De acordo com Graham & Vance (2003), são fixadas

anualmente por leguminosas de importância agrícola em associação com rizóbios, de 44 a 66 milhões de toneladas de N, o que representa aproximadamente metade do N utilizado na agricultura. Este processo simbiótico tão importante é realizado por rizóbios, bactérias que recebem genericamente este nome por formarem nódulos em raízes de leguminosas. Quando não estão em associação com leguminosas, os rizóbios são bactérias de vida livre e hábito alimentar saprofítico.

A interação entre planta e bactéria começa quando a necessidade nutricional da planta é sinalizada aos rizóbios por meio de flavonóides exudados pelas raízes. Os flavonóides ativam os genes Nod dos rizóbios, que especificam a produção de um sinal simbiótico chamado fator Nod, excretado pelas bactérias. Os fatores Nod de diferentes espécies rizobianas contém diferentes substâncias químicas e variações na estrutura de suas cadeias (Mulder et al., 2005). A variação no montante e na estrutura dos fatores Nod produzidos pelas espécies de rizóbios é um fator chave que determina a sua gama de hospedeiros (Perret et al., 2000). Assim, o estabelecimento da simbiose leguminosa-rizóbio envolve uma troca de sinais: os sinais da leguminosa (flavonóides) ativam a produção de fatores Nod rizobianos (LCOs) (Mulder et al., 2005).

Anteriormente à formação dos nódulos, os rizóbios induzem por meio de sinalizações bioquímicas, o encurvamento dos pêlos radiculares (Câmara, 2014). Subsequentemente, as bactérias atuam na divisão celular nas células normalmente quiescentes do interior do córtex radicular, que induz a uma formação de um meristema nodular (González & Marketon, 2003). As bactérias retidas no pêlo radicular encurvado causam a formação de um cordão de infecção, um tubo de origem vegetal, que penetra as células radiculares enquanto as bactérias se proliferam em seu interior (González & Marketon, 2003). Conforme o nódulo se desenvolve, os processos de infecção se ramificam e penetram individualmente nos espaços intracelulares.

Na simbiose realizada com plantas da família Fabaceae, os rizóbios atuam em uma relação onde recebem carboidratos fotoassimilados pelas plantas e em troca, oferecem N (nitrogênio). O N é obtido pelo rizóbio simbiote, na forma de gás atmosférico ( $N_2$ ) por meio da enzima nitrogenase e transformado em  $NH_3$ . O complexo enzima nitrogenase é formado por duas



unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína) (Taiz & Zieger, 2004). Para isto, as trocas metabólicas entre rizóbio e planta ocorrem em estruturas denominadas nódulos, onde a enzima nitrogenase fica protegida do oxigênio atmosférico, devido à presença da heme proteína leg-hemoglobina, a qual está em altas concentrações em nódulos ativos, e se liga ao oxigênio.

### **2.3.3. A interação entre rizóbios e gramíneas**

Nas décadas de 90 e 2000, passou-se a identificar no âmbito científico que a interação entre rizóbios e gramíneas cultivadas não se limita apenas ao aporte de N residual proveniente da FBN em leguminosas. Especial destaque deve ser dado aos trabalhos de Noel et al., (1996); Webster et al., (1997); Yanni et al., (1997) e Antoun, (1998), os quais estiveram entre os precursores no estudo da inoculação de rizóbios em não leguminosas cultivadas.

Os primeiros estudos de rizóbios como promotores de crescimento de gramíneas foram motivados por constatações empíricas de que sob mesmas condições de clima, solo, adubação e manejo, determinadas plantas de arroz, cultivadas em sucessão ao trevo produziam mais que outras que não estavam em sucessão à leguminosa e este incremento na produção não parecia ser apenas em decorrência do N residual (Yanni et al., 2001).

Foi possível comprovar que rizóbios são capazes de penetrar no interior do tecido de gramíneas por meio de fissuras e inserções radiculares (Reddy et al., 1997; Webster et al., 1997; Yanni et al., 1997). No ambiente intraradicular, bem como na rizosfera, os rizóbios são capazes de produzir substâncias fito-estimuladoras como auxinas (Biswas et al., 2000; Erum & Bano, 2008), citocininas (Persello-Cartieaux et al., 2003) e giberelinas (Yanni et al., 2001; Erum & Bano, 2008), que vêm a favorecer diretamente o rendimento de espécies vegetais cultivadas.

Atualmente sabe-se que rizóbios atuam como promotores de crescimento de plantas em interações com plantas da família Poaceae, tais como o arroz (Yanni et al., 1997; Biswas et al., 2000; Osório Filho et al., 2014), a cevada (Miransari & Smith, 2009), o milho (Hahn et al., 2014), o capim Tanzânia e a pensacola (Machado et al., 2011). Deste modo, os rizóbios são capazes não só de fixar simbioticamente o nitrogênio atmosférico quando em

associação com leguminosas, mas também um grande potencial a ser explorado como promotores diretos de incrementos no rendimento de gramíneas compatíveis, quando devidamente inoculados em sistemas de sucessão/rotação de culturas.

#### **2.4. Referências Bibliográficas**

ANDRADE JUNIOR, E.R. **Caracterização e melhoramento de sorgo**. 2010. 15 p. Instituto Mato-Grossense do Algodão, Primavera do Leste, 2010.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effects on radishes (*Raphanus sativus* L.) **Plant and Soil**, The Hague, v. 204, p. 57-67, 1998.

ARAÚJO, A.A. **FORAGEIRAS PARA CEIFA CAPINEIRAS, FENAÇÃO E ENSILAGEM**. Porto Alegre: Sulina, 1978. 169p.

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

BALL, D.M.; HOVELAND, C.S. & LACEFIELD, G.D. **Southern forages**. 4. ed. Lawrenceville:IPNI, 2007. 322 p.

BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.

BISWAS, J. C. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, p. 880–886, 2000.

BOGDAN, A.V. **Tropical pasture and fodder plants: grasses and legumes**. London:Logman, 1977. 475p.

BOWMAN, A.D. et al. Field persistence of *Bradyrhizobium* s. (*Lupinus*) inoculant for serradela (*Ornithopus compressus* L.) **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v.35, . 357-365, 1995.

BURKART, A. **Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas**. Buenos Aires: ACME Agency. 1952. 596p.

CÂMARA, G.M.S. **Fixação biológica de nitrogênio em soja**. Piracicaba: IPNI. 2014. 9 p. (Informações Agrônômicas, 147).

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 2 - Safra 2014/15, n. 5**. Brasília: CONAB. 2015, 116 p.

DERPSCH, R. & CALEGARI, A. **Plantas para adubação verde de inverno**.

Londrina: IAPAR. 1992. 80 p. (IAPAR. Circular, 73).

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J. & OKON, Y. Plant growth-promotion effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, p. 107-143, 2003.

EMBRAPA. **Sorgo de corte e pastejo, híbrido BRS 810**. Sete Lagoas: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. 2009. 4 p.

EMYGDIO, B.M.; ROSA, A.P.S.A. & TEIXEIRA, M.C.C. **LVIII Reunião Técnica Anual de Milho e XLI Reunião Técnica Anual de sorgo: indicações técnicas para o cultivo de milho e sorgo no Rio Grande do Sul – Safras 2013/2014 e 2014/015**. Brasília: Embrapa, 2013. 124 p.

ERUM, E.; BANO, A. Variation in phytohormone production in *Rhizobium* strains at different altitudes of north areas of Pakistan. **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 10, p. 536-540, 2008.

FERNANDES, A. & REIS, A. **Serradela (*Ornithopus sativus*)**. Braga: Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. 2001. 2 p. (DRAEDM. Ficha Técnica, 96).

FONTANELI, R.S. Azevém anual. In: ENCONTRO DE INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA DO PLANALTO MÉDIO RIO-GRANDENSE, 1984, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 1984. p.139-150.

FONTANELI, R.S.; FONTANELI, R. S.; SANTOS. H.P. Leguminosas Perenes de Inverno. In: FONTANELI, R.S.; SANTOS, H.P. & FONTANELI R.S. **FORAGEIRAS PARA INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA-FLORESTA NA REGIÃO SUL-BRASILEIRA**. Passo Fundo: Embrapa, 2009. p. 263-276.

FONTANELI, R.S. et al. Gramíneas forrageiras anuais de inverno. In: FONTANELI, R.S.; SANTOS, H.P. & FONTANELI R.S. **FORAGEIRAS PARA INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA-FLORESTA NA REGIÃO SUL-BRASILEIRA**. Brasília: Embrapa, 2012. p.127-172.

FONTANELI, R.S.; FONTANELI, R.S. & SANTOS, H.P. Gramíneas forrageiras anuais de verão. In: FONTANELI, R.S.; SANTOS, H.P. & FONTANELI R.S. **FORAGEIRAS PARA INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA-FLORESTA NA REGIÃO SUL-BRASILEIRA**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 231-246.

FREIXIAL, R.M.C. & BARROS, J.F.C. **Pastagens**. Évora: Universidade de Évora, Escola de Ciências e Tecnologia, Departamento de Fitotecnia. 2012. 38 p.

FRIBOURG, H.A. Summer anual grasses. In: BARNES, R.F.; MILLER, D.A.; NELSON, C.J. **Forages: an introduction to grassland agricultura**. 15 ed. Ames: Iowa State University Press, 1995.v.1, p. 463-472.

GANS, J.; WOLINSKY, M & DUNBAR, J. Computational improvements reveal

great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, Washington DC, v. 309, p. 1387-1390, 2005.

GIMENEZ, F.H.S. **Características de diferentes genótipos de trevo branco (*Trifolium repens* L.) associadas à tolerância ao déficit hídrico**. 2004. 104 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

GONZÁLEZ, J. & MARKETON, M.M. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington DC, v. 67, p. 574 – 592, 2003.

GRAHAM, P.H. & VANCE, C.P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, Belmont, v. 131, p. 872-877, 2003.

HAHN, L. **Promoção de crescimento de plantas pela inoculação de rizóbios simbiotes em leguminosas e bactérias diazotróficas associativas**. 2013. 175 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

HAHN, L. et al. Growth promotion in maize with diazotrophic bacteria in succession with ryegrass and white clover. **American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science**, Dubai, v. 14, p. 11-16, 2014.

HARMAN, G.E. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T -22. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 377-393, 2000.

HUNGRIA, M; CAMPOS, R.J. & MENDES, I.C. **Fixação biológica. do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: EMBRAPA. 2001. 48 p. (EMBRAPA, Circular Técnica, 35).

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: EMBRAPA. 2011, 38 p. (EMBRAPA, Documentos 325).

**IBGE Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária. 2013, 100 p.

JANDREY, D.B. **Doses de nitrogênio em cobertura no arroz irrigado em sucessão a espécies de inverno**. 2008. 65p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KICHEL, A.N. & MIRANDA, C.H.B. **Uso do milheto como planta forrageira**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte. 2000. (EMBRAPA Gado de Corte. Publicações, n. 46). Acessado dia 16/02/2015, em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD46.html>.

KISSMANN, K.G. **Plantas Infestantes e Nocivas**. 2. ed., São Paulo: BASF, 1997.

LANGE, A. & MOREIRA, F.M.S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 26, p. 529-533, 2002.

LLOVERAS, J. & IGLESIAS, I. Accumulation of dry matter and evolution of nutritive value in serradella (*Ornithous sativus* Brot.). **Agronomy Journal**, Madison, v. 90, . 59-63, 1998.

MACARI, A. et al. **Curso bovinos de leite**. 2. ed. Porto Alegre: Emater/RS-ASCAR, 2012. 89 p.

MACHADO, R.G. **Promoção de crescimento em azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), capim Tanzânia (*Panicum maximum*) e pensacola (*Paspalum sauræ* (Parodi) Parodi) inoculados com rizóbios selecionados para cornichão (*Lotus* sp.)**. 2011. 58 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MACHADO, R.G. et al. Indoleacetic acid producing *Rhizobia* promote growth of Tanzania grass (*Panicum maximum*) and Pensacola grass (*Paspalum sauræ*). **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, 2013.

MATIRU, V.N.; DAKORA, F.D. Potencial use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. **African Journal of Biotechnology**. Nairobi, v. 3, p. 1-7, 2004.

MENEZES, V. G. et al. Serradela nativa: uma alternativa de inverno para as várzeas do sul do Brasil. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v. 47, p. 19-22, 1994.

MENEZES, F.P.; OLIVEIRA, J.C.P.; DUTRA, G.M. Efeito da altura e frequência de corte na produção de matéria seca de *Adesmia latifolia*. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 37, 1999, Porto Alegre.

MENEZES, V.G. et al. Semeadura direta de genótipos de arroz irrigado em sucessão a espécies de cobertura de inverno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 1107-1115, 2001.

MIOTTO, S.T.S.; LEITÃO FILHO, H.F. Leguminosae- Faboideae - Gênero *Adesmia* DC. **Boletim do Instituto de Biociências**, Porto Alegre, v. 53, p. 111-157, 1993.

- MIRANSARI, M. & SMITH, D. Rhizobial lipo-chitooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. **Biotechnology**, Faisalabad, v. 8, p. 270-275, 2009.
- MULDER, L. et al. Integration of signaling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 123, p. 207-218, 2005.
- NOEL, T. C.; SHENG, C.; YOST, C. K.; PHARIS, R. P.; HYNES, M. F. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, p. 279-283, 1996.
- OSÓRIO FILHO, B.D. et al. Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. **American-Eurasian Journal Agricultural and Environmental Science**, Dubai, v. 14, p. 707-718, 2014
- OVALLE, C.M.; ARREDONDO, S.S. & ROMERO Y.O. Serradela amarilla (*Ornithopus compressus*) y serradela rosada (*O. sativus*): dos nuevas especies Le leguminosas forrajeras anuales para la zona mediterránea de Chile. **Agricultura Técnica**, Santiago, v.66, p. 196-209, 2006.
- PAIM, N.R. & RIBOLDI, J. Duas novas cultivares de trevo-branco comparadas com outras disponíveis no Rio Grande do Sul, em associação com gramíneas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, p. 43 – 53, 1994.
- PASCIULLO, D.S.C. et al. Disponibilidade de matéria seca, composição química e consumo de forragem em pastagem de capim-elefante nas estações do ano. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, p. 904-910, 2008.
- PELLEGRINI et al. Produção e qualidade de azevém-anual submetido a adubação nitrogenada sob pastejo por cordeiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, p. 1894-1904, 2010.
- PERRET, X.; STAEHELIN, C; BROUGHTON, W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington DC, v. 64, p. 180-201, 2000.
- PERRIG, D. et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 75, p. 1143-1150, 2007.
- PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 26, p. 189-199, 2003.

REDDY, P.M. et al. Rhizobial communication with rice roots: induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. **Plant and Soil**, The Hague, v.194, p. 81-98, 1997.

REIS, V.M. et al. **Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366)**. Seropédica: EMBRAPA. 2009, 4 p. (EMBRAPA Circular Técnica 29).

RODRIGUES, R.C. et al. Participação da massa seca de folhas, bainhas e colmos, relação folha/colmo de cultivares de *Panicum maximum* Jacq. Submetidos a diferentes idades de corte. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo v. 64, p. 295-301, 2007.

SANTOS, H.P. et al. Leguminosas forrageiras anuais de inverno. In: FONTANELI, R.S.; SANTOS, H.P. & FONTANELI R.S. **Forrageiras para integração Lavoura-Pecuária-Floresta na região Sul-brasileira**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 305-320.

SCHEFFER-BASSO, S.M., et al. Crescimento de plântulas de *Adesmia* spp. submetidas a doses de alumínio em solução nutritiva. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 217-222, 2000.

SCHEFFER-BASSO, S.M. et al. Disponibilidade e valor nutritivo de forragem de leguminosas nativas (*Adesmia* DC.) e exóticas (*Lotus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, p. 975-982, 2001.

SCHEFFER-BASSO, S.M. et al. Comportamento de leguminosas (*Adesmia*, *Lotus*, *Trifolium*) em mistura com festuca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, p. 2197-2203, 2002.

SCHEFFER-BASSO, S.M.; VENDRUSCOLO, M.C.; CECCHETTI, D. Desempenho de leguminosas nativas (*Adesmia*) e exóticas (*Lotus*, *Trifolium*) em função do estágio fenológico no primeiro corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, p. 1871-1880, 2005.

SEAGRI **Milheto forrageiro: mais proteína para o rebanho**. Santana do Ipanema: Secretaria Executiva de Agricultura, Irrigação, Pesca e Abastecimento/Divisão de Pesquisa Agropecuária. SEAGRI/DIPAP. 2008. 4 p.

SHELTON, H.M.; FRANZEL, S.; PETERS, M. Adoption of tropical legume technology around the world: analysis of success. In: XX INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS: Grassland a global resource. Ireland, p.149-166, 2005.

- SILVA, J.G. Estudos sôbre a inoculação da soja. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 23, p. 365-378, 1948.
- SILVEIRA, M.; SANT´ANNA, D. & MONTARDO, D.P. **Capim-sudão BRS Estribo - Cultivar de capim-sudão para pastejo**. Bagé: EMBRAPA, Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sul-Brasileiros. 2013. 2 p.
- SPEDDING, C.R.W. & DIEKMAHNS, F.L. **Grasses and legumes in British agriculture**. Diekmahns Farnham Royal, Bucks: Commonwealth Agricultural Bureaux. 1972. 511 p.
- TAIZ, L. & ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3° ed., Porto Alegre: Artemed, 2004, 719 p.
- YANNI, Y.G. et al. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessments of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, The Hague, v. 194, p. 99-114, 1997.
- YANNI, Y.G. et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 28, n.9, p. 845-870, 2001.
- WEBSTER, G. et al. Interactions of rhizobia with rice and wheat. **Plant and Soil**, The Hague, v. 194, p. 115-122, 1997.
- WILLIAMS, W.M. Genetics and breeding. In. BAKER, M.J.; WILLIAMS, W.M. **White clover**. Wallingford: CABI, 1987. p. 343-419.



### **3 CAPÍTULO I - ISOLAMENTO, AUTENTICAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE SERRADELA (*Ornithopus micrantus*)**

#### **Resumo**

A serradela é uma leguminosa nativa da região Sul do Brasil e adaptada ao pastejo, tendo potencial para melhorar a dieta alimentar de bovinos. Existem poucos estudos da nodulação nesta leguminosa por bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose, neste sentido o objetivo do presente trabalho foi isolar, identificar, autenticar e selecionar rizóbios eficientes em associar-se à serradela nativa (*Ornithopus micrantus*) e aumentar o fornecimento de N fixado às plantas, reduzindo-se a necessidade de adubação mineral. Foram realizadas coletas de nódulos radiculares e raízes de serradela e amostras de solo rizosférico em sete municípios do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Com base em características morfológicas foram isoladas e identificadas colônias bacterianas em placas com meio de cultura levedura-manitol com indicador vermelho congo. Após, realizou-se o estudo de autenticação dos rizóbios isolados, por inoculação de plântulas de serradela *in vitro*, bem como a seleção inicial destas bactérias em relação à capacidade para promover o crescimento de plantas de serradela. Os rizóbios mais promissores foram avaliados após inoculação em plantas por um período de cultivo por 60 dias em casa de vegetação. Dentre as 148 culturas bacterianas caracterizadas morfo-fisiologicamente, 113 induziram a formação de nódulos em raízes de serradela e, destes, 32 isolados foram eficientes em incrementar a massa fresca das plantas sob condições *in vitro*. Os rizóbios UFRGS Om57, Om59 e Om148 formaram nódulos com maior massa seca e produziram aumentos na massa seca das plantas (parte aérea e radicular) e possibilitaram maior acúmulo de N na parte aérea das plantas.

#### **3.1 Introdução**

A serradela é uma planta pertencente à família Fabaceae, com reconhecida aptidão para o pastejo por ruminantes. Suas folhas são ricas em proteínas, as quais são importantes para balancear nutricionalmente as pastagens a serem ofertadas a ruminantes, reduzindo-se a necessidade de alimentos concentrados.

A serradela é adaptada a áreas de várzea, pois tolera elevados teores de umidade no solo, apresentando bom sistema radicular e excelente capacidade de nodulação em condições de inundação (Menezes et al., 2001), ocorrendo anteriormente à cultura de verão. Devido à sua capacidade de produzir massa verde em áreas de várzea, é utilizada em lavouras experimentais como planta de cobertura em sistemas de rotação de culturas após o cultivo do arroz irrigado. Também tem grande potencial para a

consorciação com azevém (Menezes et al.,1994). Recomenda-se fazer os cortes em coincidência com o período da floração, a partir do qual sua qualidade é drasticamente reduzida (Fernandes, 2001), sendo que estações úmidas permitem um segundo corte (Fernandes, 2001).

Outro benefício que a serradela oferece em sistemas de pastagens é a capacidade de estabelecer simbiose com rizóbios que realizam a fixação de nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) e a disponibilização deste nutriente essencial aos animais e a outras plantas que compõem o ecossistema das pastagens. Em estudo realizado por Jandrey em 2008, a serradela nativa, o cornichão (leguminosa forrageira cultivada) e o azevém foram avaliados como plantas de cobertura do solo no inverno. O rendimento de matéria seca da parte aérea da serradela foi de  $2,2 \text{ t ha}^{-1}$ , inferior ao obtido com o azevém, porém equivalente ao cornichão. Quanto ao nitrogênio (N) acumulado na parte aérea das plantas, foi observada uma média de  $63,1 \text{ Kg de N. ha}^{-1}$  na área conduzida com a serradela, valor também equivalente ao obtido com o cornichão e superior ao obtido com o azevém, o que evidencia a eficiência da fixação biológica de nitrogênio.

No caso de cultivo de gramíneas em sucessão à serradela, este teor de N encontrado na parte aérea da leguminosa, bem como o de N presente nos nódulos e raízes certamente favorecem as culturas sucessoras, durante o crescimento vegetativo. Outros possíveis benefícios do sistema de sucessão de culturas leguminosa/gramínea são a produção de fitohormônios e outras substâncias fitoestimuladoras pelos rizóbios simbiotes com as leguminosas que habitam a rizosfera das culturas que a sucedem.

Apesar do grande potencial da serradela como pastagem nativa no sul do Brasil, há poucos estudos de seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio para esta planta. Deste modo, é possível aumentar a eficiência desta cultura em fornecer nitrogênio fixado ao sistema solo-planta, bem como o aporte de massa verde em pastagens cultivadas com esta espécie nativa. Outra grande limitação para a expansão da serradela como espécie cultivada é a ausência de sementes em escala comercial, o que impossibilita a implantação desta leguminosas em sistemas de sucessão ou consorciação de pastagens no estado do Rio Grande do Sul (RS), apesar de sua excelente qualidade como forrageira.

O objetivo do presente trabalho foi isolar, autenticar, identificar, e selecionar rizóbios eficientes na fixação de nitrogênio em simbiose com serradela nativa (*Ornithopus micranthus*).

### 3.2 Material e Métodos

Foram coletadas amostras de solos e plantas de serradela (*Ornithopus micranthus*) de diversas localidades dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina com vistas à obtenção do maior número possível de isolados de rizóbios autóctones capazes de nodular estas espécies, conforme tabela 3.1. As coletas foram realizadas em áreas de pastagens com a presença das plantas de interesse. Quando isto não foi possível, foi realizada a coleta de solo rizosférico de outras leguminosas forrageiras nativas, como *Desmodium* spp., na tentativa de se obter rizóbios que possivelmente estivessem vivendo na rizosfera destas leguminosas.

Tabela 3.1: Localidades e georreferenciamento das coletas efetuadas.

Localidade	Latitude (S)	Longitude (O)	Altitude (m)
Cachoeirinha-RS	29°56'59,61''	51°07'10,34''	7
Correia Pinto-SC	27°38'35,60''	50°20'04,48''	855
Palmeira das Missões-RS	27°56'06,39''	53°15'50,09''	511
Passo Fundo-RS	28°15'17,90''	52°24'06,71''	669
Porto Alegre-RS	30°04'26,15''	51°08'04,71''	40
Santa Vitória do Palmar-RS	33°05'30,43''	53°04'23,41''	6
São Martinho da Serra-RS	29°34'19,24''	53°51'56,63''	176

As amostras de solo foram coletadas com pá de corte a uma profundidade de 0 a 15 cm, na região rizosférica das leguminosas de interesse. Além das amostras de solo, também coletaram-se plantas inteiras, com parte aérea e sistema radicular.

Em laboratório, as raízes foram sepradas e cuidadosamente lavadas em água corrente, para posterior destacamento dos nódulos. Os nódulos foram destacados, secos em papel toalha e acondicionados em frascos de vidro, com sílica e algodão para preservação.

Para a obtenção de nódulos a partir das amostras de solo, foi realizada a inoculação plântulas de serradela cultivadas em vasos com uma suspensão

dos solos amostrados. As sementes foram previamente escarificadas com lixa nº 100 por 1 minuto, desinfestadas por imersão das sementes em álcool (70%) por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 segundos e sete lavagens consecutivas com água destilada esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos, sendo em seguida armazenadas à temperatura ambiente (20 a 25 °C) por 24 horas para germinação.

As sementes pré-germinadas foram plantadas em vasos de *Leonard* (Vincent, 1970) com vermiculita e areia (2:1), com solução nutritiva Sarruge 25% (Sarruge, 1975) em casa de vegetação. A inoculação com as suspensão das amostras de solo foi realizada quando as plantas estavam com sete dias de emergência e com uma a três pares de folhas. A inoculação foi feita sob condições axênicas e com pipetador automático, adicionando-se 2 mL de solução de solo por vaso. Aos 45 dias após a inoculação, efetuou-se coleta das plantas, separando-se parte aérea de sistema radicular. Após lavagem das raízes, os nódulos obtidos em casa de vegetação foram destacados, secos em papel toalha e acondicionados em recipientes de vidro, com sílica e algodão.

### **3.2.1 Maceração dos nódulos e obtenção de isolados**

Os isolados foram reidratados em água destilada estéril por 24 h e mantidos no refrigerador para o dia seguinte. Após a reidratação, os nódulos foram macerados separadamente em tubo de ensaio estéril, com bastão de vidro esterilizado, em câmara de fluxo laminar. Com o auxílio de ponteiras estéreis em câmara de fluxo laminar, os caldo de nódulos macerados foram inoculados em meio de cultura sólido levedura-manitol com corante vermelho congo (LMV) (Vincent, 1970), utilizando-se o método da gota (Miles & Misra, 1988.) e do espalhamento (Buck & Cleverdon, 1960), separadamente.

As placas de petri contendo o meio LMV (Vincent, 1970) inoculado foram armazenadas em estufa a 28 °C. Foi realizada avaliação diária de cada uma das placas com o auxílio de uma lupa de mesa, à medida em que surgiam colônias com características morfológicas de rizóbios, estas eram imediatamente transferidas para outra placa, de modo a se obter colônias puras com morfologia persistente.

### **3.2.2 Identificação morfológica dos isolados**

Os rizóbios estudados foram selecionados em placas de petri, com meio de cultura levedura-manitol com vermelho congo (LMV) (Vincent, 1970), com base em características morfológicas típicas de colônias rizobianas. Os isolados foram caracterizados de acordo com características de tempo de crescimento, cor, altura de colônia, diâmetro de colônia, consistência da colônia e opacidade da colônia. Após a caracterização fenotípica, cada um dos rizóbios foi inoculado em três tubos de ensaio, contendo meio LMV (Vincent, 1970). Estes tubos inoculados foram armazenados na Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS.

### **3.2.3 Experimento de autenticação e seleção inicial em tubos**

Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de induzir a formação de nódulos em plantas de serradela. Para isto, foi realizado em laboratório experimento *in vitro*, utilizando-se tubos de ensaio de 30 mL, contendo uma tira de papel toalha e 15 mL de solução nutritiva Sarruge a 25% (Sarruge, 1975), esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Em cada tubo foi adicionada uma semente pré-germinada de serradela com o auxílio de uma pinça flambada e em câmara de fluxo laminar. Um dia após a emergência das plântulas, em câmara de fluxo foi inoculado individualmente em cada tubo 1 mL de caldo de cultura de cada um dos isolados. Após a inoculação os tubos foram tampados com buchas de algodão e mantidos em lampadário com 8 horas por dia e temperatura ambiente.

Para a produção dos caldos de cultura, os rizóbios foram inoculados em tubos de ensaio com rosca, contendo meio de cultura LM líquido (Vincent, 1970) e colocados em incubador orbital a 28 °C com agitação de 120 rpm por sete dias. No dia da inoculação, os caldos apresentavam uma concentração celular de  $10^8$  unidades formadoras de colônias por mL (ufc.mL<sup>-1</sup>), verificada em câmara de Neubauer (Moura et al., 1987). O experimento foi composto por 150 tratamentos e três repetições, sendo 148 tratamentos inoculados com os rizóbios estudados, e dois tratamentos controle não inoculados, um tratamento com adição de N mineral (Controle + N), que recebeu uma alíquota de 107 µl ml de solução de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (20 g L<sup>-1</sup>), equivalente a aplicação de 100 kg de N ha<sup>-1</sup>. O outro controle sem inoculação não recebeu a adição de N mineral

(Controle - N). Após um período de 35 dias, o experimento foi encerrado e as plantas coletadas, sendo quantificadas a massa fresca total das plantas, o número de folhas e de nódulos e o comprimento da parte aérea e da raiz.

#### **3.2.4 Avaliação da eficiência simbiótica dos rizóbios em plantas de serradela cultivadas em casa de vegetação**

Os rizóbios selecionados no estágio *in vitro* foram testados em casa de vegetação, em plantas cultivadas em vasos *Leonard* (Vincent, 1970), contendo uma mistura de vermiculita e areia na proporção de 2:1, na parte superior, e, na parte inferior, solução nutritiva (Sarruge, 1975).

As estirpes SEMIA 905 e SEMIA 929, liberadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produção de inoculantes para *Ornithopus sativus*, foram obtidas junto à Coleção de Culturas de Rizóbios da Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO).

As inoculações foram realizadas utilizando-se alíquotas de 2 mL de caldo de culturas, com cerca de  $10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>, de cada rizóbio estudado, crescidos em meio levedura-manitol por sete dias a 28°C, a 120 rpm. O experimento foi composto por dois tratamentos controle sem inoculação, um sem adição de nitrogênio e outro com adição de duas alíquotas de 5,4 ml da solução de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (20 g L<sup>-1</sup>), equivalente à adição de 250 kg de N ha<sup>-1</sup>. Os dez tratamentos inoculados foram compostos pelas inoculações dos isolados UFRGS Om4, UFRGS Om27, UFRGS Om57, UFRGS Om59, UFRGS Om62, UFRGS Om67, UFRGS Om82, UFRGS Om148, SEMIA 905 e SEMIA 929. Após quinze dias de desenvolvimento, foi realizado o desbaste das plantas, deixando-se três por vaso. Trabalhou-se com 4 repetições por tratamento e 60 dias de duração.

Ao final do período, a parte aérea foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel e submetida à secagem em estufa a 65°C, durante três dias. Uma vez seca, a parte aérea foi pesada, sendo em seguida moída para a determinação química do acúmulo de nitrogênio no tecido, segundo metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). Os nódulos foram destacados das raízes, contados e colocados em estufa a 65°C, para secagem e determinação da massa seca. Os dados obtidos foram submetidos à análise

de variância e teste de médias (Scott Knott, 5%), utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

O índice de eficiência relativa da fixação de Nitrogênio (EFR) dos isolados (Brockwellet al., 1966) foi calculado usando-se a fórmula abaixo:

$$\text{EFR} = ((N_{\text{total trat.}} - N_{\text{total T-N}}) / (N_{\text{total T+N}} - N_{\text{total T-N}})) \times 100$$

onde:

N total trat. = nitrogênio total da planta do tratamento inoculado

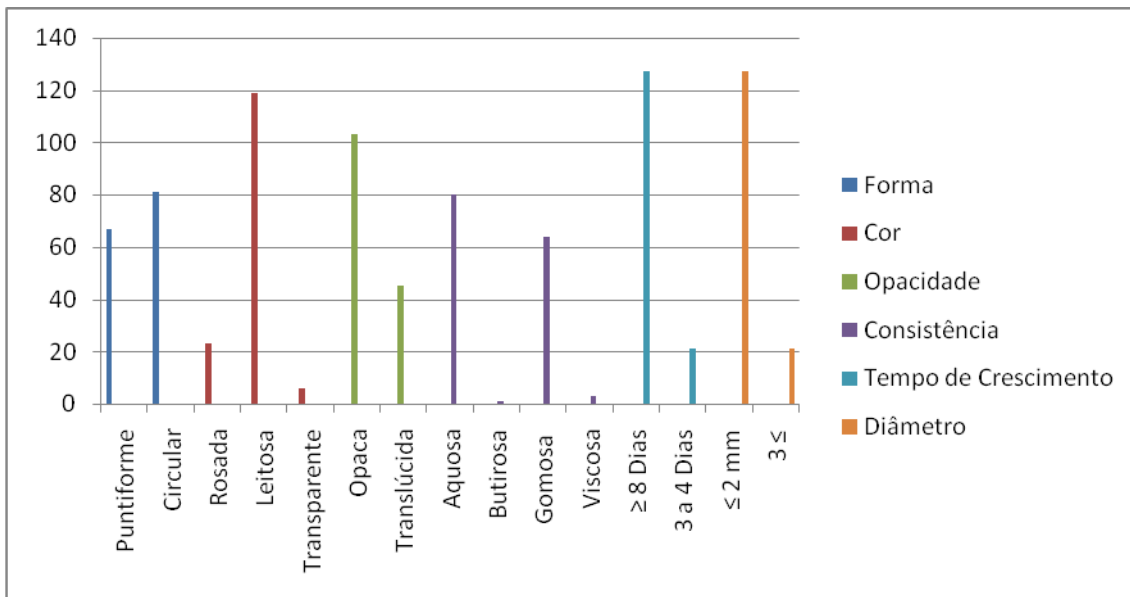
N total T-N = nitrogênio total do controle não inoculado e sem nitrogênio

N total T+N = nitrogênio total do controle não inoculado e que recebeu suplementação nitrogenada.

### 3.3 Resultados e Discussão

Com os estudos de coleta, identificação e isolamento, foram obtidos 148 isolados com características típicas de rizóbios. Na figura 3.1, são apresentadas as características dos isolados obtidos no presente estudo.

Além das características apresentadas na figura 3.1, todos os isolados de serradela obtidos no presente estudo apresentaram colônias côncavas e bordas regulares, típicas de rizóbios. As características de forma, cor, opacidade, consistência, tempo de crescimento e diâmetro são típicas de rizóbios, sendo que 127 isolados com colônias menores que 2 mm em oito a dez dias de crescimento têm características típicas de *Bradyrhizobium*, enquanto outros 21 isolados, com colônias maiores ou iguais a 3 mm aos três ou quatro dias de crescimento têm características típicas de *Mesorhizobium* (Figura 3.1, Apêndice 1).



**Figura 3.1.** Características dos isolados de serradela (*Ornithopus micrantus*) obtidos no presente estudo.

Os isolados obtidos em laboratório foram testados nos ensaios de autenticação quanto à capacidade de nodulação e efeito sobre as plantas e os resultados das inoculações *in vitro* são apresentados na Figura 3.2 e na Tabela 3.2. No tratamento Controle + N, foi observada média de massa fresca total (MFT) de 33 mg. Esta média ficou abaixo do esperado e não diferiu da massa fresca total do tratamento Controle – N (13 mg). Neste caso, devido às restrições impostas pelas condições *in vitro*, ao longo dos 35 dias de experimento, as plantas do tratamento Controle + N não conseguiram aproveitar suficientemente a dose de N equivalente a 100 Kg N.ha<sup>-1</sup>, não havendo efeito da adição de solução nitrogenada no Controle + N. Para futuros testes *in vitro*, sugere-se o uso de alíquotas maiores para o Controle + N, de modo a se explorar mais eficientemente o potencial fisiológico das plantas.

Dos 148 tratamentos inoculados, 113 foram capazes de nodular as plantas de serradela. A nodulação foi avaliada contando-se o número de nódulos formados por planta (NN). Destacaram-se os isolados obtidos das amostras de Santa Vitória do Palmar: UFRGS Om25; Om26 e Om94, com 12,3; 12,3 e 9,5 nódulos por planta, respectivamente. Os isolados com maior número de nódulos foram pouco eficientes quanto ao parâmetro de crescimento massa fresca total, enquanto que as maiores massas frescas totais foram obtidas em tratamentos com 3 a 5 nódulos por planta, ao final dos



35 dias de experimento. Estes resultados corroboram dados apresentados por Souza et al. (2008), os quais excluíram o número de nódulos da avaliação da fixação biológica do nitrogênio. Deste modo, o parâmetro número de nódulos é interessante no momento da autenticação de rizóbios, sobretudo no estudo de espécies que formem nódulos pequenos e de pouca massa, porém não indicado para se quantificar a eficiência desta nodulação.

Foram obtidos 32 tratamentos superiores aos tratamentos Controle quanto à massa fresca total. Destes, 29 são provenientes do município de Cachoeirinha, os outros três foram obtidos em coletas nos municípios Correia Pinto, Passo Fundo e Santa Vitória do Palmar (Tabela 3.2). Os melhores rendimentos foram observados nos tratamentos UFRGS Om9 e UFRGS Om62, que apresentaram alta massa fresca total, 0,167 e 0,190g, respectivamente. O tratamento UFRGS Om67 foi pouco inferior quanto à massa fresca total, porém superou os citados anteriormente quanto ao número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento radicular (CR). Em um terceiro nível de importância, porém ainda superiores aos tratamentos controle quanto à massa fresca total, número de folhas, comprimento da parte aérea e comprimento radicular, estão os tratamentos UFRGS Om4; Om57; Om59; Om60; Om82; Om143; Om146 e Om148.

Foram obtidos 16 isolados capazes de nodular as plantas de serradela, porém que induziram resultados de massa fresca total, número de folhas, comprimento da parte aérea e comprimento radicular iguais ou inferiores ao tratamento Controle - N. É indesejável que as plantas estudadas sejam infectadas por estas bactérias, pois esta interação não configura-se uma simbiose, à medida em que a planta não é beneficiada pela infecção e apesar disto gasta metabólitos fotoassimilados para manutenção dos nódulos ineficientes. Estes rizóbios são capazes de colonizar e nodular plantas de serradela, porém não contribuem para o seu rendimento, representando um custo fisiológico não justificável em termos de rendimento. Nestes casos, é recomendável excluir dos estudos estas bactérias noduladoras e promover a inoculação de leguminosas cultivadas com rizóbios infectivos e eficientes em fixar N atmosférico, para que estes rizóbios eficientes prevaleçam nos sítios de infecção e promovam os melhores rendimentos às plantas.



**Figura 3.2.** Planta de serradela inoculada com rizóbio eficiente à esquerda e plântula não inoculada, à direita, aos 35 dias após emergência.

**Tabela 3.2.** Massa fresca total (MFT), número de folhas, número de nódulos, comprimento da parte aérea (PA) e comprimento radicular (Raiz) de plantas de serradela (*Ornithopus micrantus*), inoculadas com rizóbios *in vitro*.

Tratamento	MFT (mg)	Número de Folhas	Número de Nódulos	PA (cm)	Raiz (cm)
Controle + N	33 d	20,3 b	0,0 e	7,6 b	9,3 b
UFRGS Om62	190 a	22,0 b	5,0 d	6,6 c	7,4 c
UFRGS Om9	167 a	18,0 c	3,0 d	4,1 c	4,9 d
UFRGS Om67	130 b	29,3 a	4,3 d	11,0 a	14,3 a
UFRGS Om59	117 c	26,0 a	6,0 c	8,4 a	9,6 b
UFRGS Om4	113 c	32,0 a	6,0 c	10,4 a	12,8 a
UFRGS Om57	110 c	26,3 a	6,0 c	9,5 a	11,5 a
UFRGS Om82	100 c	25,0 a	4,3 d	8,5 a	12,1 a
UFRGS Om148	100 c	29,3 a	6,0 c	9,3 a	11,9 a
UFRGS Om125	93 c	23,3 b	7,3 c	9,1 a	12,2 a
UFRGS Om142	93 c	22,7 b	3,0 d	10,0 a	11,9 a

UFRGS Om74	93 c	23,3 b	3,3 d	8,6 a	10,3 b
UFRGS Om60	90 c	25,0 a	4,3 d	8,5 a	11,4 a
UFRGS Om61	87 c	23,0 b	3,3 d	8,3 b	9,5 b
UFRGS Om58	83 c	22,3 b	5,3 d	7,4 b	11,2 b
UFRGS Om143	80 c	26,5 a	4,5 d	9,8 a	12,3 a
UFRGS Om68	80 c	24,0 b	4,7 d	7,6 b	6,3 c
UFRGS Om80	80 c	22,3 b	5,3 d	9,6 a	13,4 a
UFRGS Om141	77 c	21,3 b	3,3 d	6,8 b	13,5 a
UFRGS Om126	73 c	21,5 b	5,5 c	11,5 a	10,0 b
UFRGS Om146	73 c	26,3 a	4,3 d	9,6 a	11,6 a
UFRGS Om83	73 c	26,7 a	4,7 d	9,3 a	10,9 b
UFRGS Om12	70 c	33,0 a	4,0 d	8,2 b	10,8 b
UFRGS Om13	70 c	27,7 a	5,0 d	7,9 b	9,0 b
UFRGS Om81	70 c	19,0 b	4,0 d	8,3 b	11,2 b
UFRGS Om2	67 c	25,5 a	4,0 d	7,8 b	9,5 b
UFRGS Om25	67 c	25,7 a	12,3 a	7,2 b	11,6 a
UFRGS Om73	67 c	23,7 b	4,3 d	7,6 b	8,4 b
UFRGS Om69	67 c	22,7 b	3,7 d	7,2 b	7,3 c
UFRGS Om65	63 c	22,3 b	3,3 d	5,9 c	9,3 b
UFRGS Om124	63 c	23,3 b	3,3 d	8,9 a	11,0 b
UFRGS Om72	60 c	21,0 b	6,0 c	8,7 a	10,1 b
UFRGS Om5	60 c	25,3 a	3,3 d	7,6 b	8,9 b
UFRGS Om27	57 d	28,0 a	8,5 c	9,0 a	16,7 a
UFRGS Om64	57 d	17,0 c	4,0 d	5,3 c	8,0 c
UFRGS Om76	53 d	21,0 b	2,6 d	9,6 a	7,4 c
UFRGS Om18	53 d	26,0 a	4,0 d	7,4 b	8,0 c
UFRGS Om11	53 d	28,7 a	6,3 c	7,3 b	8,0 c
UFRGS Om134	53 d	16,3 c	4,3 d	7,9 b	6,5 c
UFRGS Om42	50 d	23,7 b	3,3 d	6,8 b	9,3 b
UFRGS Om24	50 d	19,7 b	8,0 c	4,4 c	7,1 c

UFRGS Om123	50 d	17,5 c	5,0 c	8,0 b	10,0 b
UFRGS Om45	50 d	24,3 b	5,7 c	7,2 b	9,9 b
UFRGS Om75	50 d	16,5 c	2,0 e	11,3 a	16,5 a
UFRGS Om20	50 d	23,0 b	5,3 d	9,2 a	9,8 b
UFRGS Om118	50 d	22,0 b	2,3 e	7,1 b	12,5 a
UFRGS Om6	50 d	24,7 a	3,7 d	7,5 b	8,1 c
UFRGS Om131	47 d	16,7 c	0,0 e	7,0 b	7,3 c
UFRGS Om111	47 d	15,0 c	0,0 e	6,1 b	10,6 b
UFRGS Om38	47 d	29,0 a	2,7 d	6,7 b	10,2 b
UFRGS Om138	47 d	21,0 b	3,0 d	6,9 b	6,5 c
UFRGS Om132	43 d	17,3 c	0,0 e	7,4 b	8,8 b
UFRGS Om17	43 d	27,3 a	4,7 d	7,9 b	8,8 b
UFRGS Om117	43 d	19,0 b	2,3 e	4,9 c	6,1 c
UFRGS Om147	43 d	25,0 a	3,0 d	6,1 b	13,8 a
UFRGS Om122	43 d	15,5 c	3,0 d	6,7 b	8,8 b
UFRGS Om116	40 d	17,3 c	1,0 e	7,2 b	10,5 b
UFRGS Om63	40 d	18,0 c	3,0 d	6,3 b	7,4 c
UFRGS Om19	40 d	24,0 b	5,0 d	5,5 c	11,6 a
UFRGS Om140	40 d	14,5 c	0,0 e	6,4 b	10,4 b
UFRGS Om94	40 d	22,7 b	12,3 a	10,1 a	14,0 a
UFRGS Om37	40 d	25,0 a	6,3 c	5,3 c	12,1 a
UFRGS Om56	40 d	19,0 b	3,3 d	6,7 b	7,6 c
UFRGS Om70	40 d	17,0 c	2,0 e	5,6 c	4,7 d
UFRGS Om133	37 d	18,3 c	3,7 d	7,1 b	10,8 b
UFRGS Om119	37 d	19,0 b	3,0 d	7,4 b	9,2 b
UFRGS Om84	37 d	20,3 b	4,0 d	7,2 b	6,7 c
UFRGS Om10	37 d	22,3 b	7,7 c	5,9 c	8,8 b
UFRGS Om14	37 d	21,0 b	3,5 d	6,6 b	7,4 c
UFRGS Om71	37 d	17,0 c	3,0 d	6,6 b	5,0 d
UFRGS Om135	37 d	12,0 c	2,0 e	5,7 c	5,3 d

UFRGS Om77	37 d	16,0 c	1,3 e	6,2 b	7,2 c
UFRGS Om79	37 d	22,3 b	5,0 d	7,6 b	7,6 c
UFRGS Om33	33 d	23,0 b	3,3 d	6,3 b	7,1 c
UFRGS Om3	33 d	20,3 b	6,7 c	4,4 c	8,0 c
UFRGS Om1	33 d	19,7 b	4,7 d	5,9 c	7,4 c
UFRGS Om21	33 d	20,5 b	3,0 d	7,2 b	5,7 d
UFRGS Om16	33 d	25,0 a	3,5 d	7,4 b	7,6 c
UFRGS Om40	33 d	18,5 c	0,0 e	5,9 c	6,0 c
UFRGS Om7	33 d	24,0 b	4,3 d	5,5 c	7,9 c
UFRGS Om129	33 d	12,3 c	0,0 e	7,2 b	4,6 d
UFRGS Om78	33 d	13,0 c	0,7 e	6,2 b	4,3 d
UFRGS Om87	30 d	26,0 a	3,7 d	9,3 a	9,9 b
UFRGS Om54	30 d	22,3 b	4,7 d	6,1 b	5,2 d
UFRGS Om110	30 d	18,0 c	3,7 d	4,5 c	9,2 b
UFRGS Om89	30 d	21,7 b	4,0 d	9,4 a	10,2 b
UFRGS Om97	30 d	18,0 c	5,7 c	7,7 b	10,5 b
UFRGS Om26	30 d	19,5 b	9,5 b	4,8 c	10,9 b
UFRGS Om127	27 d	15,7 c	1,7 e	6,4 b	8,3 b
UFRGS Om52	27 d	23,0 b	7,3 c	7,8 b	9,3 b
UFRGS Om22	27 d	14,7 c	4,0 d	5,1 c	5,0 d
UFRGS Om106	27 d	15,3 c	5,7 c	6,6 b	10,3 b
UFRGS Om36	27 d	16,3 c	0,0 e	3,9 c	7,6 c
UFRGS Om137	27 d	8,0 d	0,0 e	3,0 d	3,6 d
UFRGS Om86	27 d	24,3 b	3,0 d	9,6 a	11,5 a
UFRGS Om105	27 d	15,3 c	5,0 d	5,8 c	8,8 b
UFRGS Om23	27 d	19,5 b	6,7 c	4,8 c	5,5 d
UFRGS Om115	27 d	15,0 c	0,0 e	4,8 c	7,3 c
UFRGS Om34	27 d	15,7 c	0,0 e	4,9 c	7,8 c
UFRGS Om41	23 d	17,0 c	1,3 e	3,7 c	3,8 d
UFRGS Om47	23 d	15,7 c	2,0 e	3,4 d	3,1 d

UFRGS Om55	23 d	15,3 c	2,7 d	5,2 c	4,4 d
UFRGS Om90	23 d	19,7 b	6,7 c	8,2 b	10,4 b
UFRGS Om44	23 d	14,7 c	0,0 e	4,1 c	6,9 c
UFRGS Om46	23 d	16,7 c	4,3 d	4,0 c	4,8 d
UFRGS Om88	23 d	20,0 b	4,3 d	8,9 a	9,9 b
UFRGS Om112	23 d	13,3 c	0,7 e	4,1 c	5,5 d
UFRGS Om113	20 d	2,5 d	0,0 e	2,7 d	3,3 d
UFRGS Om43	20 d	16,0 c	0,0 e	3,9 c	8,4 b
UFRGS Om39	20 d	15,7 c	0,0 e	3,7 c	5,0 d
UFRGS Om103	20 d	12,0 c	0,0 e	4,5 c	7,8 c
UFRGS Om98	20 d	7,5 d	3,0 d	4,1 c	6,7 c
UFRGS Om85	20 d	15,7 c	3,0 d	6,5 c	6,0 c
UFRGS Om50	20 d	24,3 a	3,7 d	7,0 b	6,7 c
UFRGS Om15	20 d	16,7 c	3,3 d	4,8 c	5,0 d
UFRGS Om120	20 d	16,0 c	0,7 e	4,9 c	7,0 c
UFRGS Om99	20 d	12,0 c	0,0 e	7,1 b	9,3 b
UFRGS Om91	20 d	19,7 b	3,7 d	9,9 a	8,9 b
UFRGS Om130	20 d	6,0 d	0,0 e	2,0 d	4,0 d
UFRGS Om29	20 d	21,7 b	5,3 d	6,2 c	8,1 c
UFRGS Om128	17 d	16,3 c	2,0 e	7,5 b	4,9 d
UFRGS Om92	16 d	21,0 b	4,0 d	7,1 b	10,5 b
UFRGS Om93	16 d	16,3 c	3,7 d	6,7 b	10,0 b
UFRGS Om144	16 d	9,3 d	0,0 e	2,3 d	3,7 d
UFRGS Om114	16 d	14,3 c	1,0 e	4,2 c	2,8 d
UFRGS Om95	16 d	15,7 c	6,0 c	5,9 c	7,3 c
UFRGS Om51	16 d	17,0 c	0,0 e	5,3 c	7,8 c
UFRGS Om100	16 d	13,0 c	1,3 e	5,9 c	10,3 b
UFRGS Om28	16 d	17,3 c	7,0 c	5,1 c	10,3 b
UFRGS Om109	16 d	14,7 c	0,7 e	7,4 b	8,8 b
UFRGS Om8	16 d	16,0 c	4,0 d	4,8 c	5,9 c

UFRGS Om108	13 d	15,3 c	1,7 d	3,9 c	7,1 c
UFRGS Om139	13 d	7,3 d	0,0 e	3,7 c	5,7 d
UFRGS Om30	13 d	22,3 b	0,0 e	4,6 c	8,5, b
UFRGS Om96	13 d	14,3 c	1,7 e	5,1 c	7,1 c
UFRGS Om136	13 d	12,5 c	0,0 e	3,0 d	2,4 d
UFRGS Om101	10 d	8,0 d	0,0 e	2,0 d	3,1 d
UFRGS Om35	10 d	8,0 d	0,0 e	1,9 d	3,4 d
UFRGS Om53	10 d	8,0 d	0,0 e	1,9 d	3,8 d
UFRGS Om48	10 d	14,8 c	3,6 d	4,3 c	5,5 d
UFRGS Om104	10 d	12,7 c	0,0 e	5,8 c	7,5 c
UFRGS Om31	10 d	8,0 d	0,0 e	2,0 d	4,2 d
UFRGS Om107	10 d	6,3 d	0,0 e	1,7 d	3,0 d
UFRGS Om32	10 d	7,3 d	0,0 e	2,1 d	4,0 d
UFRGS Om145	7 d	8,0 d	0,0 e	1,3 d	2,7 d
UFRGS Om121	7 d	8,0 d	1,0 e	2,8 d	3,1 d
UFRGS Om102	7 d	6,7 d	0,0 e	1,2 d	2,7 d
UFRGS Om49	7 d	18,0 c	3,3 d	2,9 d	4,1 d
UFRGS Om66	0 d	11,5 d	3,0 d	3,9 c	7,5 c
Controle - N	13 d	11,0 d	0,0 e	3,7 c	7,2 c
CV (%)	61,53	17,84	51,59	27,95	28,87

Médias de três repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Os resultados produzidos por plantas de serradela cultivadas em vasos em casa de vegetação e inoculadas com os rizóbios estudados são apresentados na tabela 3.3. Observou-se maior massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca radicular (MSR) no tratamento não inoculado e que recebeu Nitrogênio (Controle + N) equivalente à aplicação de 250 kg N.ha<sup>-1</sup>. Com um rendimento inferior ao Controle + N estão os tratamentos UFRGS Om148, Om59 e Om57, os quais superaram o tratamento Controle – N e todos os outros tratamentos inoculados quanto à MSPA e MSR, inclusive as estirpes SEMIA 905 e SEMIA 929, atualmente licenciadas pelo MAPA (Ministério da

Agricultura, Pesca e Abastecimento) para produção de inoculantes para serradela.

Observou-se boa nodulação na maioria dos tratamentos inoculados, sendo que o número médio de nódulos por plantas variou entre 0,0 e 12,3. As plantas de maior massa seca de nódulos foram as inoculadas com os rizóbios UFRGS Om57, Om59 e Om148, e que também apresentaram maior massa seca de raiz, parte aérea e maior teor de nitrogênio total da parte aérea (N Total). Com isto infere-se que os rizóbios de maior massa de nódulos foram os mesmos que induziram maior massa de plantas. Foi verificado um grande número de nódulos (NN) e primórdios nodulares (NP), inclusive em tratamentos cujas massa seca da parte aérea, massa seca radicular e N Total foram equivalentes o Controle – N, portanto insatisfatórios. Isto indica que muitos dos nódulos contabilizados não fixaram N (nitrogênio) atmosférico e assim os custos fisiológicos destas nodulações não foram convertidos em aumento de rendimento das plantas. No caso do presente estudo, não foi observada relação entre o maior número de nódulos e o incremento de massa de planta ou N Total.

Apesar da menor massa fresca total dos tratamentos UFRGS Om57, Om59 e Om148 comparativamente ao Controle + N, observou-se que estes isolados equivaleram-se ao Controle + N quanto ao acúmulo de N foliar. Em condições de casa de vegetação, os tratamentos UFRGS Om57, Om59 e Om148 foram equivalentes ao tratamento controle que recebeu a dose de N equivalente a 250 kg.ha<sup>-1</sup>, o que representa a grande eficiência destes organismos em fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico em plantas de serradela, possibilitando a supressão da adubação nitrogenada mineral, sem prejuízo ao teor total do nutriente na folha.

O índice de eficiência relativa (IER%) Brockwell (1966) representa percentualmente o quão eficiente o organismo simbiote é em fixar o N atmosférico para a leguminosa em associação. Compara-se o teor de N obtido nas folhas de cada tratamento inoculado com os respectivos valores obtidos nas folhas dos tratamentos Controle + N e Controle - N. Em se tratando de associação simbiótica com espécies forrageiras para as quais existem menos estudos de eficiência de rizóbios comparativamente à soja, espera-se no mínimo um IER de 70%. No presente estudo, para os três isolados que se



destacaram, os valores de IER superaram 100%, valores bem acima da eficiência mínima esperada para se considerar o rizóbio promissor. Estes resultados foram superiores a outros encontrados na literatura, como no estudo da simbiose entre rizóbios em leguminosas forrageiras cultivadas (Frizzo, 2007).

As simbioses com os rizóbios UFRGS Om57, Om59 e Om148 foram eficientes quanto ao incremento do teor de N total nas folhas e promoveram aumentos de massa seca das plantas, mostrando-se superiores às estirpes da coleção SEMIA, sendo promissores para futuros estudos, com vistas a serem recomendadas para produção de inoculantes comerciais para serradela.

**Tabela 3.3.** Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR), massa seca de nódulos (MSN), nitrogênio total na parte aérea (N Total), Índice de Eficiência Relativa, número de nódulos (NN) e número de primórdios (NP) de plantas de serradela, cultivadas em casa de vegetação. Médias de quatro repetições, com duas plantas por vaso.

Tratamento	MSPA (mg)	MSR (mg)	MSN (mg)	N Total(mg)	IER (%)	NN*	NP*
Controle + N	1997 a	767 a	0 c	23,9 a	100,0	0 b	0 b
UFRGS Om148	1237 b	234 b	45 a	27,7 a	117,3	127 a	29 a
UFRGS Om59	1089 b	303 b	34 a	26,7 a	112,9	143 a	43 a
UFRGS Om57	967 b	188 b	32 a	24,9 a	104,5	132 a	39 a
SEMIA 929	654 c	125 c	0 c	6,0 c	19,3	0 b	0 b
UFRGS Om67	609 c	158 c	23 b	14,7 b	58,6	86 a	32 a
UFRGS Om62	570 c	190 b	22 b	13,7 b	53,7	115 a	44 a
UFRGS Om82	338 c	133 c	14 c	7,8 c	27,1	79 a	28 a
UFRGS Om27	240 c	95 c	14 c	3,5 c	7,7	116 a	25 a
UFRGS Om4	235 c	81 c	6 c	2,7 c	4,2	71 a	43 a
SEMIA 905	196 c	196 b	0 c	1,6 c	-0,6	0 b	0 b
Controle - N	205 c	97 c	0 c	1,8 c	0,00	0 b	0 b
CV (%)	61,01	36,07	62,13	56,96	-	44,73	28,6

Controle +N: tratamento não inoculado, dose de Nitrogênio (N) equivalente a 250kg N.ha<sup>-1</sup>; Controle -N: tratamento não inoculado, sem aplicação de N mineral; MSPA: massa seca da

parte aérea; MSR: massa seca radicular; MSN: massa seca de nódulos; N Total: Nitrogênio total da Parte Aérea; IER (%): Índice de Eficiência Relativa, proposto por Brockwell (1966); NN: número de nódulos; NP: número de primórdios nodulares.\* Dados de contagens, transformados, pela equação:  $(x + 1)^{0,5}$ .

### 3.4 Conclusões

Foram obtidos 148 isolados de serradela, dos quais 113 foram autenticados como formadores de nódulos de serradela.

Os isolados UFRGS Om57, UFRGS Om59 e UFRGRS Om148 foram selecionados do grupo de isolados, sendo os mais eficientes para incrementar a massa seca de plantas e acúmulo de nitrogênio nas folhas, superando as SEMIAs atualmente liberadas para a produção de inoculantes de serradela, sendo assim altamente recomendados para estudos à campo.

Os isolados mais eficientes têm características típicas de *Bradyrhizobium*.

### 3.5 Referências Bibliográficas

BROCKWELL, J.; HELY, F. W.; NEAL-SMITH, C. A. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**. Melbourne, v. 6, n. 23, p. 365-370, 1966

BUCK, J.D.; CLEVERDON, R.C. The spread plate as a method for the enumeration of marine bacteria. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 5, p. 78-80, 1960.

FERNANDES, A. **Serradela (*Ornithopus sativus*) - Ficha técnica 96**. Braga: Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 2001.

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 2000. 145 p.

FRIZZO, M.L.S. **Seleção e Caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr**. 2007. 68 p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

JANDREY, D.B. **Doses de nitrogênio em cobertura no arroz irrigado em sucessão a espécies de inverno**. 2008. 65p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MENEZES, V. G. et al. Serradela nativa: uma alternativa de inverno para as várzeas do sul do Brasil. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v. 47, p. 19-22, 1994.

MENEZES, V.G. et al. Semeadura direta de genótipos de arroz irrigado em sucessão a espécies de cobertura de inverno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 1107-1115, 2001.

MILES, A.A. & MISRA, A.A. The estimation of the bacterial power of blood. **Journal of Hygiene**, London, v. 3, p. 732-749, 1988.

MOURA, R.A. et al. 1987. **Técnicas de laboratório**. Atheneu, Rio de Janeiro.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phitopathologica**, Piracicaba, v. 1, p. 231-234, 1975.

SOUZA, R.A. et al. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica de nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.43, n.1, p.83-91, 2008.

TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, planta e outros materiais**. 2° ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174 p.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p.

## 4 CAPÍTULO II – ISOLAMENTO, AUTENTICAÇÃO E SELEÇÃO INICIAL DE ISOLADOS DE ADESMIA (*Adesmia latifolia*)

### Resumo

A adesmia (*Adesmia latifolia*) é uma leguminosa nativa da região sul do Brasil, que apresenta algumas características de crescimento e adaptação interessantes para o seu cultivo como espécie forrageira. Existem poucos estudos de isolamento e seleção de rizóbios efetivamente adaptados às condições edafo-climáticas do RS. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi isolar, identificar e autenticar rizóbios infectivos e eficientes quanto à fixação biológica de nitrogênio (FBN) em adesmia. Foram realizadas coletas de raízes noduladas de adesmia e amostras de solo rizosférico nos municípios de Correia Pinto-SC e Eldorado do Sul-RS. Com base em características morfo-fisiológicas foram isoladas e identificadas colônias com características rizobianas em placas com meio de cultura levedura-manitol e indicador vermelho congo. Também foram incluídas no estudo três estirpes recomendadas para adesmia (SEMIA 3007, SEMIA 6437 e SEMIA6438), bem como 50 isolados de *A. latifolia*, cedidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri-SC). A autenticação dos rizóbios, bem como a avaliação da nodulação e d promoção de crescimento em plantas de adesmia inoculadas com estas bactérias foram realizadas em estudo com plantas cultivadas em tubos. No isolamento em placa foram obtidos 17 isolados bacterianos de nódulos de adesmia semelhantes a rizóbios. No entanto, no experimento para autenticação, no qual foram estudados mais outros 50 isolados bacterianos e 3 estirpes, 61 isolados foram capazes de nodular adesmia e 38 foram capazes de incrementar a massa fresca das plantas. Os isolados EEL46210 e EEL1010 superaram o tratamento Controle + N e a estirpe recomendada de melhor desempenho, SEMIA6437 quanto aos parâmetros massa fresca total (MFT), número de folhas e comprimento da parte aérea (PA). Apesar de inferior aos melhores isolados do presente estudo, a estirpe SEMIA 6437 demonstrou ter mantido seus genes indutores de nodulação, bem como sua eficiência em nodular e promover o crescimento de adesmia, apresentando-se viável e eficiente para composição de inoculantes para adesmia. Por outro lado, as SEMIAS 3007 e 6438 foram ineficientes em incrementar satisfatoriamente o rendimento de adesmia. O tratamento não inoculado e que recebeu nitrogênio em dose equivalente a 100 kg N.ha<sup>-1</sup>(Controle + N) não expressou todo o potencial produtivo da planta em estudo.

#### 4.1 Introdução

Composto por espécies nativas da América do Sul, o gênero *Adesmia* contém mais de 230 espécies e é amplamente distribuído em regiões áridas do Chile, Argentina, Bolívia, Peru, sul do Brasil e Uruguai (Burkart, 1952). Atualmente são conhecidas 17 espécies deste gênero nativas do sul do Brasil (Scheffer-Basso et al., 2001).

Em experimentos conduzidos em casa de vegetação, tem sido observada superioridade da espécie *Adesmia latifolia* comparativamente a outros gêneros, sendo esta espécie destacada pela maior exuberância de folhas, acúmulo de biomassa aérea, teor de proteína bruta, hábito estolonífero e fixação de nitrogênio (Scheffer-Basso et al., 2001). A espécie *Adesmia latifolia* também foi tolerante a diferentes doses de alumínio em experimento conduzido em laboratório, o que não foi observado com *A. tristis* (Scheffer-Basso et al., 2000). Esta tolerância está relacionada à adaptação da *A. latifolia* a solos ácidos, característicos do Rio Grande do Sul, e é um importante potencial a ser explorado. Tendo estas características de produtividade e adaptabilidade desejáveis a uma espécie forrageira, a *A. latifolia* pode constituir uma importante alternativa para o suprimento proteico a bovinos leiteiros ou bovinos de corte.

Juntamente com a *A. tristis*, a *A. latifolia* está entre as mais estudadas, porém os estudos sobre seu potencial forrageiro ainda estão na fase preliminar, com poucos dados sobre desempenho no campo (Scheffer-Basso et al., 2005). Uma dificuldade encontrada no estabelecimento da *A. latifolia* é a concorrência com espécies espontâneas como o azevém, conforme descrito por Scheffer-Basso et al. (2002). Neste sentido, é de fundamental importância para a maior competitividade desta leguminosa nativa em sistemas de cultivo o isolamento, a seleção e a caracterização genética de rizóbios eficientes quanto à fixação biológica de nitrogênio (FBN). Rizóbios eficientes quanto à FBN em *Adesmia*, além de proporcionar uma vantagem adaptativa à leguminosa com relação a outras espécies que venham a competir por nutrientes, resultarão em menores custos com fertilizantes nitrogenados minerais.

No presente estudo o objetivo foi autenticar isolados previamente obtidos de nódulos e rizosfera de *A. latifolia*, bem como estudar em condições

*in vitro* a capacidade destes isolados em estimular o crescimento de plântulas comparativamente a tratamentos controle e estirpes atualmente recomendadas para a espécie.

## 4.2 Material e Métodos

Foram coletadas amostras de solo rizosférico e de plantas de *Adesmia* (*Adesmia latifolia*) em localidade situada no município de Correia Pinto-SC e Eldorado do Sul-RS. Quando não se verificava a presença de plantas de *Adesmia*, foi realizada a coleta de solo rizosférico de outras leguminosas forrageiras nativas, como *Desmodium* spp., na tentativa de se obter rizóbios que possivelmente estivessem vivendo na rizosfera destas leguminosas. O georeferenciamento dos locais de coleta é o seguinte: Correia Pinto-SC (Latitude: 27°38'35,60'', Longitude: 50°20'04,48'' e Altitude de 855 m acima do nível do mar); Eldorado do Sul-RS: (Latitude: 30°05'20,77'', Longitude: 51°41'16,83'' e Altitude de 37 m acima do nível do mar).

As amostras de solo foram coletadas com pá de corte a profundidade de 0 a 15 cm, na região rizosférica das leguminosas de interesse. Além das amostras de solo, também coletaram-se plantas inteiras, com parte aérea e sistema radicular.

Em laboratório, as raízes foram separadas e cuidadosamente lavadas em água corrente, para posterior destacamento dos nódulos. Os nódulos foram destacados, secos em papel toalha e acondicionados em frascos de vidro, com sílica e algodão para preservação.

Para a obtenção de nódulos a partir das amostras de solo, foi realizada a inoculação plântulas de *Adesmia* cultivadas em vasos com uma suspensão dos solos amostrados. As sementes foram previamente escarificadas com lixa n° 100 por 1 minuto, desinfestadas por imersão das sementes em álcool (70%) por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 segundos e sete lavagens consecutivas com água destilada esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos, sendo em seguida armazenadas à temperatura ambiente (20 a 25 °C) por 24 horas para germinação.

As sementes pré-germinadas foram semeadas em vasos de *Leonard* (Vincent, 1970) com vermiculita e areia (2:1), com solução nutritiva Sarruge 25% (Sarruge, 1975), em casa de vegetação. A inoculação com as suspensão

das amostras de solo foi realizada quando as plantas estavam com sete dias de emergência e com um a três pares de folhas. A inoculação foi feita sob condições axênicas e com pipetador automático, adicionando-se 2 mL de solução de solo por vaso. Aos 45 dias após a inoculação, efetuou-se coleta das plantas, separando-se parte aérea de sistema radicular. Após lavagem das raízes, os nódulos obtidos em casa de vegetação foram destacados, secos em papel toalha e acondicionados em recipientes de vidro, com sílica e algodão.

#### **4.2.1 Maceração dos nódulos e obtenção de isolados**

Os isolados foram reidratados em água destilada estéril por 24 h e mantidos no refrigerador para o dia seguinte. Após a reidratação, os nódulos foram macerados separadamente em tubo de ensaio estéril, com bastão de vidro esterilizado, em câmara de fluxo laminar. Com o auxílio de ponteiras estéreis em câmara de fluxo laminar, os caldo de nódulos macerados foram inoculados em meio de cultura sólido levedura-manitol com corante vermelho congo (LMV) (Vincent, 1970), utilizando-se o método da gota (Miles & Misra, 1988.) e do espalhamento (Buck & Cleverdon, 1960), separadamente.

As placas de petri contendo o meio LMV (Vincent, 1970) inoculado foram armazenadas em estufa a 28 °C. Foi realizada avaliação diária de cada uma das placas com o auxílio de uma lupa de mesa, à medida em que surgiam colônias com características morfológicas de rizóbios, estas eram imediatamente transferidas para outra placa, de modo a se obter colônias puras com morfologia persistente. No final do procedimento foram obtidos 17 isolados bacterianos purificados.

#### **4.2.2 Identificação Morfológica dos isolados**

Os rizóbios estudados foram selecionados em placas de petri, com meio de cultura levedura-manitol com vermelho congo (LMV) (Vincent, 1970), com base em características morfológicas típicas de colônias rizobianas. Os isolados foram caracterizados de acordo com características de tempo de crescimento, cor, altura de colônia, diâmetro de colônia, consistência da colônia e opacidade da colônia.

Após a caracterização fenotípica, cada um dos rizóbios foi inoculado em três tubos de ensaio, contendo meio LMV (Vincent, 1970). Estes tubos

inoculados foram mantidos em refrigerador. Os 148 isolados obtidos para serradela foram armazenados na Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS.

#### **4.2.3 Experimento de autenticação e seleção inicial em tubos**

Os 17 isolados obtidos, bem como as três estirpes recomendadas para adesmia (SEMIA 3007, SEMIA 6437 e SEMIA6438) e os 50 isolados de adesmia cedidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri-SC) foram avaliados quanto à capacidade de induzir a formação de nódulos em plantas de serradela. As estirpes, liberadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produção de inoculantes para *A. latifolia*, são provenientes da Coleção de Culturas de Rizóbios da Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO).

Para efeito de comparação, foram conduzidos dois tratamentos controle não inoculados, um tratamento com adição de N mineral (Controle + N), que recebeu uma alíquota de 107 µl ml de solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (20 g L<sup>-1</sup>), equivalente a aplicação de 100 kg de N ha<sup>-1</sup>. O outro controle sem inoculação não recebeu a adição de N mineral (Controle - N).

O estudo foi realizado em laboratório em condições *in vitro*, utilizando-se tubos de ensaio de 30 mL, contendo uma tira de papel toalha e 15 mL de solução nutritiva Sarruge a 25% (Sarruge, 1975), esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Em cada tubo foi adicionada uma semente pré-germinada de serradela com o auxílio de uma pinça flambada e em câmara de fluxo laminar. Um dia após a emergência das plântulas, em câmara de fluxo foi inoculado individualmente em cada tubo 1 mL de caldo de cultura de cada um dos isolados. Após a inoculação os tubos foram tampados com buchas de algodão e mantidos em lampadário com 8 horas por dia e temperatura ambiente.

Para a produção dos caldos de cultura, os rizóbios foram inoculados em tubos de ensaio com rosca, contendo meio de cultura LM líquido (Vincent, 1970) e colocados em incubador orbital a 28 °C com agitação de 120 rpm por sete dias. No dia da inoculação, os caldos apresentavam uma concentração celular de 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias por mL (ufc.mL<sup>-1</sup>). O Experimento foi composto por 150 tratamentos e três repetições, sendo 148

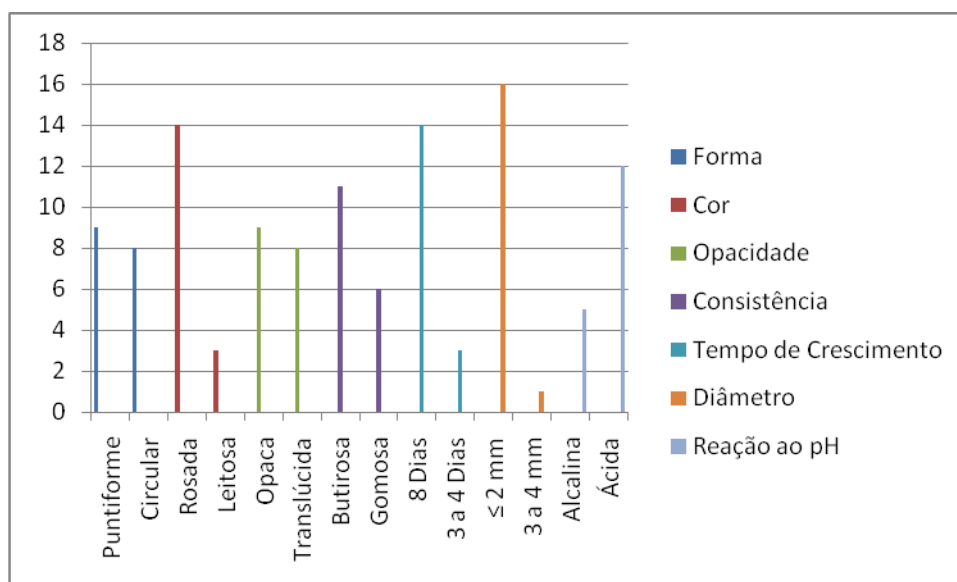


tratamentos inoculados com os rizóbios estudados, e dois tratamentos controle não inoculados, um tratamento com adição de N mineral (Controle + N), que recebeu uma alíquota de 107 µl ml de solução de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (20 g L<sup>-1</sup>), equivalente aplicação de 100 kg de N ha<sup>-1</sup>. O outro controle sem inoculação não recebeu a adição de N mineral (Controle - N). Após um período de 35 dias o experimento foi encerrado e as plantas coletadas, sendo quantificadas a massa fresca total das plantas, o número de folhas e de nódulos e o comprimento da parte aérea e da raiz.

Para cada tratamento foram conduzidas três repetições. Após um período de 35 dias o experimento foi encerrado e as plantas coletadas, sendo quantificadas a massa fresca total das plantas, o número de folhas e de nódulos e o comprimento da parte aérea e da raiz.

### 4.3 Resultados e Discussão

Com os estudos de coleta, identificação e isolamento, foram obtidos 17 isolados com características típicas de rizóbios, os quais foram somados aos 50 isolados cedidos pela Epagri e às três estirpes recomendadas para *A. latifolia* para avaliações de infectividade e eficiência. Na figura 4.1, são apresentadas as características dos isolados obtidos no presente estudo.



**Figura 4.1.** Características dos isolados de *Adesmia latifolia* obtidos no presente estudo.

Além das características apresentadas na figura 4.1, todos os isolados de adesmia obtidos no presente estudo apresentaram colônias côncavas e

bordas regulares, típicas de rizóbios. As características de forma, cor, opacidade, consistência, tempo de crescimento, diâmetro e reação ao pH são típicas de rizóbios, sendo que 14 isolados com colônias menores que 2 mm em oito dias de crescimento têm características típicas de *Bradyrhizobium*, enquanto outros três isolados, com colônias de 2 a 4 mm aos quatro dias de crescimento têm características típicas de *Mesorhizobium* (Figura 4.1, Apêndice 2).

Na tabela 4.1 são apresentados os dados de nodulação e de indução de crescimento e desenvolvimento de mudas de adesmia (*Adesmia latifolia*), obtidos no estudo de autenticação e seleção de rizóbios *in vitro*.

**Tabela 4.1.** Massa fresca total (MFT), número de folhas, número de nódulos, comprimento da parte aérea (PA) e comprimento radicular (Raiz) de plantas de adesmia (*Adesmia latifolia*), inoculadas com rizóbios, aos 35 dias após germinação.

Tratamento	MFT (mg)	Número de folhas	Número de nódulos	PA (cm)	Raiz (cm)
Controle N +	63 b	17,3 b	0,0 c	4,6 b	7,0 a
EEL46210	97 a	22,7 a	6,7 a	8,1 a	9,6 a
EEL1010	79 a	27,0 a	4,3 b	7,9 a	7,4 a
UFRGS AI9	74 a	24,0 a	5,7 b	5,6 b	5,7 a
EEL48910	65 b	14,5 c	2,7 b	5,5 b	5,4 a
UFRGS AI3	63 b	21,7 a	3,0 b	7,1 a	6,7 a
UFRGS AI2	61 b	26,0 a	3,0 b	7,8 a	6,9 a
EEL47310	61 b	21,3 a	4,7 b	7,7 a	6,4 a
SEMIA 6437	57 b	20,7 a	4,0 b	5,8 b	6,9 a
EEL16010B	52 b	21,0 a	2,0 c	7,1 a	6,6 a
EEL45610	48 b	11,0 c	5,0 b	5,6 b	5,1 a
UFRGS AI8	46 b	11,7 c	8,0 a	5,8 b	8,4 a
EEL0811	44 c	19,0 b	2,7 b	4,9 b	5,2 a
EEL1711	43 c	18,0 b	4,0 b	6,5 a	7,5 a
EEL45210	42 c	16,7 c	3,0 b	5,4 b	5,6 a

EEL45410	42 c	19,0 b	3,3 b	5,8 b	4,7 b
UFRGS AI7	42 c	13,3 c	3,7 b	4,9 b	7,2 a
EEL44810	41 c	18,7 b	2,7 b	5,6 b	4,4 b
EEL4010	40 c	13,7 c	1,3 c	4,3 b	6,1 a
EEL4110	37 c	29,3 a	3,3 b	5,8 b	4,4 b
UFRGS AI1	37 c	14,3 b	5,0 c	4,2 c	6,1 a
EEL0411	37 c	12,0 c	3,0 c	4,5 b	4,2 b
EEL45310	36 c	15,3 b	2,0 d	4,4 b	6,7 a
EEL3910	36 c	22,0 a	2,0 d	6,4 a	5,6 a
EEL46510	36 c	12,7 c	0,0 d	6,1 a	6,0 a
EEL44910	35 c	12,7 c	0,0 d	4,8 b	4,4 c
EEL1510	35 c	19,0 b	0,0 d	4,2 c	5,9 b
EEL46710	35 c	17,7 b	0,0 d	4,9 b	6,6 a
EEL2310	35 c	18,0 b	4,0 c	5,4 b	4,2 c
UFRGS AI4	34 c	19,7 b	2,7 c	5,0 b	4,2 c
EEL0610	33 c	22,3 a	0,7 d	5,1 b	3,8 c
EEL5501	33 c	18,0 b	11,0 a	4,6 b	5,1 a
SEMIA3007	32 c	16,7 b	1,0 d	3,8 c	6,1 a
EEL2811	31 c	8,0 d	0,0 d	2,6 c	4,7 b
UFRGS AI6	30 c	15,3 c	3,3 c	4,3 b	3,1 b
EEL1011	30 c	12,0 c	4,0 c	4,4 b	6,0 a
EEL45510	30 c	22,7 a	4,7 c	7,1 a	6,7 a
EEL44710	29 c	18,7 b	4,3 c	3,8 c	3,0 b
EEL1210	28 c	11,7 c	6,7 b	4,0 c	5,8 b
EEL46610A	26 d	16,0 b	0,0 d	4,7 b	4,1 b
EEL2511	26 d	12,0 c	0,0 d	3,1 c	3,7 b
SEMIA6438	26 d	12,3 c	0,3 d	4,6 b	4,0 b
EEL0210	25 d	12,0 c	1,0 d	3,5 c	3,0 b
EEL0511A	25 d	6,0 d	0,0 d	3,9 c	4,9 a
EEL46310	25 d	14,7 c	0,0 d	3,5 c	4,0 b

EEL0111	24 d	19,0 b	0,0 d	3,8 c	3,9 b
UFRGS AI10	23 d	5,3 d	1,3 d	3,0 c	2,6 c
UFRGS AI20	22 d	8,3 d	1,7 d	3,0 c	4,6 b
EEL3410	21 d	22,3 a	0,0 d	4,4 b	4,7 b
EEL46410	21 d	17,0 b	0,0 d	4,9 b	5,5 a
UFRGS AI21	21 d	13,0 c	2,3 d	4,3 b	3,1 b
UFRGS AI19	21 d	5,0 d	0,0 d	2,4 c	3,6 b
EEL0211	21 d	10,0 c	0,7 d	3,3 c	3,1 b
EEL0311	20 d	7,0 d	0,0 c	3,3 c	3,5 b
UFRGS AI16	20 d	6,9 d	1,7 c	3,3 c	2,8 c
EEL1911	20 d	9,0 c	0,0 c	2,9 c	3,9 b
EEL2010	20 d	3,0 d	0,0 c	1,9 c	4,1 b
UFRGS AI5	19 d	10,7 c	0,7 c	2,9 c	3,8 b
EEL15710	19 d	14,0 c	0,0 c	4,1 c	6,1 a
EEL1811	19 d	4,0 d	0,0 c	3,6 c	3,9 b
EEL212-7	18 d	22,0 a	1,0 c	3,9 c	5,0 a
EEL2211	17 d	8,3 d	1,0 c	2,6 c	5,6 a
UFRGS AI17	16 d	11,0 c	4,7 b	4,6 b	6,0 a
UFRGS AI22	16 d	22,0 a	2,3 c	4,9 b	3,2 b
EEL37810	16 d	15,3 b	0,0 c	3,5 c	4,4 b
UFRGS AI18	15 d	8,0 d	2,0 c	1,4 d	5,2 a
EEL3210	15 d	6,3 d	0,3 c	3,6 c	2,0 c
EEL3011B	14 d	7,0 d	1,7 c	2,4 c	2,5 c
EEL2111	10 d	4,0 d	0,0 c	0,4 d	0,7 c
EEL3310	10 d	3,7 d	0,0 c	2,6 c	2,2 c
EEL45110	2 d	4,0 d	0,0 c	0,4 d	0,7 c
Controle N -	29 d	9,7 c	0,0 c	3,5 c	3,9 b
CV (%)	37,22	32,67	81,51	30,79	30,64

Médias de três repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Os isolados EEL46210 e EEL1010 destacaram-se quanto aos principais parâmetros de crescimento e desenvolvimento avaliados. Em ambos os tratamentos obteve-se massa fresca total (MFT), número de folhas e comprimento da parte aérea (PA) superiores ao Controle + N, com dose de N equivalente a 100 kg N.ha<sup>-1</sup>. Também superaram a SEMIA6437, a SEMIA com melhor desempenho no presente estudo, quanto à massa fresca total e ao comprimento da parte aérea. Com o isolado UFRGS AI9 também obteve-se resultados destacáveis, massa fresca total e Número de folhas superiores ao Controle +, bem como maior massa fresca total que a SEMIA6437. Com estes resultados, os isolados EEL46210, EEL1010 e UFRGS AI9 surgem como importantes alternativas para futuros estudos de inoculação em adesmia (*Adesmia latifolia*) em escala mais ampla, primeiramente em casa de vegetação e posteriormente a campo.

A eficiência dos isolados EEL46210, EEL1010 e UFRGS AI9 sob as condições do presente estudo *in vitro*, revela uma perspectiva otimista para próximos estudos onde deve-se verificar a manutenção deste alto rendimento em condições menos isoladas, como ambientes de casa de vegetação e à campo, nos quais estes rizóbios serão submetidos a maiores adversidades de sobrevivência ao ambiente e de competição com outras bactérias por espaço no sítio de infecção radicular.

Em um grupo intermediário, porém com bom rendimento quanto aos parâmetros avaliados, estão os isolados EEL16010B, EEL47310, UFRGS AI2 e UFRGS AI3. Estes apresentaram massa fresca total equivalente ao Controle +, porém o superaram quanto ao número de folhas e comprimento da parte aérea. Adicionalmente, superaram a SEMIA 6437 quanto ao comprimento da parte aérea. Outros 11 isolados também apresentaram nodulação, tiveram algum destaque quanto aos parâmetros avaliados, porém no presente estudo estão em um nível inferior de rendimento. São os casos dos isolados EEL48910, EEL45610, EEL 0811, EEL 1711, EEL 45210, EEL 45410, EEL 44810, EEL 4010, EEL4110, UFRGS AI7 e UFRGS AI8.

Ao avaliar o rendimento das estirpes liberadas para a adesmia, observa-se que a SEMIA 6437 apresentou um rendimento satisfatório, à medida em que superou o tratamento Controle + N quanto à massa fresca total e ao número de folhas, além de boa nodulação. Com os presentes resultados, infere-se que a

estirpe SEMIA 6437 manteve sua capacidade de nodulação e incrementar o rendimento de adesmia, apresentando-se viável e eficiente para composição de inoculantes para a espécie estudada. Por outro lado, as SEMIAS 3007 e 6438 foram ineficientes em incrementar satisfatoriamente o rendimento de adesmia no presente trabalho, sobretudo quanto ao parâmetro massa fresca total. Ao final dos 35 dias de duração do estudo, as outras duas SEMIAS foram ineficazes quanto à nodulação. A SEMIA3007 apresentou média de 1 nódulo por planta, enquanto a inoculação da SEMIA 6438 induziu a formação de 0,3 nódulo por planta.

Dos 70 isolados estudados, nove foram incapazes de nodular adesmia sob as condições do presente estudo. Apesar de apresentarem características rizobianas quando em meio de cultura, não confirmaram a característica de rizóbio compatível para nodulação em adesmia, sendo descartados. Outros 23 isolados nodularam raízes de adesmia, porém não incrementaram a massa fresca total das plantas comparativamente ao tratamento Controle - N. Apesar de nodularem e representarem um custo fisiológico à planta, estas bactérias não foram capazes de incrementar a massa fresca total, por isto são classificadas como noduladoras ineficientes.

De acordo com Drew et al. (2012), em cultivos de leguminosas a campo, a nodulação é fruto de uma competição entre os rizóbios presentes no solo. Os nódulos podem ser formados por bactérias nativas e pouco eficientes ou bactérias eficientes veiculadas através do inoculante. Com isto, nem sempre a estirpe recomendada e veiculada através do inoculante, é a noduladora preponderante. Por este motivo, é essencial o investimento em isolamento e seleção de bactérias noduladoras, competitivas e eficientes na fixação de N atmosférico, bem como na re-inoculação periódica da estirpe recomendada, para se manter alta a probabilidade de infecção do rizóbio selecionado para a cultura em questão. Neste sentido, do grupo de 70 isolados testados no presente estudo, destaca-se dois com grande potencial para futura composição de inoculantes para *Adesmia latifolia*. Sob as condições do presente estudo, os rizóbios EEL46210 e EEL1010 mostraram-se superiores às estirpes liberadas para *A. latifolia*, porém é preciso verificar a confirmação destes resultados sob condições de campo, para posterior recomendação destes rizóbios na composição de inoculantes.

#### 4.4 Conclusões

Dentre os isolados obtidos e autenticados, 61 foram capazes de nodular adesmia, sendo 38 eficientes em estimular o crescimento de adesmia.

Os isolados EEL46210, EEL1010 e UFRGS AI9 foram os mais promissores quanto ao crescimento e desenvolvimento de adesmia, superando o tratamento Controle + N e a estirpe recomendada de melhor desempenho, a SEMIA6437.

#### 4.5 Referências Bibliográficas

BUCK, J.D.; CLEVERDON, R.C. The spread plate as a method for the enumeration of marine bacteria. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 5, p. 78-80, 1960.

BURKART, A. **Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas**. Buenos Aires: ACME Agency. 1952. 596p.

DREW, E. et al. **Inoculating legumes: a practical guide**. 1<sup>st</sup>. ed. Kingston: Grains Research and Development Corporation (GRDC), 2012. 71 p.

MILES, A.A. & MISRA, A.A. The estimation of the bacterial power of blood. **Journal of Hygiene**, London, v. 38, p. 732-749, 1988.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phitopathologica**, Piracicaba, v. 1, p. 231-234, 1975.

SCHEFFER-BASSO, S.M., et al. Crescimento de plântulas de *Adesmia* spp. submetidas a doses de alumínio em solução nutritiva. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 217-222, 2000.

SCHEFFER-BASSO, S.M. et al. Disponibilidade e valor nutritive de forragem de leguminosas nativas (*Adesmia* DC.) e exóticas (*Lotus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, p. 975-982, 2001.

SCHEFFER-BASSO, S.M. et al. Comportamento de leguminosas (*Adesmia*, *Lotus*, *Trifolium*) em mistura com festuca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, p. 2197-2203, 2002.

SCHEFFER-BASSO, S.M.; VENDRUSCOLO, M.C.; CECCHETTI, D. Desempenho de leguminosas nativas (*Adesmia*) e exóticas (*Lotus*, *Trifolium*) em função do estágio fenológico no primeiro corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, p. 1871-1880, 2005.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p.

**5 CAPÍTULO III – RIZÓBIOS SIMBIONTES DE ADESMIA (*Adesmia latifolia*)  
E SERRADELA (*Ornithopus micrantus*) COMO PROMOTORES DE  
CRESCIMENTO DE CAPIM SUDÃO (*Shorghum sudanense*), MILHETO  
(*Pennisetum glaucum*), CAPIM ÁRIES (*Panicum maximum* cv. Áries) E  
SORGO (*Sorghum bicolor*)**

**Resumo**

O objetivo do presente estudo foi avaliar em condições axênicas o efeito de rizóbios previamente selecionados em experimentos de inoculação em plantas de adesmia e serradela sobre o rendimento de quatro gramíneas de importância econômica no RS: capim sudão (*Shorghum sudanense* L. cv. BRS Estribo), milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Brown cv. BRS1503), áries (*Panicum maximum* cv. Áries) e sorgo forrageiro (Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv. BRS810)). Foram estudados os rizóbios UFRGS Os57; UFRGS Os59 e UFRGS Os148, obtidos da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS, o isolado de adesmia EEL46210, cedido pela Epagri de Lages-SC, e as estirpes SEMIA 929 e SEMIA 6437, liberadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produção de inoculantes para serradela (*Ornithopus micrantus*) e adesmia (*Adesmia latifolia*), cedidas pela coleção de culturas SEMIA da FEPAGRO-RS. Nos experimentos com cada espécie de planta, além dos tratamentos inoculados, foram conduzidos dois tratamentos controle sem inoculação, sendo um com a adição de nitrogênio em dose de N equivalente a 100 kg N.ha<sup>-1</sup> e o outro com dose equivalente a 50 kg N.ha<sup>-1</sup>. Os experimentos foram conduzidos no município de Nova Alvorada-RS, o qual é localizado na meso-região nordeste do Rio Grande do Sul (RS). Foi utilizado substrato inerte composto pela mistura de vermiculita expandida e areia, na proporção 2:1 (v/v), disposto em copos plásticos de 400 mL. Os inóculos foram incubadas separadamente em erlenmeyers de 250 mL com 80 mL de meio de cultura LM líquido em agitador orbital a 28 °C, por sete dias. Foram aplicados 2 ml do caldo de cultura nos tratamentos inoculados. O nitrogênio (N) foi aplicado via solução de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, aos 15 dias após emergência das plântulas. O estudo foi disposto em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) e teve duração de 45 dias. Os isolados UFRGS Os57, UFRGS Os148, EEL46.210, SEMIA929 e SEMIA6437 estimulam a massa seca radicular de capim sudão. O isolado UFRGS Os57 induz maior altura de plantas comparativamente ao Controle N - aos 15 e aos 30 dias após emergência. Apesar do estímulo na MSR e na altura das plantas, a inoculação com os isolados do presente estudo mostra-se deletéria à massa seca da parte aérea de capim sudão. Em milheto, a estirpe SEMIA 929 incrementa a massa seca da parte aérea e massa seca radicular, altura aos 15 dias e o Índice de Eficiência Relativa (IER%) é superior a 150 %, o que revela uma relação positiva entre a estirpe SEMIA 929 e a cv. BRS1503 de milheto. Não foi observado efeito das inoculações sobre o rendimento de áries. A



inoculação com o isolado UFRGS Om57 em sorgo estimula a MSPA e a MSR. Para este tratamento o IER% é de 179%. A estirpe EEL46210 também estimula o crescimento do sorgo, com um IER(%) de 124%.

## 5.1 Introdução

Recentes estudos têm mostrado que a presença de leguminosas em sistemas de consórcio/sucessão com gramíneas não está associada apenas ao aporte de N ao solo, mas também ao efeito direto ou indireto sobre o rendimento das gramíneas associadas (Yanni et al., 2001; Hahn et al., 2014 ). Em 1997, Reddy et al. verificaram que rizóbios também colonizam o tecido de gramíneas. De acordo com os autores, a principal forma de invasão de rizóbios em raízes de gramíneas é através de fissuras na epiderme e fissuras criadas durante a emergência de raízes laterais. Este processo de infecção é independente dos genes-nod, ou seja, não está relacionado ao processo simbiótico de nodulação e também não envolve a formação de cordão de infecção, sendo restrito ao espaço intercelular (Reddy et al., 1997). Com o uso de bactérias marcadas com o gene Gus, Osório Filho (2009) comprovou não só a infecção do tecido radicular, mas também de folhas de arroz por rizóbios. Estas bactérias podem se mover através do xilema até a parte aérea das plantas (Yanni et al., 1997).

Diversos trabalhos relatam o incremento no rendimento de espécies de gramíneas em decorrência da inoculação com rizóbios, mesmo sem estas bactérias serem capazes de fixar N em associação com gramíneas (Yanni et al., 2001; Matiru & Dakora, 2004; Mishra et al., 2006; Hahn, 2013; Machado et al., 2013; Osorio Filho et al., 2014). Neste sentido, além de inserirem o N atmosférico no sistema solo-planta através da fixação simbiótica, os rizóbios simbiotes de leguminosas nativas e adaptados às condições edafoclimáticas do RS e SC podem estimular diretamente gramíneas cultivadas que venham a ser ofertadas aos animais em consórcio/sucessão a estas leguminosas.

A influência no rendimento das gramíneas é dada em decorrência da produção de substâncias fitoestimuladoras, como hormônios dos grupos das auxinas (Biswas et al., 2000), citocininas (Persello-Cartieaux et al., 2003), giberelinas (Yanni et al., 2001), ácido abscísico (Dangar & Basu, 1991), ou de

forma indireta, pelo nitrogênio residual presente nos exudatos radiculares e nos tecidos das leguminosas quando decompostos.

A busca por associações biológicas que possam beneficiar o desenvolvimento de plantas de interesse econômico e reduzir o uso ou aumentar o aproveitamento de fertilizantes minerais pode tornar a exploração de pastagens mais sustentável econômica e ecologicamente. A exploração de sistemas pastoris de forma mais sustentável, com menor uso de insumos minerais prejudiciais aos rendimentos, pode ser obtido com o uso de rizóbios fixadores de nitrogênio, cuja ação pode ser complementada por mecanismos diretos de promoção de crescimento de gramíneas cultivadas.

Neste sentido, é de grande importância a prospecção de rizóbios que já estão adaptados às condições edafoclimáticas dos estados do RS e SC e que se mantenham em rizosferas de plantas nativas em associações simbióticas eficientes. Assim sendo, se faz necessário o estudo destes rizóbios quando em interação com gramíneas forrageiras de importância para a pecuária dos estados do RS e SC, e que possam ser cultivadas em associação com leguminosas nativas.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de rizóbios isolados das leguminosas nativas adesmia e serradela sobre o rendimento de quatro gramíneas de importância econômica nos estados do RS e SC: capim sudão (*Shorghum sudanense* L. cv. BRS Estribo), milheto (*Pennisetum glaucum*(L.) R. Brown cv. BRS1503), áries (*Panicum maximum* cv. Áries) e sorgo (Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv. BRS810), bem como comparar e agrupar por similaridade genotípica os rizóbios estudados.

## **5.2 Material e Métodos**

Foram estudados quanto à capacidade de promoção de crescimento de plantas os rizóbios de serradela UFRGS Om57, UFRGS Om59 e UFRGS Om148, obtidos da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS, o isolado de adesmia EEL46210, cedido pela Epagri de Lages-SC e as estirpes SEMIA 929 e SEMIA 6437, liberadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produção de inoculantes para serradela e adesmia, gentilmente cedidas pela coleção de estirpes SEMIA da FEPAGRO. Foram realizados quatro experimentos com inoculação de

rizóbios em plantas das gramíneas forrageiras: capim sudão (*Shorghum sudanense* L. cv. BRS Estribo), milheto (*Pennisetum glaucum*(L.) R. Brown cv. BRS1503), áries (*Panicum maximum* cv. Áries) e sorgo (Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv. BRS810).

Os experimentos foram conduzidos no município de Nova Alvorada-RS, o qual é localizado na meso-região nordeste do Rio Grande do Sul (RS), com latitude 28°40'39" ao sul e longitude 52°09'59" a oeste. A altitude é de 427 metros e o clima Clima subtropical úmido (Classificação climática de Köppen-Geiger: Cfa). A instalação dos experimentos foi realizada no dia 11 de Fevereiro de 2014, em ambiente protegido e com iluminação controlada, com 12 horas diárias de iluminação artificial, sendo as lâmpadas de iluminação ligadas às 7h e 30 min., e desligadas às 19h e 30 min.

Foi utilizado substrato inerte composto pela mistura de vermiculita expandida e areia, na proporção 2:1 (v/v), disposto em copos plásticos de 400 mL. A areia foi previamente lavada em água corrente, para se excluir eventuais partículas coloidais ainda presentes na mesma. Após misturar homogeneamente o substrato, o mesmo foi acondicionado em sacos de algodão e esterilizado em autoclave à temperatura de 120 °C e 1 atm por um período de 90 minutos. Após a esterilização e o esfriamento do substrato, o mesmo foi depositado em copos plásticos de 300 mL, onde foi realizada a semeadura.

As sementes das quatro espécies estudadas foram desinfestadas por imersões sucessivas em álcool (70%) por 30 s, seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 s e sete lavagens consecutivas com água destilada esterilizada em autoclave a 120°C por 15 min. Em seguida, as sementes foram colocadas entre folhas de papel toalha estéril formando rolos umedecidos com água destilada esterilizada, cobertos com papel alumínio e colocadas para germinar em estufa a 28°C por 48 horas. Após a germinação, seis plântulas cujas radículas apresentavam comprimento de 1 a 3 mm foram colocadas em cada vaso utilizando-se pinças e bastão de vidro flambados. Sete dias após o transplante, foi realizado o desbaste em todas as unidades experimentais, mantendo-se duas plantas por vaso.

A preparação dos inóculos dos rizóbios foi realizada em erlenmeyers de 250 mL, contendo 80 mL de meio de cultura Levedura Manitol líquido (Vincent,

1970) colocados a incubar em agitador orbital a 28 °C, com agitação constante de 120 rpm por sete dias. Após o período de incubação, o caldo das culturas apresentou concentração celular mínima de  $1.10^8$  unidades formadoras de colônias (ufc) por ml, quantificada em câmara de Neubauer (Moura et al., 1987). Foram aplicados 2 ml do caldo de cultura nos tratamentos inoculados, sete dias após semeadura, com o uso de pipetas de vidro esterilizadas. Em cada unidade experimental dos Controles não inoculados, foi aplicado o mesmo volume do meio de cultura LM líquido estéril (Vincent, 1970).

O nitrogênio (N) foi aplicado aos sete dias após semeadura, em todas as unidades experimentais utilizando-se solução de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), com a concentração de  $5,7 \text{ g.l}^{-1}$ . Devido ao fato de que não ocorre a fixação simbiótica de N por rizóbios em gramíneas, todos os tratamentos inoculados receberam aplicação de N. Desta forma, nos tratamentos inoculados e no Controle NI50 foram aplicados 5 ml, enquanto no NI100 foram aplicados 10 ml da solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Para suprir a necessidade dos outros nutrientes essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas foi utilizada solução nutritiva Sarruge (1975), diluída a 25%, da qual foram aplicados semanalmente 50 mL a cada uma das unidades experimentais, ao longo dos primeiros 15 dias de experimento. Posteriormente, as aplicações foram realizadas com intervalos de 4 dias até o momento da colheita, 45 dias após a semeadura.

Deste modo, cada um dos quatro experimentos foi composto por oito tratamentos: seis tratamentos inoculados, todos com doses de N equivalente a  $50 \text{ kg N.ha}^{-1}$ ; dois tratamentos controle sem inoculação, sendo um com dose de N equivalente a  $50 \text{ kg N.ha}^{-1}$ ; e o outro com dose de N equivalente a  $100 \text{ kg N.ha}^{-1}$ . Cada tratamento foi composta por três repetições. O estudo composto pelos quatro experimentos foi delineado inteiramente ao acaso. Aos 15 e 30 dias após emergência, foram mensuradas as alturas das plantas, com o auxílio de uma régua graduada. Ao final de 45 dias, as plantas foram coletadas, separando-se a parte aérea de sistema radicular. As raízes foram lavadas em água corrente, para se retirar as partículas de areia e vermiculita. Após, raízes e parte aérea foram armazenadas em estufa a 65 °C para secagem até peso constante. Foram avaliados os parâmetros massa seca da parte aérea, massa seca de raiz, índice de eficiência relativa (IER%), adaptado de Brockwell (1966) por Machado et al. (2013) e altura de plantas.

A capacidade dos rizóbios em promover acúmulo de massa seca total nas plantas inoculadas em comparação com as dos tratamentos controle foi avaliada calculando-se o índice de eficiência relativa IER (%), segundo a fórmula a seguir:

$$\text{IER (\%)} = \frac{(\text{MS Inoculado} - \text{MS Controle NI 50})}{(\text{MS Controle NI 100} - \text{MS Controle NI 50})} * 100$$

onde:

IER (%) = Índice de Eficiência Relativa;

MS Inoculado = massa seca total do tratamento inoculado, com dose equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>;

MS Controle NI 50 = massa seca total do tratamento Controle NI 50, não inoculado e com adição de nitrogênio equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>;

MS Controle NI 100 = massa seca total do tratamento Controle NI 100 não inoculado, com adição de nitrogênio equivalente a 100 Kg de N ha<sup>-1</sup>.

Foi realizado o seqüenciamento da região 16 S do DNA ribossomal das estirpes atualmente liberadas pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para produção de inoculantes de serradela (SEMIA905 e SEMIA929) e adesmia (SEMIA6437) e também dos isolados de rizóbios UFRGS Os57; UFRGS Os59; UFRGS Os148 e EEL46.210, os apresentaram o melhor desempenho na fixação biológica de nitrogênio FBN em associação com as leguminosas nativas estudadas.

### **5.2.1 Extração do DNAr 16S**

A extração do DNA genômico dos rizóbios foi realizada a partir de uma cultura de células crescidas em tubos contendo meio LM (Vincent, 1970) e incubadas a 28°C durante 48 horas em agitação constante de 120 rpm. Para extração dos DNAs adotou-se os procedimentos descritos no apêndice III.

### 5.2.2 Sequenciamento da região 16S do DNAr dos rizóbios de interesse

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 2,5 pmol dos *primers* 27F (BacPaeF): 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' & 1525R (Bac1542R): 5'AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC 3' e 0,5 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP Cyclor com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático.

Os dados do sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 2 (Applied Biosystems). As sequências dos nucleotídeos homólogos foram pesquisadas no banco de dados mundial GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) através do programa BLASTn (Altschul, 1997) e os fragmentos analisados pelo algoritmo Megablast. As sequências também foram comparadas entre si e agrupadas por similaridade com base no método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) pelo programa NTSYS 2.0.

### 5.3 Resultados e Discussão

Em plantas de capim Sudão inoculadas, observou-se que cinco rizóbios (UFRGS Om57, UFRGS Om148, EEL46.210, SEMIA929 e SEMIA6437) aumentaram a massa seca de raiz, sendo equivalente à do tratamento Controle NI100 (Tabela 5.1). A inoculação também aumentou a altura das plantas. Três isolados estimularam a altura das plantas aos 15 dias (SEMIA 929, EEL46210 e UFRGS Om57) e quatro aos 30 dias após a emergência (SEMIA 6437, UFRGS Om57, UFRGS Om59 e UFRGS Om148). Apesar do estímulo da

massa seca radicular e da altura das plantas, nas plantas inoculadas observou-se massa seca da parte aérea inferior aos tratamentos controle (Tabela 5.1). O Índice de Eficiência Relativa (IER%) obtido com as inoculações em capim sudão revela efeito positivo sobre a massa seca total de plantas, observado nos tratamentos SEMIA 929, SEMIA 6437, EEL46210, UFRGS Om57 e UFRGS Om148, comparativamente aos tratamentos controle (Figura 5.1).

**Tabela 5.1.** Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e altura de plantas (A15d; A30d e A45d) de capim sudão inoculadas com rizóbios isolados de serradela e adesmia.

Tratamento	MSPA (mg)	MSR (mg)	A15d (cm)	A30d (cm)	A45d (cm)
Controle N+	31 a	96 a	19,2 a	23,1 a	26,5 <sup>n.s.</sup>
SEMIA929 ( <i>Ornithopus</i> )	11 c	100 a	19,6 a	19,5 b	24,4
SEMIA6437 ( <i>Adesmia</i> )	10 c	100 a	15,5 b	22,5 a	23,3
EEL46210	14 c	92 a	17,4 a	20,1 b	22,2
UFRGS Om57	14 c	67 a	16,9 a	22,0 a	22,9
UFRGS Om59	12 c	27 b	14,7 b	21,3 a	21,2
UFRGS Om148	15 c	71 a	13,1 b	22,5 a	23,2
Controle N-	21 b	36 b	14,3 b	19,8 b	25,2
CV (%)	21,5	43,9	16,1	8,5	12,7

A15d: altura de plantas aos 15 dias após emergência; A 30 d: altura de plantas aos 30 dias após emergência; A 45 d: altura de plantas aos 45 dias após emergência; Controle NI100: dose de N equivalente a 100 kg N.ha<sup>-1</sup>; Controle NI50: dose de N equivalente a 50 kg N.ha<sup>-1</sup>; Todos os tratamentos inoculados receberam adição de N, equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>; Mesmas letras na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott Knott, a 15% de significância; n.s.: não significativo; Cada valor representa média de três repetições. Cada repetição é composta pela média entre duas plantas da unidade experimental.

A estirpe SEMIA 929 estimulou as plantas de milho (Tabela 5.2). O milho inoculado com a estirpe SEMIA 929 teve incremento da massa seca da parte aérea, sendo superior ao tratamento Controle NI50 e a todos os outros tratamentos inoculados. Na figura 5.1, observa-se IER% da SEMIA 929 superior a 150 %, o que indica que além de fixar N atmosférico em serradela, a SEMIA929 estimula o rendimento do milho por meio de outros mecanismos. Com a inoculação da estirpe SEMIA 929 em milho houve incremento da massa seca radicular e da altura das plantas aos 15 dias após emergência. Todos estes resultados constituem uma forte evidência da interação positiva e específica que existe entre a SEMIA 929 e o milho cv. BRS1503. Outros

relatos de especificidade entre rizóbios e espécies não leguminosas também foram observados por Schlindwein et al. (2008); Baset Mia et al. (2012) e Osório Filho et al. (2014).

Nos tratamentos SEMIA6437, EEL46210, UFRGS Om57 e UFRGS Om148 observou-se incremento na altura das plantas aos 15 dias após emergência. Este efeito estimulatório logo após a emergência, constatado aos 15 dias, é decorrente da maior aceleração no crescimento inicial e pode induzir maior competitividade por água, luz e nutrientes essenciais. Este efeito estimulatório é de grande importância para o incremento da competitividade das plantas em estudo quando em condições de campo. Outros autores também observaram estímulos na fase de estabelecimento inicial de plantas inoculadas com rizóbios (Vargas et al., 2009; Stroschein et al., 2011 e Tan et al., 2014), sendo esta interação importante no crescimento e desenvolvimento inicial das culturas.

**Tabela 5.2.** Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e altura de plantas (A15d; A30d e A45d) de milho inoculadas com rizóbios isolados de serradela e adesmia.

Tratamento	MSPA (mg)	MSR (mg)	A15d (cm)	A30d (cm)	A45d (cm)
Controle N+	19 a	186 a	9,6 a	12,2 <sup>n.s.</sup>	16,6 <sup>n.s.</sup>
SEMIA929 ( <i>Ornithopus</i> )	14 b	245 a	11,5 a	14,1	15,9
SEMIA6437 ( <i>Adesmia</i> )	9 c	57 b	10,1 a	14,0	14,8
EEL46210	6 c	60 b	9,8 a	14,0	14,4
UFRGS Om57	11 c	104 b	9,5 a	14,9	13,2
UFRGS Om59	6 c	79 b	7,6 b	12,4	11,7
UFRGS Om148	10 c	100 b	11,5 a	14,2	17,2
Controle N-	10 c	100 b	7,7 b	10,3	12,1
CV (%)	32,5	44,1	18,9	28,14	19,5

A15d: altura de plantas aos 15 dias após emergência; A 30 d: altura de plantas aos 30 dias após emergência; A 45 d: altura de plantas aos 45 dias após emergência; Controle NI100: dose de N equivalente a 100 kg N.ha<sup>-1</sup>; Controle NI50: dose de N equivalente a 50 kg N.ha<sup>-1</sup>; Todos os tratamentos inoculados receberam adição de N, equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>; Mesmas letras na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott Knott, a 15% de significância; n.s.: não significativo; Cada valor representa média de três repetições. Cada repetição é composta pela média entre duas plantas da unidade experimental.

Os resultados obtidos com as inoculações de rizóbios em capim áries são apresentados na tabela 5.3. Em decorrência da pouca produção da massa



seca da parte aérea e da variação entre as repetições dentro dos tratamentos, não foi possível identificar diferenças a nível de significância de 15%. Também foi impossível medir a massa seca radicular, devido aos valores serem muito pequenos e indetectáveis no presente estudo. Devido à igualdade entre os valores de massa seca da parte aérea dos tratamentos Controle NI100 e Controle NI50, foi impossível se determinar o IER% das inoculações em capim áries.

**Tabela 5.3.** Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e altura de plantas (A15d; A30d e A45d) de capim áries inoculadas com rizóbios isolados de serradela e adesmia.

Tratamento	MSPA (mg)	MSR (mg)	A15d (cm)	A30d (cm)	A45d (cm)
Controle N+	5 <sup>n.s.</sup>	-	5,7 <sup>n.s.</sup>	7,4 a	7,7 a
SEMIA929 ( <i>Ornithopus</i> )	3	-	4,6	5,9 b	6,3 b
SEMIA6437 ( <i>Adesmia</i> )	3	-	5,2	6,7 a	6,7 a
EEL46210	3	-	4,8	6,1 b	6,0 b
UFRGS Om57	2	-	4,4	5,4 b	5,2 b
UFRGS Om59	5	-	4,3	5,4 b	5,5 b
UFRGS Om148	3	-	4,9	6,1 b	6,0 b
Controle N-	5	-	3,6	4,8 b	6,8 a
CV (%)	61,8	-	15,7	15,5	12

A15d: altura de plantas aos 15 dias após emergência; A 30 d: altura de plantas aos 30 dias após emergência; A 45 d: altura de plantas aos 45 dias após emergência; Controle NI100: dose de N equivalente a 100 kg N.ha<sup>-1</sup>; Controle NI50: dose de N equivalente a 50 kg N.ha<sup>-1</sup>; Todos os tratamentos inoculados receberam adição de N, equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>; Mesmas letras na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott Knott, a 15% de significância; n.s.: não significativo; Cada valor representa média de três repetições. Cada repetição é composta pela média entre duas plantas da unidade experimental.

Já em plantas de sorgo (cv. BRS810), observou-se que a inoculação do rizóbio UFRGS Om57, isolado de serradela, induziu aumento da massa seca da parte aérea, sendo equivalente à produzida nas plantas não inoculadas e que receberam adição de nitrogênio equivalente a 100 Kg de N ha<sup>-1</sup> (Controle NI 100) e superando todos os demais tratamentos (Tabela 5.4). Este resultado mostra um potencial do rizóbio UFRGS Om57 que, se observado em experimentos a campo, pode possibilitar o cultivo de sorgo forrageiro inoculado e com adição da metade da adubação nitrogenada mineral, sem prejuízo no rendimento da cultura. O Índice de Eficiência Relativa (IER%) da inoculação do

UFRGS Om57 em sorgo foi de 179%, o maior de todo o estudo. A inoculação de sorgo com o isolado UFRGS Om57 induziu estímulo às raízes das plantas, sendo que após 45 dias, a massa seca radicular das plantas foi superior ao tratamento Controle NI50 e equivalente ao Controle NI100. Estes resultados comprovam a grande eficiência do UFRGS Os57 em promover o crescimento do sorgo forrageiro cv. BRS810 e o grande potencial desta interação para futuras explorações a campo. O isolado EEL46210 também estimulou o sorgo, tendo um IER (%) de 124%, enquanto que a IER (%) do isolado serradela UFRGS Os148 foi de 19%.

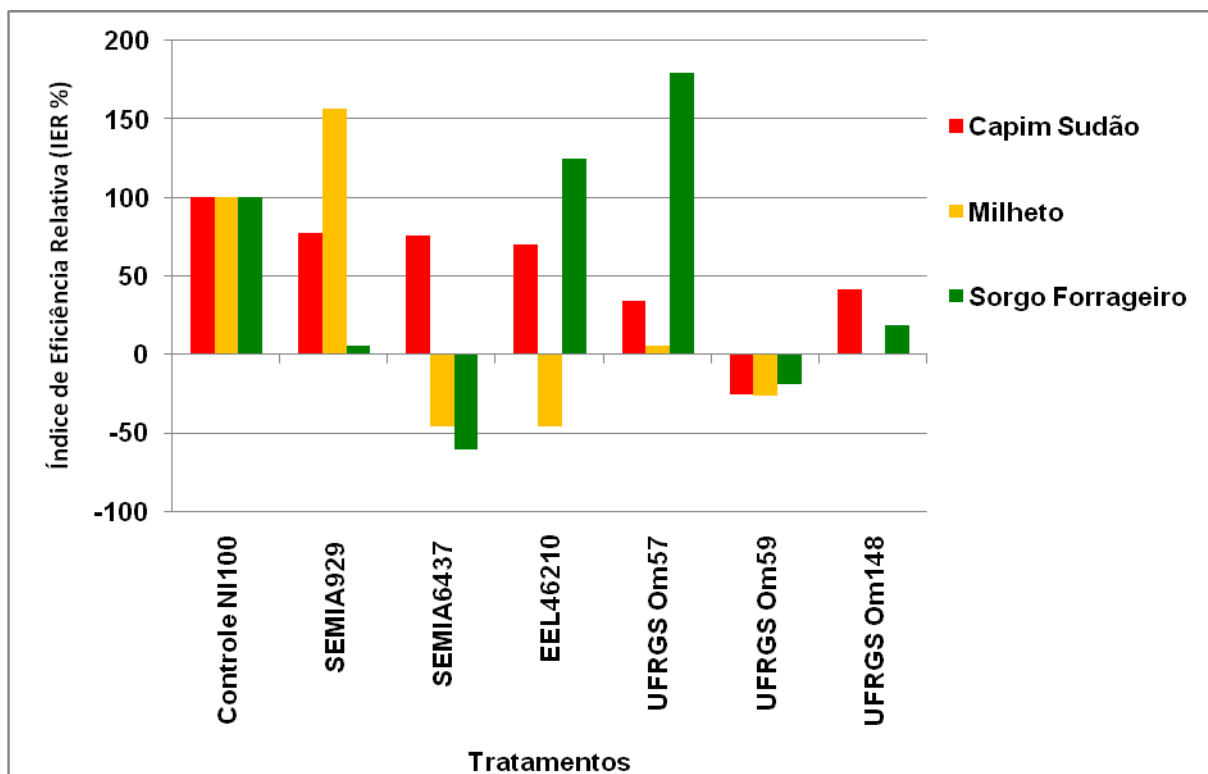
**Tabela 5.4.** Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e altura de plantas (A15d; A30d e A45d) de sorgo forrageiro inoculadas com rizóbios isolados de serradela e adesmia.

Tratamento	MSPA (mg)	MSR (mg)	A 15d (cm)	A 30d (cm)	A 45d (cm)
Controle N+	41 a	112 a	27,5 a	33,7 a	34,1 a
SEMIA929 ( <i>Ornithopus</i> )	35 b	68 b	23,6 b	28,4 b	28,1 b
SEMIA6437 ( <i>Adesmia</i> )	23 b	45 b	23,4 b	28,0 b	28,8 b
EEL46210	25 b	141 a	23,9 b	28,2 b	28,8 b
UFRGS Om57	48 a	147 a	23,3 b	28,1 b	29,5 b
UFRGS Om59	26 b	64 b	23,3 b	28,8 b	28,1 b
UFRGS Om148	31 b	79 b	24,3 b	28,7 b	29,3 b
Controle N-	32 b	72 b	22,8 b	27,8 b	30,2 b
CV (%)	32,4	53,3	8,1	6,7	6,2

A15d: altura de plantas aos 15 dias após emergência; A 30 d: altura de plantas aos 30 dias após emergência; A 45 d: altura de plantas aos 45 dias após emergência; Controle NI100: dose de N equivalente a 100 kg N.ha<sup>-1</sup>; Controle NI50: dose de N equivalente a 50 kg N.ha<sup>-1</sup>; Todos os tratamentos inoculados receberam adição de N, equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>; Mesmas letras na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott Knott, a 15% de significância; n.s.: não significativo; Cada valor representa média de três repetições. Cada repetição é composta pela média entre duas plantas da unidade experimental.

Na figura 5.1 é possível verificar a eficiência relativa (IER %) dos rizóbios inoculados em capim sudão, milho e sorgo forrageiro. Com exceção do isolado UFRGS Om59, todos os rizóbios testados incrementaram a produção de massa seca total (IER% > 0) em ao menos uma das espécies estudadas. Observou-se Índice de Eficiência Relativa (IER%) positivo da estirpe SEMIA 929 e do isolado UFRGS Om57, com a inoculação em capim sudão, milho e sorgo forrageiro. Com estes resultados demonstra-se a capacidade dos

rizóbios SEMIA 929 e UFRGS Om57 em promover o crescimento das gramíneas estudadas, por meio de mecanismos de promoção de crescimento de plantas, apesar de não fixarem N atmosférico quando inoculadas em gramíneas (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Índice de eficiência relativa (IER %) dos rizóbios quanto ao incremento da massa seca total de capim sudão, milho e sorgo forrageiro.

Quanto aos possíveis mecanismos de promoção de crescimento de plantas, em se tratando da interação com gramíneas, um importante mecanismo pelo qual os rizóbios atuam é a síntese de auxinas (Dobbelaere, et al. 2003). Os rizóbios sintetizam ácido indol-acético (AIA), um tipo de auxina, principalmente via rota do indol-3-ácido pirúvico (IPyA), a qual segundo Costacurta & Vanderleyden (1995) pode estar sujeita a uma regulação rigorosa pelos metabólitos das plantas. O AIA é o mais comum e mais bem caracterizado fito-hormônio (Hayat et al., 2010). De acordo com Patten & Glick (1996), 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir AIA, o qual consiste-se em um dos mais importantes hormônios vegetais, pois regula muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, desde a divisão, alongação e diferenciação celular até a formação das raízes,

dominância apical, tropismo, florescência, maturação dos frutos e senescência (Baca & Elmerich, 2003).

Existem outras classes de reguladores de crescimento vegetal produzidos por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, que de alguma forma podem influenciar o crescimento e o desenvolvimento das plantas. São elas as giberelinas, as citocininas, o etileno e o ácido abscísico (Zahir et al. 2004). Estes reguladores são de mais difícil quantificação e estão relacionados a diversos efeitos sobre a fisiologia das plantas: as giberelinas estão relacionadas ao alongamento do caule (Davies, 1995); as citocininas são relatadas como indutoras da divisão celular, desenvolvimento radicular e formação de pêlos radiculares (Frankenberger & Arshad, 1995); e o ácido abscísico auxilia no crescimento em ambientes de estresse por deficiência hídrica (Frankenberger & Arshad, 1995).

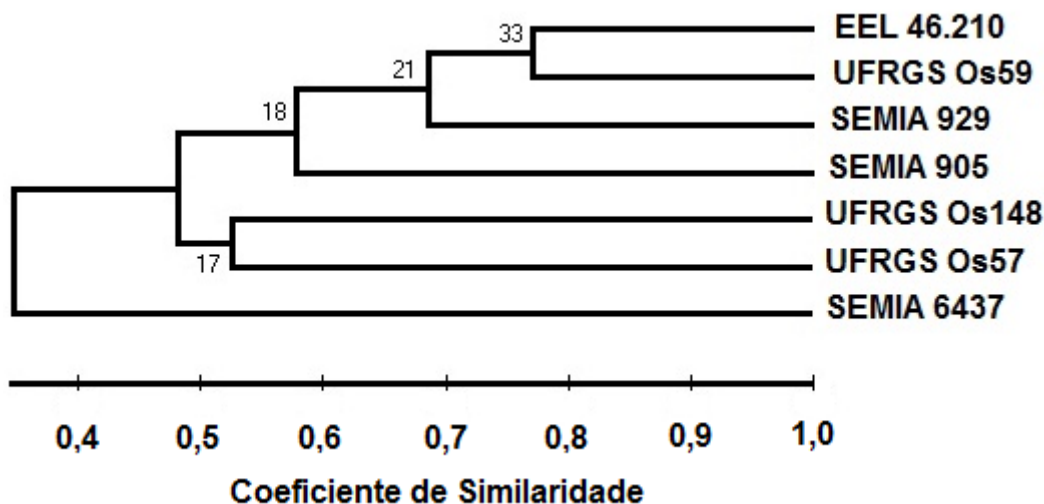
Foram obtidas sequências de comprimento em torno de 250 pares de bases. A comparação das sequências obtidas com sequências homólogas pesquisadas no banco de dados mundial, não gerou recobrimento satisfatório entre a sequência do isolado estudado e a sequência do isolado mais similar, obtida no banco de dados. O comprimento das sequências de pares de bases obtidas foi insuficiente para a obtenção de resultados conclusivos acerca do gênero dos isolados estudados com base no seqüenciamento da região 16S DNAr.

Na figura 5.2 é apresentado o dendrograma de similaridade obtido comparando-se a similaridade entre as sequências de DNA estudadas. O dendrograma foi montado conforme o coeficiente de similaridade (CS). Sequências idênticas correspondem a um CS igual a 1, enquanto CS igual a 0 corresponde a total dissimilaridade entre as sequências. É possível observar que a similaridade entre as sequências obtidas oscilou entre 0,35 e 0,77.

Dentre os isolados de serradela, o UFRGS Os59 foi o que apresentou maior similaridade com a estirpe SEMIA929, por volta de 0,68. A estirpe SEMIA 6437, recomendada para adesmia, foi a mais dissimilar ao restante do grupo, com CS equivalente a 0,35. Com estes resultados pode-se inferir que os isolados EEL 46.210, UFRGS Os57, UFRGS Os59 e UFRGS Os148 diferem genotipicamente entre si, bem como também diferem das estirpes SEMIA 905, SEMIA 929 e SEMIA 6437. Comparações similares foram realizadas por Frizzo

(2007) e Tonon (2008), para se determinar o coeficiente de similaridade do DNA ribossomal de isolados rizobianos de *Lotus corniculatus* e *Lotus* sp. por meio do método UPGMA. As similaridades variaram de 0,23 a 0,90 e 0,10 a 0,40, respectivamente.

As diferenças genótípicas apresentadas na figura 5.2, revelam que os cinco isolados mais promissores do presente estudo, quanto à fixação biológica de nitrogênio e à promoção de crescimento de plantas, são organismos ainda não estudados, diferentes daqueles recomendados na composição de inoculantes rizobianos recomendados para serradela e adesmia. Estes resultados são bastante animadores, pois por meio deles revela-se que os isolados de interesse EEL 46.210, UFRGS Os57, UFRGS Os59 e UFRGS Os148, ainda não foram explorados na composição de inoculantes.



**Figura 5.2.** Dendrograma de similaridade de isolados e estirpes de rizóbios. Agrupamento obtido por UPGMA.

#### 5.4 Conclusões

A inoculação do isolado UFRGS Om57 estimula a massa seca da parte aérea de sorgo, bem como a estirpe SEMIA929 estimula a massa seca da parte aérea de milho.

Existe índice de eficiência relativa (IER %) positivo com o isolado UFRGS Os57 e a estirpe 929 quando inoculados em capim sudão, milho e sorgo forrageiro.

Não houve efeito das inoculações em capim áries.

## 5.5 Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- BACA, B.E. & ELMERICH, C. Microbial production of plant hormones. In: ELMERICH, C. & NEWTON, W.E. **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 113-143, 2003.
- BASET MIA, M.A. SHAMSUDDIN, Z.H. & MAHMOOD, M. Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, p. 3758-3765, 2012.
- BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B; YANNI, Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**. Madison, v. 92, p. 880–886, 2000.
- BROCKWELL, J.; HELY, F.W.; NEAL-SMITH, C.A. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, Tamworth, v. 6, n. 23, p. 365-370, 1966.
- COSTACURTA, A. & VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 21, p. 1–18, 1995.
- DANGAR, T.K.; BASU, P.S. Abscisic acid production in culture by some *Rhizobium* spp. of leguminous trees and pulses. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 36, p. 527-532, 1991.
- DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: DAVIES, P.J. (ed) **Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology**, 2nd Kluwer: Dordrecht, p. 1-12, 1995.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J. & OKON, Y. Plant-Growth-Promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, p. 107-149, 2003.
- FRANKENBERGER, W.T.J & ARSHAD, M. **Phitohormones in soil: microbial production and function**. Dekker: New York, 1995, 503 p.
- FRIZZO, M.L.S. **Seleção e Caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr**. 2007. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- HAHN, L. **Promoção de crescimento de plantas pela inoculação de rizóbios simbiotes em leguminosas e bactérias diazotróficas associativas**. 2013. 175 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação

em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

HAHN, L. et al. Growth promotion in maize with diazotrophic bacteria in succession with ryegrass and white clover. **American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science**, Dubai, v. 14, p. 11-16, 2014.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, Milan, v. 60, p. 579-598, 2010.

MACHADO, R.G. et al. Indoleacetic acid producing *Rhizobia* promote growth of Tanzania grass (*Panicum maximum*) and Pensacola grass (*Paspalum sauriae*). **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, 2013.

MATIRU, V.N.; DAKORA, F.D. Potencial use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. **African Journal of Biotechnology**. Nairobi, v. 3, p. 1-7, 2004.

MISHRA, R. P. N. et al., Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology, New York**, v. 52, p. 383–389. 2006.

MOURA, R.A. et al. 1987. **Técnicas de laboratório**. Atheneu, Rio de Janeiro.

OSORIO FILHO, B.D. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. 2009. 113p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

OSÓRIO FILHO, B.D. et al. Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science**, Dubai, v. 14, p.707-718, 2014.

PATTEN, C.L. & GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p.207–220, 1996.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 26, p. 189-199, 2003.

REDDY, P.M. et al. Rhizobial communication with rice roots: induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. **Plant and Soil**, The Hague, v.194, p. 81-98, 1997.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phitopathologica**, Piracicaba, v.1, n.3, p.231-234, 1975.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, 658-664, 2008.

STROSCHEIN, M.R.D. et al. Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, p. 1738-1743, 2011.

TAN, K.Z. et al. Isolation and characterization of rhizobia and plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on growth of Rice seedlings. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences, New York**, v. 9, p. 342-360, 2014.

TONON, B.C. **Compatibilidade simbiótica e caracterização de rizóbios de *Lotus spp.*, isolados de solos do Rio Grande do Sul**. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

VARGAS, L.K. et al. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 1227-1235, 2009.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p.

YANNI, Y.G. et al. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessments of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, The Hague, v.194, p. 99-114, 1997.

YANNI, Y.G. et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, n.9, p. 845-870, 2001.

ZAHIR, A.Z.; ARSHAD, M. & FRANKENBERGER JR., W.T. Plant growth promoting rhizobacteria: application and perspectives in Agriculture. **Advances in Agronomy, New York**, v. 81, p. 97–168, 2004.



## **6 CAPÍTULO IV - RENDIMENTO À CAMPO DE PLANTAS DE MILHETO, AZEVÉM E TREVO-BRANCO INOCULADAS COM RIZÓBIOS E *Azospirillum* PROMOTORES DECRESCIMENTO DE PLANTAS**

### **Resumo**

Bactérias promotoras de crescimento de plantas são capazes de estimular o crescimento de plantas por meio de mecanismos diretos e indiretos. No presente estudo, foram realizados experimentos a campo visando-se avaliar a promoção de crescimento de plantas de milho, azevém e trevo-branco inoculadas com os rizóbios SEMIA 222 e VP16 e com a mistura das estirpes Abv5 e Abv6 (*Azospirillum brasiliense*). Os experimentos foram conduzidos em área da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, no município de Eldorado do Sul-RS, seguindo um arranjo em fatorial 3x2x4. Em cada espécie estudada, os tratamentos constaram de plantas cultivadas com a adição de doses completas de nitrogênio, equivalentes a 100 kg N.ha<sup>-1</sup> e cultivadas com a adição de metade da dose completa. Todos estes tratamentos foram inoculados com cada um dos rizóbios ou com a mistura de estirpes de *A. brasiliense*. Também foram instalados tratamentos controle sem inoculação. Cada tratamento foi instalado em quatro parcelas, que constituíram as repetições. O experimento teve início no verão de 2012/2013 com o cultivo de milho (cultivar BRS1501) em toda a área, seguido do cultivo de azevém (cultivar Comum), trevo branco (cultivar Zapicán Estanzuela) e do consórcio trevo branco/azevém, tendo duração até o inverno de 2013. No cultivo do milho foram avaliados a massa seca da parte aérea, a altura de plantas, a massa seca e número de panículas e o número de perfilhos, enquanto no experimento com azevém e trevo branco avaliou-se a massa seca e o teor de nitrogênio da parte aérea. Observou-se a produção de maior massa seca da parte aérea em plantas de milho com adição de 50 kg N.ha<sup>-1</sup> inoculadas com VP16 e *A. brasiliense*, tanto nas parcelas cultivadas em área após cultivo de azevém, como em área após o cultivo de trevo branco, comparativamente às plantas do Controle com mesma dose de N. Observou-se maior altura nas plantas de milho inoculadas com a mistura de estirpes de *A. brasiliense* e cultivadas nas parcelas que receberam 50 kg N.ha<sup>-1</sup>, em relação ao Controle com mesma dose de Nitrogênio. A inoculação com a SEMIA 222 e com a mistura de estirpes de *A. brasiliense* em plantas de milho, cultivadas nas parcelas que receberam a adição da dose de 100 kg de N.ha<sup>-1</sup> e após o cultivo do consórcio azevém/trevo branco, promoveu maior massa seca da parte aérea do que nas plantas do tratamento Controle. Em plantas de azevém, tanto em parcelas com cultivo isolado como nas cultivadas em consórcio com trevo branco, não houve efeito da inoculação. Apesar da baixa massa seca da parte

aérea de trevo branco, observou-se que os tratamentos *A. brasiliense* 0 N (100 kg N verão) e VP16 0 N (50 kg N verão) promoveram maior MSPA que o Controle 100 kg N. Os tratamentos SEMIA 222 0 N (50 kg N verão), VP16 0 N (50 kg N verão) e *A. brasiliense* 0 N (50 kg N verão) foram superiores ao Controle 0 N (50 kg N verão) quanto ao incremento da massa seca da parte aérea de trevo branco, sendo os tratamentos SEMIA 222 0 N (50 kg N verão) e *A. brasiliense* + 0 N (50 kg N verão) equivalentes ao Controle 100 kg N.

## 6.1 Introdução

A oferta de pastagens na alimentação de bovinos é a forma mais barata de se fornecer nutrientes e proteínas em sistemas de produção de leite ou carne. As pastagens são no mínimo de 2 a 3 vezes mais baratas do que a alimentação à base de silagem de milho e mais de 10 vezes mais baratas do que alimentos concentrados. Neste sentido, todo o investimento em tecnologias que venham a potencializar o cultivo de pastagens e a tornar esta atividade mais sustentável ecológica ou economicamente, é de grande importância para a bovinocultura de leite ou de corte.

O estado do Rio Grande do Sul é o 2º maior produtor de leite do Brasil (IBGE, 2013) e a maior parte dos agricultores que atuam nesta atividade são agricultores familiares. Sendo assim o cultivo de pastagens também tem um importante papel social, uma vez que devido ao seu baixo custo, é um dos fatores que viabiliza a manutenção dos agricultores familiares no campo. Apesar da grande importância das pastagens para a alimentação de bovinos, no período de vazio outonal, há significativas restrições na oferta de pastagens aos animais, devido à janela existente entre o final do ciclo das pastagens de verão e o insuficiente estabelecimento das pastagens de inverno (Pasciullo et al., 2008). Existem alternativas para reduzir esta janela de escassez de pastagens e suprir esta deficiência periódica, como por exemplo, o armazenamento e o uso estratégico de silagens; o cultivo de espécies melhoradas, as quais tenham um ciclo mais alongado, como é o caso do azevém tetraplóide; a utilização de lotação adequada e o pastejo que respeite o hábito de crescimento das pastagens, através do piqueteamento (Macari et al., 2012).

O investimento na nutrição vegetal também é uma prática recomendada para se vencer esta janela de escassez e neste sentido, desde a década de 70 existe o reconhecimento no Brasil da importância do uso de bactérias

promotoras de crescimento de plantas no auxílio da nutrição e otimização da performance de plantas cultivadas. Porém apenas nos anos 2000, o efeito da inoculação de pastagens com bactérias promotoras do crescimento de plantas passou a ser estudado com mais interesse. Bactérias promotoras de crescimento de plantas são aquelas que por algum mecanismo conhecido e relatado na literatura venham a incrementar o rendimento de plantas cultivadas. Estas bactérias podem auxiliar na captura de nutrientes essenciais às plantas, produzir compostos promotores de crescimentos, ou ainda proteger as superfícies radiculares da colonização por microorganismos patogênicos por meio de competição direta e produção de agentes antimicrobianos (Hayat et al., 2010).

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) é a mais reconhecida das formas pelas quais as bactérias podem favorecer o rendimento das pastagens, podendo ocorrer de forma simbiótica ou associativa. A FBN simbiótica é realizada por rizóbios e ocorre exclusivamente em nódulos, situados nas raízes de leguminosas. Outra forma de FBN é realizada por bactérias associativas pertencentes aos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, as quais fixam nitrogênio atmosférico mesmo em vida livre. Estas bactérias associativas são capazes de colonizar o tecido radicular e a parte aérea de algumas plantas, também fixando N<sub>2</sub> atmosférico no tecido das plantas, porém não formam estruturas especializadas e não são exclusivamente associadas à família Fabaceae (leguminosas).

Outros mecanismos também observados em bactérias promotoras de crescimento de plantas são a produção de uma ampla gama de substâncias fito-estimuladoras, as quais quando na concentração adequada promovem significativos ganhos às plantas. Há referências de substâncias fito-estimuladoras produzidas por bactérias do gênero *Azospirillum* spp. (El-Khawas & Adachi, 1999; Van der Broek & Vanderleyden, 1995;). Os rizóbios também são incluídos neste grupo de promotores de crescimento de plantas, por produzirem substâncias tais como os hormônios do grupo das auxinas (Biswas et al., 2000), citocininas (Persello-Cartieaux et al., 2003), giberelinas (Yanni et al., 2001), ácido abscísico (Dangar & Basu, 1991) e outros compostos fito-estimuladores como lipo-quitooligossacarídeos (LCOs) (Prithiviraj et al., 2003) e lumicromo (Volpin & Phillips, 1998).

O reconhecimento de bactérias que por meio destes mecanismos atuem como promotoras de crescimento de plantas é de grande importância para a aplicação eficiente destas em sistemas de cultivo de pastagens. Pelo fato de haver grande especificidade entre bactéria promotora e planta beneficiada, o estudo da compatibilidade das bactérias, sobretudo dos rizóbios com a planta a ser infectada deve ser realizado detalhadamente, antes da veiculação dos microorganismos a campo, através de inoculantes. Alguns rizóbios mostraram-se eficientes em promover o crescimento de determinada gramínea, porém quando em associação com outra espécie da mesma família, este efeito benéfico desaparece, parecendo haver uma relação de afinidade entre o isolado e a planta (Yanni et al., 2001; Machado et al., 2013; Osório Filho et al., 2014). O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da inoculação de bactérias fixadoras de N sobre três importantes plantas forrageiras do Rio Grande do Sul: o milheto (*Pennisetum glaucum*(L)), o azevém (*Lolium multiflorum*) e o trevo branco (*Trifolium repens* L.), visando-se recomendá-las para composição de inoculantes para estas plantas tanto cultivadas em sistemas de consórcio e/ou sucessão de pastagens.

Com isto, no presente estudo se objetivou avaliar a campo os rizóbios PCP's SEMIA222 e VP16 e as bactérias associativas Abv5 e Abv6 (*Azospirillum*) na interação com as pastagens milheto, azevém e trevo-branco. O estudo faz parte de um projeto maior, já com mais de 3 anos consecutivos de duração, onde estuda-se à campo a interação entre plantas de interesse agrícola e os microorganismos mais promissores, obtidos e/ou previamente aprovados pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Microbiologia Agrícola e do Solo da UFRGS.

## **6.2 Material e Métodos**

Os experimentos foram conduzidos em área da Estação Experimental Agrônômica da UFRGS, no município de Eldorado do Sul-RS, com altitude de 42 m acima do nível do mar, latitude de 30°05'49,87" e longitude de 51°40'49,33". O clima, de acordo com a classificação de Köppen, é subtropical úmido com verão quente, do tipo fundamental Cfa. O solo é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico típico (EMBRAPA, 2006). Na

implantação, as amostras de solo (0-20 cm de profundidade) apresentaram as seguintes características químicas: pH em água 5,6, 280 g kg<sup>-1</sup> de argila, 24 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica, 12,5 mg dm<sup>-3</sup> de fósforo, 76 mg dm<sup>-3</sup> de potássio, 2,6 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de cálcio, 1,1 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de magnésio e 0,5 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de alumínio.

O experimento teve início no verão de 2012/2013 e teve duração até o inverno de 2013. Previamente à instalação do experimento de verão, a área experimental havia sido cultivada com trevo branco (*Trifolium repens*), cultivar Zapicán Estanzuela, azevém (*Lolium multiflorum*), cultivar comum, em cultivo exclusivo e consorciado.

No verão foi semeado milho (*Pennisetum glaucum*), cultivar BRS1501 em toda a área. Em sucessão, devido à impossibilidade de se obter sementes de adesmia ou serradela em quantidades suficientes para se conduzir experimentos a campo, optou-se pelo cultivo de trevo branco (*Trifolium repens*- cultivar Zapicán Estanzuela), e azevém (*Lolium multiflorum* cultivar comum), em cultivo exclusivo e consorciado.

As plantas foram combinadas com duas diferentes doses de N, uma dose correspondente a 100 kg de N.ha<sup>-1</sup> e outra correspondente a 50 kg de N.ha<sup>-1</sup>, assim como três tratamentos de inoculação (SEMIA 222, VP16 e *Azospirillum*) e o controle não inoculado (Controle 1 N e Controle ½ N). Desta forma, o experimento foi arranjado em um fatorial 3x2x4, ou seja, três cultivos com plantas de inverno (trevo branco, azevém ou consórcio), duas doses de N, e três tratamentos inoculados mais controle. No verão, todas as parcelas foram semeadas com milho. Os rizóbios inoculados nas plantas foram: UFRGS VP16, pertencente à Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS, que foi isolado de nódulo de trevo branco e selecionado pela sua alta eficiência de fixação de N (Alves et al., 2012); SEMIA 222, estirpe liberada para produção de inoculantes para *Trifolium repens*, obtida da Coleção de estirpes SEMIA da FEPAGRO-RS. O tratamento *Azospirillum* foi composto pelos isolados Abv5 e Abv6.

Nos tratamentos com azevém em cultivo exclusivo e consorciado com trevo branco, as doses de N foram aplicadas na forma de uréia 30 dias após a emergência e foram equivalentes a 50 kg.ha<sup>-1</sup> e 100 kg.ha<sup>-1</sup>, que corresponde à dose recomendada de N para o azevém, definida com base na análise do solo

de acordo com a SOCIEDADE... (2004). No cultivo exclusivo de trevo branco, somente nas parcelas que receberam o tratamento controle sem inoculação foram aplicados 200 kg.ha<sup>-1</sup> de N (Controle 1 N), sendo este aplicado 30 dias após a emergência. Também foram conduzidas parcelas de trevo branco sem inoculação e sem aplicação de N mineral (Controle 0 N).

No experimento conduzido no verão (2012/2013) foram semeados o equivalente a 22 kg.ha<sup>-1</sup> de sementes de milho. As sementes foram distribuídas manualmente em toda a área no mês de dezembro e incorporadas pela passagem de uma grade leve. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições, tendo as parcelas dimensões de 4,0 m de comprimento por 3,0 m de largura. Nas entrelinhas entre as parcelas foi respeitado o espaço de 0,5 m. As unidades experimentais combinando os fatores de variação cobertura de inverno; inoculação e adubação nitrogenada mineral foram distribuídas na área experimental conforme o esquema da figura 6.1.

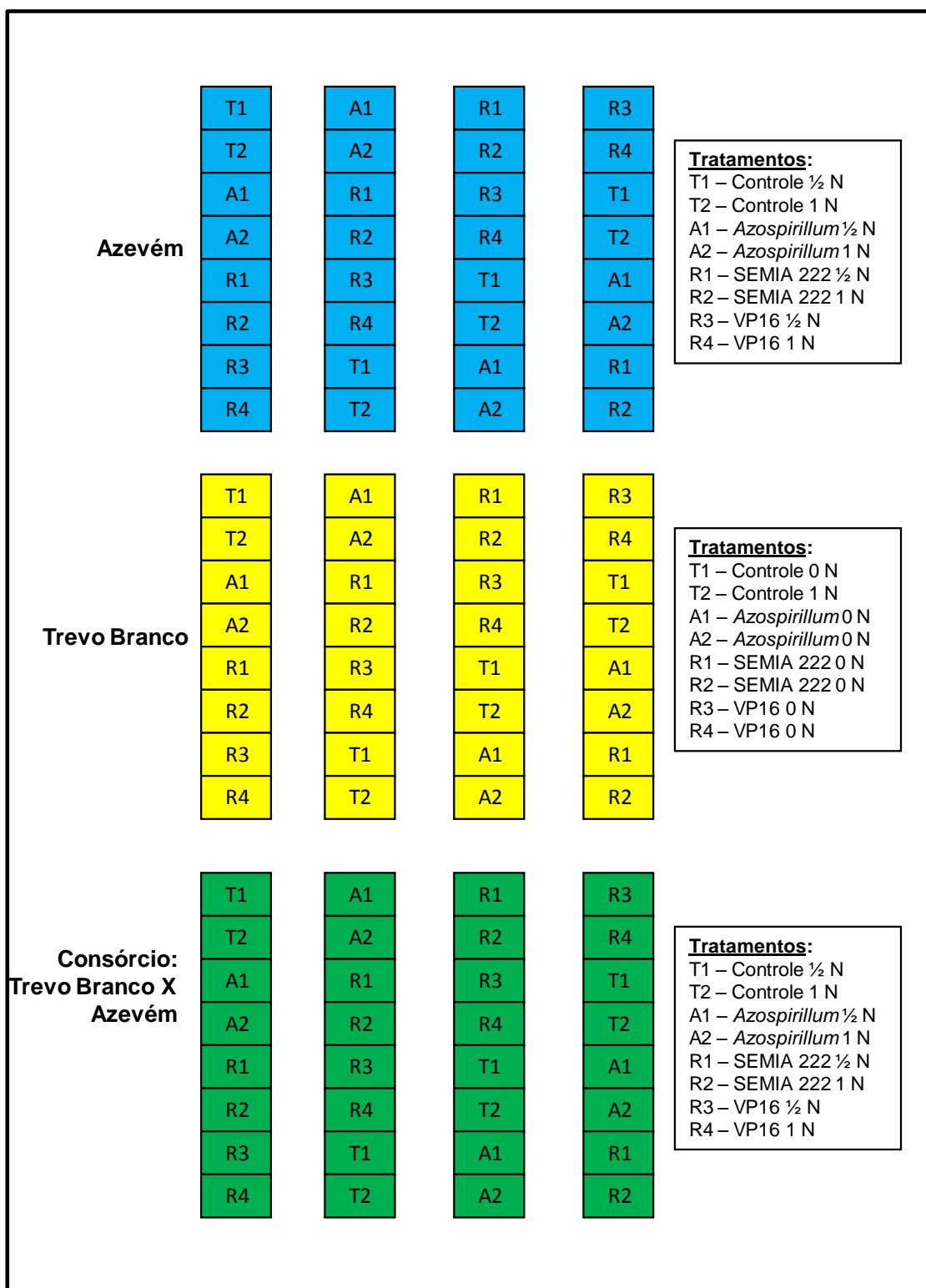
Para a semeadura do experimento de inverno seguiu-se o mesmo procedimento, sendo semeadas quantidades proporcionais a 30 kg.ha<sup>-1</sup> de sementes de azevém e 6 kg.ha<sup>-1</sup> de sementes de trevo branco nos cultivos exclusivos e metade destas quantidades nos consorciados. As sementes foram distribuídas manualmente em toda a área no mês de junho e incorporadas pela passagem de uma grade leve. O delineamento experimental e o tamanho das parcelas foram mantidos os mesmos do experimento anterior.

Para a produção do inóculo, os rizóbios UFRGS Vp16 e SEMIA 222 foram inoculados em erlenmeyers de 250 mL com meio Levedura Manitol líquido (LM) (Vincent, 1970) e estirpes de *Azospirillum* inoculados em erlenmeyers de 250 mL com meio Dygs (Rodrigues Neto et al., 1986) líquido e colocadas em incubador orbital a 28°C, com agitação de 120 rpm por seis dias. Os caldos das bactérias foram misturados em água e aplicados manualmente com regador sobre a área total da parcela logo após a semeadura. Nas parcelas inoculadas com os rizóbios UFRGS Vp16 e SEMIA 222, o inóculo foi feito misturando-se 5 mL de caldo, com 8 x 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>, em 8 L de água, obtendo-se uma suspensão de 5 x 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup> de água, sendo aplicados nas parcelas cerca de 3,3 x 10<sup>8</sup> células por m<sup>2</sup>. Nos tratamentos que receberam a mistura das estirpes de *Azospirillum*, 5 mL do

caldo de cada estirpe, com  $7,5 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ , foram misturados em 8 L de água, obtendo-se uma suspensão de  $9,3 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  de água, sendo que cerca de  $6 \times 10^8$  células foram aplicados por  $\text{m}^2$  de parcela. Alíquotas dos caldos foram retirados previamente para a contagem da concentração de células, realizada em câmara de Neubauer conforme Moura et al. (1987).

No experimento com milho, a colheita foi realizada em fevereiro/2013, com auxílio de uma foice e um esquadro em forma de L, com duas arestas iguais de 50 cm, com o qual se delimitou a área de coleta de  $0,25 \text{ m}^2$ , dentro de cada parcela, de  $12 \text{ m}^2$ . Para se definir a área de coleta, dentro de cada parcela, o esquadro foi arremessado aleatoriamente, evitando-se espaços próximos às bordas das parcelas. Logo após a colheita, avaliou-se o número de perfilhos por planta, número de panículas por parcela e altura média de plantas. As plantas foram então acondicionadas em sacos de algodão e colocadas para secagem até peso constante em estufa a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após, realizou-se a pesagem da massa seca de panículas e massa seca da parte aérea. A determinação da concentração de N na massa seca da parte aérea foi realizada de acordo com Tedesco et al., (1995).

No inverno as avaliações da produção de massa seca da parte aérea e do teor de N da parte aérea das plantas foram realizadas em amostras coletadas em área de  $0,25 \text{ m}^2$  ( $0,50 \times 0,50 \text{ m}$ ) no mês de agosto por corte manual, com auxílio de foice, a dois dedos da superfície do solo. As amostras foram secas em estufa a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  até peso constante e a determinação da concentração de N na massa seca da parte aérea foi realizada de acordo com Tedesco et al., (1995). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de médias (Scott Knott, 5%), utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).



**Figura 6.1.** Representação esquemática da distribuição dos tratamentos em suas respectivas parcelas, combinando os fatores cobertura de inverno; inoculação e adubação nitrogenada mineral.



## 6.3 Resultados e Discussão

### 6.3.1 Resultados observados em milho

No tratamento Controle 1 N, observou-se no milho massa seca de plantas de 31.000 kg.ha<sup>-1</sup> (Tabela 6.1). Esta foi a maior massa seca da parte aérea observada nos tratamentos controle, superando os tratamentos Controle 1 N em sucessão a Trevo Branco e Controle 1 N em sucessão ao Consórcio. Possivelmente este efeito esteja associado à maior quantidade de palhada nas parcelas em sucessão ao azevém isolado. Isto se deve à menor taxa de decomposição da palhada do azevém comparativamente às palhadas de trevo branco e consórcio. Assim sendo, na implantação do milho, a palhada estava mais conservada nas parcelas que haviam sido cultivadas com azevém isolado. No momento da aplicação da uréia aos 30 dias após emergência, esta palhada das parcelas com azevém liberaram os nutrientes que ainda estavam conservados no tecido, favorecendo o crescimento do milho cultivado em sucessão ao azevém. Esta palhada de azevém quando adubada com uréia foi rapidamente decomposta e possivelmente favoreceu o crescimento e desenvolvimento inicial das plantas de milho em sucessão ao azevém, justificando o melhor rendimento dos tratamentos Azevém Controle 1 N, comparativamente aos tratamentos Trevo Branco Controle 1 N e Consórcio Controle 1 N (Tabela 6.1).

Os tratamentos Azevém *Azospirillum* + ½ N e Azevém VP16 + ½ N mostraram-se eficientes, pois superaram os tratamentos Controle com a mesma dose de N e foram equivalentes ao Azevém Controle + 1 N. Adicionalmente foram equivalentes aos respectivos tratamentos inoculados e com dose cheia de N. Isto significa que mediante a inoculação com *Azospirillum* ou VP16, o cultivo de milho em sucessão a azevém com ½ dose de N, apresenta o mesmo rendimento que o cultivo com a dose cheia com ou sem inoculação (Tabela 6.1).

No cultivo de milho em sucessão ao trevo branco, os tratamentos Trevo Branco *Azospirillum* + N e Trevo Branco VP16 + N superaram o Controle 1 N, apresentando média de 36,4 e 33,5 t de massa seca

da parte aérea.ha<sup>-1</sup> respectivamente, enquanto no Controle 1 N foram obtidos 27,6 t de massa seca da parte aérea.ha<sup>-1</sup>. Estes resultados demonstram a eficiência da inoculação de milho com *Azospirillum* ou VP16 também em sucessão ao trevo branco, pois a inoculação incrementou o rendimento de milho adubado com dose cheia de N. Nas parcelas com milho após consórcio também observou-se que o tratamento SEMIA222 + N foi superior ao Controle N quanto ao incremento de MSPA, enquanto a inoculação com VP16 foi inefetiva (Tabela 6.1).

Para o milho após trevo-branco não houve diferença entre ½ dose e dose cheia de N nos tratamentos controle. Os tratamentos inoculados e com ½ dose de N também não diferiram do Controle ½ N. O milho cultivado após consórcio também não apresentou diferença entre os tratamentos controle (Controle 1 N e Controle ½ N) quanto à massa seca da parte aérea. Isto possivelmente deva-se à presença de N remanescente do cultivo anterior com trevo branco, ou seja, em cultivo de milho em sucessão a trevo branco isolado ou em consórcio, não houve prejuízos no rendimento com a supressão de 50 kg N.ha<sup>-1</sup>.

Com a maior produção da massa seca da parte aérea de milho, observada nos tratamentos inoculados com os rizóbios SEMIA 222 e VP16 após diferentes sistemas de sucessão de culturas demonstra, demonstra-se sob diferentes condições a eficiência da inoculação de milho com SEMIA 222 e VP16. Muitos são os mecanismos pelos quais os rizóbios podem incrementar o rendimento das plantas, de forma direta através da produção de fitohormônios (Biswas et al., 2000; Yanni et al., 2001, Persello-Cartieaux et al., 2003) ou ainda de forma indireta pelo aporte de N ao solo por meio da FBN ou ainda por mecanismos de supressão a outros microorganismos por mecanismos de competição por nutrientes, como a produção de siderófos (Le Vier & Guerinot, 1996).

Uma possível explicação para as diferentes reações das espécies de plantas cultivadas à inoculação com um mesmo isolado, é o fato de cada uma delas reagir diferentemente aos mecanismos de promoção de crescimento pelos quais as bactérias atuam. Um bom exemplo disto é o trabalho conduzido por Schlindwein et al. (2008), no qual os autores observaram em estudo *in vitro* o efeito da inoculação de diferentes rizóbios em alface. Os autores

comprovaram que há resposta fisiológica vegetal diferente a diferentes rizóbios, visto que estes produziram auxinas em diferentes concentrações, as quais induziram respostas diferenciadas, enquanto a dose de  $171,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi tóxica às plantas, as doses entre  $1,2$  e  $3,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram estimulantes.

Machado et al. (2013) observaram respostas diferenciadas de quatro diferentes gramíneas forrageiras inoculadas com diferentes rizóbios isolados de *Lotus corniculatus*. Enquanto o capim Tanzânia e a pensacola tiveram incrementos na massa seca da parte aérea quando inoculados, a braquiária e o azevém não responderam às inoculações. No mesmo sentido, Yanni et al. (2001) e Osorio Filho (2014) relatam respostas diferenciadas de cultivares de arroz inoculadas com os mesmos rizóbios, algumas cultivares são mais responsivas à inoculação do que outras. Outra evidência da especificidade entre rizóbio-gramínea foi relatada por Yanni et al. (2001), os quais constataram a produção de bacteriocinas por rizóbios selecionados de arroz, as quais podem estar associadas à inibição de outras estirpes de rizóbios. Deste modo, deve haver compatibilidade entre o rizóbio promotor de crescimento de plantas e a planta cultivada, para que haja algum efeito positivo da inoculação.

No cultivo do milho em sucessão ao azevém, o tratamento *Azospirillum* com  $100 \text{ kg de N.ha}^{-1}$  superou o tratamento controle com mesma dose de N. Também foi observado efeito estimulatório em milho inoculado com *Azospirillum* em sucessão ao trevo branco ou azevém isolados (Tabela 6.1). Outro resultado observado nas plantas de milho inoculadas com *Azospirillum* foi a maior altura de plantas no milho cultivado em sucessão ao consórcio e ao trevo isolado, comparativamente aos tratamentos controle e aos outros tratamentos inoculados. Estes resultados obtidos à campo são bastante relevantes e demonstram a interação positiva entre os isolados Abv5 e Abv6 e a cultivar BRS1501 de milho. Sob os diferentes sistemas de sucessão de pastagens testados houve grande estímulo das plantas de milho inoculadas com os isolados de *Azospirillum* Abv5 e Abv6, sendo estes fortemente recomendados para inoculação da cultivar BRS1501.

Além das substâncias fito-estimuladoras possivelmente produzidas pelas bactérias do gênero *Azospirillum*, também o mecanismo associativo de fixação de  $\text{N}_2$  atmosférico em gramíneas, do qual os rizóbios são desprovidos,

favoreceu o bom rendimento das bactérias do tratamento *Azospirillum* no presente estudo. De acordo com Baldani et al. (1997), organismos diazotróficos associativos têm um enorme potencial, devido às suas habilidades em colonizar a planta inteira e se estabilizar em nichos protegidos de oxigênio ou outros fatores inibitórios, assim o potencial de fixar N destes organismos pode ser expressado ao nível máximo. Em concordância com os resultados do presente estudo, são relatados outros diversos trabalhos que comprovam a interação positiva entre gramíneas e organismos associativos fixadores de N. Hahn et al. (2013) relatou o estímulo no crescimento do híbrido de milho Pioneer 30F53 quando inoculado com *Azospirillum*. Dalla Santa et al. (2004) estudaram os fixadores de N associativos em cevada e atribuem o maior rendimento de grãos à inoculação das sementes com bactérias do gênero *Azospirillum*.

### **6.3.2 Resultados observados em azevém, trevo branco e consórcio**

Na tabela 6.2 observa-se o efeito das inoculações em trevo branco, azevém e consórcio. Não houve efeito da aplicação de N, nem das inoculações sobre o azevém cultivado isoladamente. A ausência de resposta do azevém às inoculações já foi observada em outros estudos, Machado et al. (2013) verificaram que o azevém cv. Comum não respondeu à inoculação de oito diferentes isolados de cornichão (*Lotus corniculatus*). Santos e Sá (2012) também relatam a ausência de resposta das cultivares de azevém Comum e Branquet II à inoculação com rizóbios promotores de crescimento de plantas. Isto demonstra que nem todas as espécies vegetais são responsivas aos mecanismos de promoção de crescimento de plantas pelos quais as bactérias atuam.

Com a quantificação da massa seca de espécies invasoras nas parcelas, observou-se um comportamento diferenciado na interação destas com as pastagens cultivadas. Enquanto obteve-se abundante massa seca da parte aérea de azevém, o trevo branco apresentou dificuldades de estabelecimento. Todas as parcelas cultivadas com azevém ou consórcio apresentaram proporção de massa seca da parte aérea de espécies cultivadas (azevém + trevo branco) superior a 95%. Isto se deve ao rápido

estabelecimento e alta competitividade do azevém após semeadura. Este comportamento do azevém impediu o surgimento de espécies invasoras.

Por outro lado, em decorrência da competição com o azevém e com as invasoras, o trevo branco teve o crescimento prejudicado, apresentando massa seca da parte aérea muito inferior às outras espécies (Tabela 6.2). Isto prejudicou o estudo da interação das bactérias com a leguminosa, bem como o estudo do consórcio trevo branco x azevém, pois para todos os tratamentos a massa seca da parte aérea de trevo branco foi mínima, não havendo diferença entre os tratamentos do consórcio (Tabela 6.2). Tal comportamento é relatado por Scheffer-Basso et al., 2002, segundo os quais o trevo branco quando em consórcio apresenta capacidade de povoamento lenta porém crescente, tornando-se mais competitivo com o passar do tempo. O trevo branco destina suas reservas iniciais para a formação de caules e raízes, tendo crescimento folhar nas primeiras semanas após semeadura. Esta lentidão no estabelecimento inicial das folhas de trevo branco permitiram a emergência de espécies invasoras, as quais suprimiram o crescimento inicial e conseqüentemente a competitividade e formação de massa seca da parte aérea da leguminosa (Tabela 6.2).

Apesar do fraco estabelecimento, foi possível observar que no cultivo de trevo branco isolado, as inoculações com VP16 e *Azospirillum* associadas à dose cheia de N (no milho cultivado no verão) superaram o tratamento Controle N. Adicionalmente, os tratamentos *Azospirillum* ½ N, SEMIA222 ½ N e VP16 ½ N diferiram positivamente do tratamento Controle com a mesma dose de N no verão. Estes resultados indicam que mesmo sob condição de estresse por competitividade com outras plantas, a inoculação traz benefícios ao trevo branco (Tabela 6.2).

Na Tabela 6.3 são apresentados os dados referentes ao teor de N nas folhas das pastagens cultivadas no inverno. O teor de N nas folhas de azevém variou de 2,56 a 3,49%, enquanto que em folhas de trevo branco variou de 1,63 no tratamento Trevo Branco Controle 0 N para 6,54 no tratamento Consórcio SEMIA 222 (1/2 N no verão). Os maiores valores de N na parte aérea das pastagens foram observados nas parcelas com azevém isolado e consórcio, variando de 54,2 kg N.ha<sup>-1</sup> a 80,9 kg N.ha<sup>-1</sup> (Tabela 6.3). Apesar da grande variação no teor de N na parte aérea de trevo branco, estes valores não

tiveram grande repercussão no teor de N total.ha<sup>-1</sup>, visto que a massa da leguminosa nas parcelas foi pouco significativa.

O trevo branco é uma leguminosa de hábito de crescimento estolonífero e perene, não havendo necessidade de ressemeadura a cada cultivo. Deste modo, em condições de campo, após seu estabelecimento e caso pastejado na altura correta, o trevo branco tem o rebrote natural e competitivo, o que traria grandes repercussões positivas quanto à oferta de proteína aos animais e ao aporte de N ao solo e às pastagens consorciadas. Este aporte de N usualmente varia de 85 a 350 kg. ha<sup>-1</sup>. ano<sup>-1</sup> (Ledgard et al., 1990).

**Tabela 6.1.** Rendimento de plantas de milheto, cultivadas em sucessão a azevém, trevo branco ou consórcio, inoculadas com diferentes organismos fixadores de N e promotores de crescimento de plantas. MSPA: massa seca da parte aérea; MS: massa seca.

Tratamento	Massa Seca Parte Aérea (kg/ha)	Massa Seca Panículas (kg/ha)	Massa Seca da Parte Aérea Total (kg/ha)	Altura de Plantas (cm)	Perfilhos. planta <sup>-1</sup>	Panículas. parcela <sup>-1</sup>
Azevém - Controle N	31.000 a	2.600 n.s.	33.600 a	286 a	1,65 n.s.	854 n.s.
Azevém - <i>Azospirillum</i> + 1/2 N	30.800 a	3.200	34.000 a	290 a	1,55	1.022
Azevém - <i>Azospirillum</i> + N	29.600 a	3.520	33.120 a	269 a	1,60	1.310
Azevém - SEMIA222 + 1/2 N	19.120 b	3.000	22.120 b	246 b	1,30	1.142
Azevém - SEMIA222 + N	24.200 b	2.200	26.400 b	282 a	1,60	878
Azevém - VP16 + 1/2 N	36.800 a	2.520	39.320 a	266 a	2,15	1.152
Azevém - VP16 + N	41.720 a	3.320	45.040 a	292 a	1,55	1.334
Azevém - Controle 1/2 N	22.520 b	1.400	23.920 b	259 a	1,75	830
Trevo Branco - Controle N	24.800 b	2.800	27.600 b	271 a	1,50	1.728
Trevo Branco - <i>Azospirillum</i> + 1/2 N	23.800 b	2.120	25.920 b	271 a	1,65	1.296
Trevo Branco - <i>Azospirillum</i> + N	32.400 a	4.000	36.400 a	252 a	1,70	1.358
Trevo Branco - SEMIA222 + 1/2 N	19.800 b	1.720	21.520 b	243 b	1,80	926
Trevo Branco - SEMIA222 + N	24.000 b	1.920	25.920 b	229 b	1,70	1.176
Trevo Branco - VP16 + 1/2 N	15.200 b	1.320	16.520 b	239 b	1,70	566
Trevo Branco - VP16 + N	29.920 a	3.600	33.520 a	223 b	2,05	1.190
Trevo Branco - Controle 1/2 N	19.000 b	2.120	21.120 b	240 b	1,85	806
Consórcio - Controle N	20.520 b	1.800	22.320 b	206 b	1,40	1.142
Consórcio - <i>Azospirillum</i> + 1/2 N	13.200 b	1.600	14.800 b	272 a	1,35	1.046
Consórcio - <i>Azospirillum</i> + N	28.720 a	2.320	31.040 a	190 b	1,50	840
Consórcio - SEMIA222 + 1/2 N	15.200 b	1.520	16.720 b	236 b	1,50	1.118
Consórcio - SEMIA222 + N	26.720 a	2.400	29.120 a	197 b	1,80	1.848
Consórcio - VP16 + 1/2 N	14.400 b	2.000	16.400 b	195 b	1,50	1.310
Consórcio - VP16 + N	15.920 b	1.800	17.720 b	233 b	2,00	1.080
Consórcio - Controle 1/2 N	16.720 b	800	17.520 b	207 b	1,50	1.464
CV (%)	48,39	70,26	47,5	17,44	29,64	24,78

Valores seguidos por mesma letra na coluna, não diferem entre si a 15% de significância. n. s.: Diferença não significativa na coluna.

**Tabela 6.2.** Rendimento de plantas de azevém e trevo branco cultivadas isoladamente ou em consórcio após milho, inoculadas com diferentes organismos fixadores de N e promotores de crescimento de plantas. Valores seguidos por mesma letra na coluna, não diferem entre si a 15% de significância. MS: Massa seca da parte aérea.

Tratamento	Massa Seca de Azevém (Kg.ha <sup>-1</sup> ) <sup>n.s.</sup>	Massa Seca de Trevo Branco (Kg.ha <sup>-1</sup> )	Massa Seca de Invasoras (Kg.ha <sup>-1</sup> )	Espécie(s) Cultivada(s) (%)
Azevém Controle 1/2 N	2.359,60	-	15,92 b	99,3
Azevém Controle N	2.272,40	-	12,64 b	99,4
Azevém <i>Azospirillum</i> 1/2 N	2.232,80	-	11,00 b	99,5
Azevém <i>Azospirillum</i> N	2.389,60	-	54,48 b	97,8
Azevém SEMIA222 1/2 N	2.196,40	-	76,56, b	96,6
Azevém SEMIA222 N	2.322,40	-	32,12 b	98,6
Azevém VP16 1/2 N	2.461,60	-	14,44 b	99,4
Azevém VP16 N	2.272,00	-	2,72 b	99,9
Trevo Branco Controle 1/2 N	-	48,20 c	141,60 a	25,4
Trevo Branco Controle N	-	86,72 b	231,20 a	27,3
Trevo Branco <i>Azospirillum</i> 1/2 N	-	68,84 b	146,32 a	32,0
Trevo Branco <i>Azospirillum</i> N	-	138,44 a	122,80 a	53,0
Trevo Branco SEMIA222 1/2 N	-	93,16 b	68,32 b	57,7
Trevo Branco SEMIA222 N	-	58,72 b	250,0 a	19,0
Trevo Branco VP16 1/2 N	-	101,20 b	144,96 a	41,1
Trevo Branco VP16 N	-	147,12 a	175,4 a	45,6
Consórcio Controle 1/2 N	2.092,80	7,76 c	11,72 b	99,4
Consórcio Controle N	2.182,00	6,84 c	23,32 b	98,9
Consórcio <i>Azospirillum</i> 1/2 N	2.317,20	1,76 c	19,96 b	99,1
Consórcio <i>Azospirillum</i> N	2.262,40	14,56 c	32,04 b	98,6
Consórcio SEMIA222 1/2 N	2.466,40	12,76 c	3,48 b	99,9
Consórcio SEMIA222 N	2.208,80	9,36 c	40,52 b	98,2
Consórcio VP16 1/2 N	2.093,20	9,96 c	5,74 b	99,7
Consórcio VP16 N	2.154,00	6,36 c	4,00 b	99,8
<b>CV (%)</b>	<b>18,23</b>	<b>82,60</b>	<b>137,89</b>	

Valores seguidos por mesma letra na coluna, não diferem entre si a 15% de significância. n. s.: Diferença não significativa na coluna



**Tabela 6.3.** Teores de N na folha em plantas de azevém e trevo branco e teor de N.ha<sup>-1</sup> encontrado em folhas de azevém e trevo branco nos diferentes tratamentos.

<b>Tratamento</b>	<b>% N em Folhas de Azevém</b>	<b>% N em Folhas de Trevo Branco</b>	<b>Kg N ha<sup>-1</sup></b>
Azevém Controle 1/2 N	2,74	-	64,65a
Azevém Controle N	2,49	-	56,58 a
Azevém <i>Azospirillum</i> 1/2 N	2,70	-	60,29a
Azevém <i>Azospirillum</i> N	2,55	-	60,93a
Azevém SEMIA222 1/2 N	2,79	-	61,28a
Azevém SEMIA222 N	2,35	-	54,58a
Azevém VP16 1/2 N	2,81	-	69,17a
Azevém VP16 N	2,82	-	64,07a
Trevo Branco Controle 0 N	-	1,63	0,79b
Trevo Branco Controle N	-	2,69	2,33b
Trevo Branco <i>Azospirillum</i> 0 N	-	2,21	1,52b
Trevo Branco <i>Azospirillum</i> N	-	2,59	3,59b
Trevo Branco SEMIA222 0 N	-	2,59	2,41b
Trevo Branco SEMIA222 N	-	3,06	1,80b
Trevo Branco VP16 0 N	-	3,07	3,11b
Trevo Branco VP16 N	-	3,30	4,85b
Consórcio Controle 1/2 N	2,92	2,65	61,32a
Consórcio Controle N	2,61	2,25	57,10a
Consórcio <i>Azospirillum</i> 1/2 N	3,49	1,42	80,89a
Consórcio <i>Azospirillum</i> N	2,57	2,97	79,39a
Consórcio SEMIA222 1/2 N	3,14	6,54	78,27 a
Consórcio SEMIA222 N	2,56	3,91	56,92 a
Consórcio VP16 1/2 N	2,56	6,21	54,21a
Consórcio VP16 N	2,59	2,34	55,94a
<b>CV (%)</b>			<b>55,57</b>

Valores seguidos por mesma letra na coluna, não diferem entre si a 15% de significância.

## 6.4 Conclusões

A inoculação de *Azospirillum* (Abv5 e Abv6), VP16 e SEMIA 222 incrementa a massa seca de milho, sendo o tratamento *Azospirillum* efetivo na promoção de crescimento de milho em todas as condições de sucessão de culturas avaliadas.

Não houve efeito das inoculações em aveia.

Apesar da pouca produção de massa seca de plantas de trevo branco, também se verifica incremento quando inoculado com *Azospirillum* (Abv5 e Abv6), VP16 e SEMIA 222.

## 6.5 Referências Bibliográficas

- ALVES, J. B.; SÁ, E. L. S.; MUNIZ, A. L. Seleção de rizóbios para o *Trifolium repens* em condições de solo alagado. **Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n. 1, p. 39-45, 2012.
- BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, n. 5-6, p. 911-922, 1997.
- BISWAS, J. C. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, n. 5, p. 880–886, 2000.
- DALLA SANTA, O. R. et al. *Azospirillum* sp. Inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 6, p. 843-850, 2004.
- DANGAR, T. K.; BASU, P. S. Abscisic acid production in culture by some *Rhizobium* spp. of leguminous trees and pulses. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 36, n.6 , p. 527-532, 1991.
- EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 28, n. 4, p. 377–381, 1999.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, 2006. 306 p.
- FERREIRA, D. F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 2000. 145 p.
- HAHN, L. **Promoção de crescimento de plantas pela inoculação de rizóbios simbiotes em leguminosas e bactérias diazotróficas associativas**. 2013. 175 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação

em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579-598, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Indicadores IBGE - Estatística da Produção Pecuária**. [Brasília]: IBGE, 2013. 49 p.

LEDGARD, S. F.; BRIER, G. J.; UPSDELL, M. P. Effect of clover cultivar on production and nitrogen fixation in clover-ryegrass swards under dairy cow grazing. **New Zealand Journal of Agriculture Research**, Wellington, v. 33, n. 2, p. 243-249, 1990.

LE VIER, K.; GUERINOT, M. L. The Bradyrhizobium japonicum fegA gene encodes an iron regulated outer membrane protein with similarity to hydroxamate-type siderophore receptors. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 24, p. 7265-7275, 1996.

MACARI, A. et al. **Curso bovinos de leite**. 2. ed. Porto Alegre: Emater/RS-ASCAR, 2012. 89 p.

MACHADO, R. G. et al. Indoleacetic acid producing *Rhizobium* promote growth of Tanzania grass (*Panicum maximum*) and Pensacola grass (*Paspalum sauriae*). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 15, n. 5, p. 827-834, 2013.

MOURA, R. A. et al. **Técnicas de laboratório**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1987.

OSÓRIO FILHO, B. D. et al. Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science**, v. 14, n. 8, p. 707-718, 2014.

PASCIULLO, D. S. C. et al. Disponibilidade de matéria seca, composição química e consumo de forragem em pastagem de capim-elefante nas estações do ano. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 4, p. 904-910, 2008.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 189-199, 2003.

PRITHIVIRAJ, B. et al. A host-specific bacteria-to-plant signal molecule (Nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants. **Planta**, Berlin, v. 216, n. 3, p. 437-445, 2003.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri. tipo B. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

SANTOS, N. S.; SÁ, E. L. S. Promoção de crescimento em azevém e festuca inoculadas com rizóbios selecionados para cornichão (*Lotus corniculatus*). In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 24., 2012, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

SCHEFFER-BASSO, S. M. et al. Comportamento de leguminosas (*Adesmia*, *Lotus*, *Trifolium*) em mistura com festuca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2197-2203, 2002.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre germinação e o vigor de plântulas de alface. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 658-664, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre, SBCS: Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400 p.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, planta e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174 p.

VAN DER BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Review: genetics of the *Azospirillum*-plant root association. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 14, n. 5, p. 445-446, 1995.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blacwell Scientific, 1970. 164 p.

VOLPIN, H.; PHILLIPS, D. A. Respiratory elicitors from *Rhizobium meliloti* affect intact alfalfa roots. **Plant Physiology** v. 116, n. 2, p. 777-783, 1998.

YANNI, Y. G. et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, n. 9, p. 845-870, 2001.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

Os rizóbios UFRGS Om57, UFRGS Om59 e UFRGS Om148 são os mais eficientes quanto à nodulação, fixação de N e incremento da massa seca de serradela, comparativamente a tratamentos controle e às SEMIAS905 e 929. Nos estudos de inoculação de rizóbios em adesmia, os isolados EEL46210 e EEL1010 mostram-se os de melhor rendimento, com os mais significativos incrementos de massa fresca total e comprimento da parte aérea, comparativamente ao tratamento Controle + N e às estirpes recomendadas SEMIA 3007, SEMIA 6437 e SEMIA 6438.

Por meio de mecanismos complementares à fixação biológica de nitrogênio, o isolado UFRGS Om57 incrementa a massa seca total de sorgo. Isto fica evidente ao se observar o índice de eficiência relativa de 179%, obtido com a inoculação do UFRGS Om57 em sorgo. Com o isolado de adesmia EEL46210 também se verifica índice de eficiência relativa acima de 100% em sorgo, o que evidencia a possibilidade de se suprimir em 50% a adubação nitrogenada mineral, sem prejuízos quanto à massa seca total do sorgo forrageiro cv. BRS810, quando inoculado com os rizóbios UFRGS Om57 e EEL 46210. Apesar do baixo desempenho quanto à FBN em serradela, a estirpe SEMIA 929 incrementa a massa seca da parte aérea, a massa seca radicular e a altura aos 15 dias após emergência da variedade cv. BRS1503 de milho, mostrando-se uma boa promotora de crescimento para esta variedade.

Além destes resultados obtidos com as inoculações dos rizóbios em gramíneas cultivadas, é possível verificar efeitos variados quanto à interação rizóbios x gramíneas. Enquanto o sorgo e o milho são estimulados com as

inoculações de determinados rizóbios, o capim áries mostra-se indiferente e estas variações parecem estar relacionadas à especificidade. A especificidade entre rizóbios e gramíneas possivelmente esteja associada aos mecanismos diretos de promoção de crescimento de plantas, como a produção de fitohormônios.

Nos estudos à campo são observados estímulos na massa seca da parte aérea de milho inoculado com SEMIA222, VP16 e *A. brasilense*, após cultivo de azevém e trevo branco. Em trevo branco, também são observados estímulos na massa seca da parte aérea com a inoculação de *A. brasilense*, VP16 e SEMIA222, comparativamente a tratamentos controle. Com estes resultados, os rizóbios VP16 e SEMIA 222, bem como a mistura de *A. brasilense* (Abv5 e Abv6) são indicados como promotores de crescimento de milho (cultivar BRS1501) e recomendados para inoculações a campo.

## **APÊNDICES**

**Apêndice I.** Caracterização fenotípica dos isolados obtidos para serradela. O parâmetro Tempo (Dias) se refere ao tempo transcorrido até a avaliação final das colônias. Todas as colônias apresentaram formato côncavo e borda regular, assim estas características não são apresentadas na tabela.

Isolado	Tempo (Dias)	Cor	Altura	Diâmetro (mm)	Consistência	Opacidade	Forma	Localidade
UFRGS Om1	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om2	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om3	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om4	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om5	4	Leitosa	Côncava	4	Aquosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om6	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om7	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om8	4	Leitosa	Côncav	4	Aquosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om9	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om10	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om11	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om12	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om13	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om14	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om15	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om16	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om17	10	Leitosa	Côncava	< 1	Gomosa	Translúcida	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om18	10	Leitosa	Côncava	< 1	Gomosa	Translúcida	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om19	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om20	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om21	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha



Continuação...

<b>Isolado</b>	<b>Tempo (Dias)</b>	<b>Cor</b>	<b>Altura</b>	<b>Diâmetro (mm)</b>	<b>Consistência</b>	<b>Opacidade</b>	<b>Forma</b>	<b>Localidade</b>
UFRGS Om22	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om23	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om24	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om25	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om26	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om27	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om28	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om29	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om30	4	Rosada	Côncava	4	Viscosa	Opaca	Circular	Palmeira das Missões
UFRGS Om31	10	Rosada	Côncava	1 a 2	Aquosa	Opaca	Circular	Palmeira das Missões
UFRGS Om32	10	Leitosa	Côncava	1	Gomosa	Opaca	Circular	Porto Alegre
UFRGS Om33	10	Transparente	Côncava	< 1	Aquosa	Translucida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om34	10	Rosada	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	São Martinho da Serra
UFRGS Om35	4	Rosada	Côncava	4	Gomosa	Opaca	Circular	Passo Fundo-RS
UFRGS Om36	10	Rosada	Côncava	1 a 2	Aquosa	Opaca	Circular	Palmeira das Missões
UFRGS Om37	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om38	10	Leitosa	Côncava	< 1	Gomosa	Translucida	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om39	10	Rosada	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	São Martinho da Serra
UFRGS Om40	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om41	10	Leitosa	Côncava	< 1	Gomosa	Translucida	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om42	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om43	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translucida	Puntiforme	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om44	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om45	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om46	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar

Continuação...

<b>Isolado</b>	<b>Tempo (Dias)</b>	<b>Cor</b>	<b>Altura</b>	<b>Diâmetro (mm)</b>	<b>Consistência</b>	<b>Opacidade</b>	<b>Forma</b>	<b>Localidade</b>
UFRGS Om47	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om48	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om49	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om50	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om51	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om52	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om53	3 a 4	Rosada	Côncava	4	Gomosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om54	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om55	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om56	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om57	10	Leitosa	Côncava	<1	Gomosa	Translúcida	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om58	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om59	10	Transparente	Côncava	<1	Gomosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om60	10	Transparente	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om61	10	Transparente	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om62	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om63	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om64	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om65	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om66	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om67	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om68	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om69	10	Transparente	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om70	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om71	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha

Continuação ...

<b>Isolado</b>	<b>Tempo (Dias)</b>	<b>Cor</b>	<b>Altura</b>	<b>Diâmetro (mm)</b>	<b>Consistência</b>	<b>Opacidade</b>	<b>Forma</b>	<b>Localidade</b>
UFRGS Om72	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om73	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om74	10	Leitosa	Côncava	< 1	Gomosa	Translucida	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om75	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om76	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translucida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om77	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translucida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om78	4	Leitosa	Côncava	4	Aquosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om79	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om80	4	Leitosa	Côncava	4	Aquosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om81	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om82	4	Leitosa	Côncava	4	Aquosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om83	4	Leitosa	Côncava	4	Aquosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om84	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om85	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translucida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om86	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translucida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om87	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om88	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om89	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om90	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om91	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om92	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om93	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om94	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om95	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar

Continuação...

<b>Isolado</b>	<b>Tempo (Dias)</b>	<b>Cor</b>	<b>Altura</b>	<b>Diâmetro (mm)</b>	<b>Consistência</b>	<b>Opacidade</b>	<b>Forma</b>	<b>Localidade</b>
UFRGS Om96	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om97	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om98	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om99	10	Rosada	Côncava	1 a 2	Aquosa	Opaca	Circular	Palmeira das Missões
UFRGS Om100	3 a 4	Rosada	Côncava	3	Aquosa	Opaca	Circular	Palmeira das Missões
UFRGS Om101	3 a 4	Rosada	Côncava	3	Gomosa	Opaca	Circular	Passo Fundo
UFRGS Om102	3 a 4	Rosada	Côncava	3	Gomosa	Opaca	Circular	Passo Fundo
UFRGS Om103	3 a 4	Rosada	Côncava	3	Gomosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om104	10	Leitosa	Côncava	1	Gomosa	Opaca	Circular	Porto Alegre
UFRGS Om105	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om106	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om107	3 a 4	Rosada	Côncava	3	Gomosa	Opaca	Circular	Passo Fundo
UFRGS Om108	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om109	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om110	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om111	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om112	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om113	3 a 4	Rosada	Côncava	3	Gomosa	Opaca	Circular	Passo Fundo
UFRGS Om114	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Translucida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om115	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translucida	Puntiforme	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om116	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translucida	Puntiforme	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om117	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translucida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om118	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translucida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om119	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translucida	Puntiforme	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om120	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translucida	Puntiforme	Santa Vitória do Palmar

Continuação...

<b>Isolado</b>	<b>Tempo (Dias)</b>	<b>Cor</b>	<b>Altura</b>	<b>Diâmetro (mm)</b>	<b>Consistência</b>	<b>Opacidade</b>	<b>Forma</b>	<b>Localidade</b>
UFRGS Om121	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om122	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om123	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om124	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om125	3 a 4	Rosada	Côncava	4	Gomosa	Opaca	Circular	Passo Fundo
UFRGS Om126	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om127	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Santa Vitória do Palmar
UFRGS Om128	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om129	8	Rosada	Côncava	1	Gomosa	Opaca	Circular	Porto Alegre
UFRGS Om130	8	Rosada	Côncava	1	Gomosa	Opaca	Circular	Porto Alegre
UFRGS Om131	4	Rosada	Côncava	4	Viscosa	Opaca	Circular	Palmeira das Missões
UFRGS Om132	4	Leitosa	Côncava	3 e 4	Aquosa	Opaca	Circular	Correia Pinto
UFRGS Om133	10	Leitosa	Côncava	<1	Gomosa	Opaca	Puntiforme	Correia Pinto
UFRGS Om134	10	Leitosa	Côncava	<1	Gomosa	Opaca	Puntiforme	Correia Pinto
UFRGS Om135	10	Leitosa	Côncava	<1	Viscosa	Translúcida	Circular	Palmeira das Missões
UFRGS Om136	10	Leitosa	Côncava	<1	Gomosa	Translúcida	Circular	Correia Pinto
UFRGS Om137	3 a 4	Rosada	Côncava	3	Gomosa	Opaca	Circular	Passo Fundo
UFRGS Om138	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om139	10	Leitosa	Côncava	<1	Gomosa	Opaca	Puntiforme	Correia Pinto
UFRGS Om140	10	Leitosa	Côncava	1 a 2	Gomosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om141	10	Leitosa	Côncava	<1	Butirosa	Translúcida	Circular	Correia Pinto
UFRGS Om142	10	Leitosa	Côncava	<1	Aquosa	Translúcida	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om143	10	Leitosa	Côncava	< 1	Aquosa	Opaca	Puntiforme	Cachoeirinha
UFRGS Om144	10	Leitosa	Côncava	<1	Gomosa	Opaca	Puntiforme	Correia Pinto
UFRGS Om145	3 a 4	Rosada	Côncava	3	Gomosa	Opaca	Circular	Passo Fundo

Continuação...

<b>Isolado</b>	<b>Tempo (Dias)</b>	<b>Cor</b>	<b>Altura</b>	<b>Diâmetro (mm)</b>	<b>Consistência</b>	<b>Opacidade</b>	<b>Forma</b>	<b>Localidade</b>
UFRGS Om146	10	Transparente	Côncav	<1	Aquosa	Translucida	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om147	3 a 4	Leitosa	Côncava	4	Aquosa	Opaca	Circular	Cachoeirinha
UFRGS Om148	10	Leitosa	Côncava	<1	Gomosa	Translucida	Circular	Cachoeirinha

**Apêndice II.** Características dos isolados de *Adesmia latifolia* obtidos no presente estudo.

Isolado	Localidade	Forma	Borda	Cor	Concavidade	Opacidade	Consistência	Tempo de Crescimento (Dias)	Diâmetro (mm)	Reação ao pH
UFRGS AI1	Eldorado do Sul	Puntiforme	Regular	Rosada	Côncava	Opaca	Butirosa	8	< 1	ácido
UFRGS AI2	Eldorado do Sul	Puntiforme	Regular	Rosada	Côncava	Opaca	Butirosa	8	< 1	ácido
UFRGS AI3	Eldorado do Sul	Puntiforme	Regular	Rosada	Côncava	Opaca	Butirosa	8	< 1	ácido
UFRGS AI4	Eldorado do Sul	Puntiforme	Regular	Rosada	Côncava	Opaca	Butirosa	8	< 1	ácido
UFRGS AI5	Eldorado do Sul	Puntiforme	Regular	Rosada	Côncava	Opaca	Butirosa	8	< 1	ácido
UFRGS AI6	Eldorado do Sul	Circular	Regular	Rosada	Côncava	Opaca	Gomosa	8	< 1	alcalino
UFRGS AI7	Eldorado do Sul	Circular	Regular	Rosada	Côncava	Opaca	Gomosa	8	< 1	alcalino
UFRGS AI8	Eldorado do Sul	Circular	Regular	Rosada	Côncava	Opaca	Gomosa	8	< 1	alcalino
UFRGS AI9	Eldorado do Sul	Circular	Regular	Leitosa	Côncava	Translúcida	Butirosa	3	<1 a 2	alcalino
UFRGS AI10	Eldorado do Sul	Circular	Regular	Leitosa	Côncava	Translúcida	Butirosa	3	<1 a 2	alcalino
UFRGS AI16	Eldorado do Sul	Circular	Regular	Rosada	Côncava	Translúcida	Gomosa	8	<= 1	ácido
UFRGS AI17	Eldorado do Sul	Circular	Regular	Rosada	Côncava	Opaca	Gomosa	8	< 1	ácido
UFRGS AI18	Eldorado do Sul	Circular	Regular	Leitosa	Côncava	Translúcida	Gomosa	4	3 a 4	ácido
UFRGS AI19	Correia Pinto	Puntiforme	Regular	Rosada	Côncava	Translúcida	Butirosa	8	< 1	ácido
UFRGS AI20	Correia Pinto	Puntiforme	Regular	Rosada	Côncava	Translúcida	Butirosa	8	< 1	ácido
UFRGS AI21	Correia Pinto	Puntiforme	Regular	Rosada	Côncava	Translúcida	Butirosa	8	< 1	ácido
UFRGS AI22	Correia Pinto	Puntiforme	Regular	Rosada	Côncava	Translúcida	Butirosa	8	< 1	ácido

**Apêndice III.** Procedimentos adotados para a extração do DNA ribossomal da região 16S das estirpes estudadas.

- \* suspenderam-se alíquotas de 1,5 mL da cultura em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e centrifugou-se por 5 minutos a 12.000 rpm;
- \* foi descartado o sobrenadante e adicionado 700 µL de TES (Apêndice IV). O material foi homogeneizado em *vórtex* e centrifugado por 3 minutos a 12.000 rpm;
- \* mais uma vez foi descartado o sobrenadante e o pellet foi suspenso em 500 µL de TE1 (Apêndice IV);
- \* foi feita nova homogeneização em *vórtex*, seguida por centrifugação por 3 minutos a 12.000 rpm;
- \* adicionou-se 25 µL de Lisozima (20mg/mL) incubou-se a 37°C por 30 minutos;
- \* posteriormente foram adicionados 108 µL de SDS 20% e 3 µL de Proteinase K (20mg/mL), seguido de incubação a 56°C por 15 minutos, após a incubação, o material foi esfriado à temperatura ambiente;
- \* após, para precipitação dos substratos associados ao SDS, foram adicionados 200 µL de NH<sub>4</sub>Ac 8M, os tubos de microcentrífuga foram cuidadosamente e manualmente invertidos, para posterior “descanso” no gelo, por 20 minutos;
- \* as amostras foram retiradas do gelo e centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm;
- \* após, todo o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e vertido em outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL;
- \* para desproteinização da amostra foi adicionado 1 volume de Fenol-clorofórmio, o tubo de microcentrífuga foi e invertido manual e cuidadosamente, até que todo volume se homogeneizar;
- \* o material foi centrifugado por 5 minutos a 5.000 rpm e sua fase aquosa coletada com pipeta;



- \* para a remoção dos restos de fenol foi adicionado 1 volume de Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24:1) e os tubos de microcentrífugas foram manualmente invertidos até a homogeneização de todo o volume;
- \* o material foi centrifugado por 5 minutos a 5.000 rpm e foi coletada a fase aquosa com pipeta;
- \* para precipitação dos ácidos nucleicos, adicionou-se 8  $\mu$ L de NaCl 5M e 0,6 volumes de Isopropanol (gelado). A solução foi misturada com cuidado e deixada por 20 minutos no gelo;
- \* o material foi centrifugado por 20 minutos a 12.000 rpm;
- \* o sobrenadante foi descartado, o pellet foi lavado com 500  $\mu$ L de Etanol 70%, para posterior centrifugação por 3 minutos a 12.000 rpm;
- \* o etanol foi descartado e as amostras deixadas para secar à temperatura ambiente;
- \* o pellet foi suspenso em 50  $\mu$ L de TE2 (Apêndice IV) e deixado por uma noite na geladeira, para posterior checagem de 5  $\mu$ L em gel de agarose 0,8%.

**Apêndice IV.** Reagentes TES, TE1 e TE2, utilizados no processo de extração do DNAr 16S.

<b>Solução</b>	<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Objetivo</b>
<b>TE1</b>	Tris 1 M (pH 8)	1 mL (C <sub>final</sub> 10 mM)	Solução tampão.
	EDTA 0,5 M (pH 8)	5 mL (C <sub>final</sub> 25 mM)	
	Água destilada estéril	Completar para 100 mL	

Armazenamento: geladeira.

- \* O Tris mantém o pH 8 para que o EDTA seja solubilizado (só solubiliza à pHs>7). O EDTA inibe a atividade de nucleases pois atua como agente quelante do Mg<sup>2+</sup> (cofator de nucleases (DNases e RNases)).

<b>TES</b>	Tris 1 M (pH 8)	1mL (C <sub>final</sub> 10 mM)	Solução de limpeza.
	EDTA 0,5 M (pH 8)	5 mL (C <sub>final</sub> 25 mM)	
	NaCl 5 M	3 mL (C <sub>final</sub> 150 mM)	
	Água destilada estéril	Completar para 100 mL	

Armazenamento: geladeira.

- \* Obs.: com NaCl 1 M, usar 15 mL
- \* O NaCl aumenta a força iônica do DNA, ou seja, contribui para a manutenção das cargas negativas entre as hidroxilas dos grupos fosfatos. Íons no meio aquoso podem romper ligações iônicas de cadeias polipeptídicas. Também auxiliam na dissociação das proteínas ligadas aos ácidos nucleicos.

<b>TE2</b>	Tris 1 M (pH 8)	1mL (C <sub>final</sub> 10 mM)	Ressuspender o DNA.
	EDTA 0,5 M (pH 8)	200µL (C <sub>final</sub> 1 mM)	
	Água destilada estéril		

Armazenamento: geladeira.

- \* TE2 pH 8 é usado para ressuspender o DNA; preserva mais o DNA do que a água, mas pode ser ruim para PCR se estiver em excesso ou com pH errado.

## **RESUMO BIOGRÁFICO**

Rafael Goulart Machado, filho de Jorge Rigoberto Aguiar Machado e Teresinha de Fátima Goulart Machado, nasceu em 18 de Janeiro de 1985, na cidade de Santa Rosa, no Estado do Rio Grande do Sul. Cresceu e se desenvolveu na cidade de Passo Fundo, completando o Ensino Fundamental na Escola Círculo Operário e o Ensino Médio no Colégio Bom Conselho. No ano de 2003, mudou-se à cidade de Santa Maria, onde cursou a Faculdade de Agronomia. Ao longo da Faculdade, desenvolveu trabalhos de Iniciação Científica no Laboratório de Biologia do Solo da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pelo qual publicou seus primeiros resumos e artigos científicos, sob a orientação das professoras Dra. Zaida Inês Antonioli e Dra. Andréa Hentz. No ano de 2008, formou-se Engenheiro Agrônomo, pela UFSM. Em 2009, adentrou no Curso de Mestrado em Ciência do Solo, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob a orientação do professor Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá. Em 2011 recebeu o título de Mestre em Ciência do Solo pela UFRGS e iniciou o Curso de Doutorado em Ciência do Solo, pela mesma instituição, também sob a orientação do professor Enilson Luiz Saccol de Sá. Em Junho de 2013, foi contratado pela empresa oficial de extensão rural do Estado do Rio Grande do Sul, a Emater-RS/ASCAR. Atualmente, é Engenheiro Agrônomo (ERNS-I) da Emater-RS/ASCAR, lotado no Escritório Municipal de Nova Alvorada, pertencente à Regional de Passo Fundo. Desenvolve trabalhos de extensão rural e orienta agricultores do município e região. É revisor das revistas científicas *Ciência Rural* e *Indian Journal of Agricultural Sciences*.