

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

**RIZÓBIOS COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
OLERÍCOLAS**

Clarissa de Souza Borges

Tese

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

**RIZÓBIOS COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
OLERÍCOLAS**

CLARISSA DE SOUZA BORGES
Bióloga (UFPel)
Mestre em Fisiologia vegetal (UFPel)

Tese de doutorado apresentada como um dos requisitos para obtenção do
Grau de Doutora em Ciência do solo

Porto Alegre (RS) Brasil

Maio 2016

CIP - Catalogação na Publicação

de Souza Borges, Clarissa
RIZÓBIOS COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
OLERÍCOLAS / Clarissa de Souza Borges. -- 2016.
81 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,
2016.

1. Rizóbio. 2. Promoção de crescimento. I. saccol
de Sá, Enilson Luiz, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

CLARISSA DE SOUZA BORGES

**RIZÓBIOS COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
OLERÍCOLAS**

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 parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Flávio Anastácio Oliveira Camargo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Benjamin Dias Osório Filho
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

Dr. Gleidson Gimenes Rieff
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador - Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*Dedico aos meus pais, Neiva e
Edison, e ao meu irmão, Luis Fernando,
por acreditarem em mim, pelo apoio e
amor incondicional...*

*“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá, por te me acolhido e dado a oportunidade de desenvolver pesquisa junto a sua equipe no Laboratório de Microbiologia do Solo “no meio do caminho”. Pelo ensinamento, críticas, amizade e por sempre me ajudar nos momentos que eu precisei.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, Franciane, Franquiéle, Bruna, Renata, Tais, Victor, Gleidson, Vanessa, Priscilla, Márcia e Raquel, que estiveram presentes no dia a dia de trabalho, pela ajuda nos experimentos do laboratório e da vida, pelas conversas e discussões, com quem tive o prazer de conviver e por tornarem os meus dias mais alegres. Tenho todos vocês no coração.

À professora Ana Paula Guedes Frazzon, por toda disponibilidade em me auxiliar nas análises de biologia molecular e por todos os ensinamentos que me passou em curto espaço de tempo. Também pela confiança, incentivo, amizade e carinho com que me recebeu em seu laboratório.

Aos técnicos de laboratório, Márcio e Adão, por toda a disponibilidade em me ajudar nos momentos que precisei. Não posso deixar de agradecer ao seu Zé, por facilitar os trabalhos realizados em casa de vegetação sem ele os trabalhos na casa de vegetação se tornariam muito mais difíceis.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Aos amigos que fiz no Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela ótima convivência e amizade, em especial à Ana Cristina Ludtke por todo carinho, incentivo e ombro amigo nos momentos difíceis.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo

Às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, Neiva Borges e Edison Borges por todo amor e apoio incondicional, mesmo a distância. Em

especial a minha mãe, que sempre foi uma grande incentivadora para meu crescimento pessoal e profissional. Foi quem sempre me apoiou e me deu suporte para que eu chegasse até aqui, muitas vezes abdicando dos seus sonhos para realizar os meus. Não tenho palavras para agradecer.

Ao meu irmão, Luis Fernando Borges, por todo amor, amizade, apoio e incentivo para seguir em frente sempre e nunca desistir. Pelo exemplo de caráter e integridade, o qual eu quero seguir. Obrigada por poder contar contigo sempre e por fazer parte da minha vida mesmo de longe.

Ao meu namorado, Diego Hernandez, pelo amor, carinho, companhia, e por ser a minha família aqui em Porto Alegre durante a realização desse curso.

Por fim, gostaria de agradecer aos componentes da banca Prof. Dr. Flávio Anastácio Oliveira Camargo, Dr. Gleidson Gimenes Rieff e ao membro externo Prof. Dr. Benjamin Osório Dias Filho pela disponibilidade.

RIZÓBIOS COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS OLERÍCOLAS ¹

AUTOR: Clarissa de Souza Borges

ORIENTADOR: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

RESUMO: A inoculação com rizóbios pode ser uma alternativa viável para aumentar a produção, sem aumentar os níveis de adubação no sistema e sem riscos à saúde. Porém ainda são poucos os trabalhos utilizando rizóbios como promotores de crescimento em hortaliças. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar a influência da inoculação de rizóbios na germinação de quatro espécies olerícolas; avaliar três mecanismos de promoção de crescimento; verificar a capacidade de colonização dos rizóbios em plantas olerícolas e identificar geneticamente os isolados. Para isso foram realizados experimentos em laboratório, onde as sementes receberam a inoculação com rizóbios para os testes de germinação. Os rizóbios foram cultivados em meio de cultura para avaliação de produção de AIA, sideróforos e solubilização de fosfato. Foram realizados experimentos em casa de vegetação para avaliar a promoção de crescimento de plantas de alface, beterraba, couve e salsa inoculadas com rizóbios e um experimento a campo com plantas de alface inoculadas com rizóbios. Além disso, os rizóbios estudados nos experimentos de promoção de crescimento e colonização foram caracterizados geneticamente pela amplificação da região do gene 16S rRNA. Pode-se observar que a inoculação de rizóbios acelera a germinação de sementes de rúcula e alface. E que todos os isolados foram capazes de produzir AIA e solubilizar fosfato e os isolados UFRGS-Ls54 e UFRGS-Vp16 foram capazes de produzir sideróforos. O Isolado UFRGS-Ls54 foi mais eficiente na promoção de crescimento e absorção de nutrientes em plantas de beterraba e foi identificado como *Rhizobium leguminosarum*. Nas plantas de couve o isolado UFRGS-Ls14 identificado como *Bradyrhizobium sp* e os isolados UFRGS-Ps10, UFRGS-Ps8 foram identificados. *R. leguminosarum* e foram capazes de promover o crescimento dessas plantas. Os isolados UFRGS-Ls14, UFRGS-Lu45 foram identificados como *Mesorhizobium erdmanii* e o isolado UFRGS-Lc348 foi identificado como *Mesorhizobium jarvisii* e foram capazes de promover o crescimento de plantas de salsa. Em plantas de alface os isolados, UFRGS-Lc348, UFRGS-Lc336 identificado como *Bradyrhizobium sp*, UFRGS-Ps 11 foi identificado como *Rhizobium leguminosarum* e a estirpe SEMIA 3007 foram capazes de promover o crescimento de plantas de alface em casa de vegetação e a estirpe SEMIA 3007 também promoveu o crescimento de plantas de alface em canteiros. Os rizóbios inoculados nas plantas de alface, beterraba, couve e salsa foram capazes de colonizar os tecidos dessas plantas.

¹ 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. (81p.). Maio, 2016. Trabalho realizado com apoio da CAPES-PDSE e CNPq projeto 478981.

RHIZOBIA FOR PLANT GROWTH PROMOTERS VEGETABLE CROPS²

AUTHOR: Clarissa de Souza Borges

ADVISOR: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

ABSTRACT: Inoculation with rhizobia can be a viable alternative to increase production without increasing fertilizer levels in the system and without risks to health. But there are few studies using rhizobia as growth promoters in vegetables. The objectives of this study were to evaluate the influence of rhizobia inoculation on germination of four vegetable crops; evaluate three growth promotion mechanisms; check the ability of rhizobia colonizing in vegetable crops and identify genetically isolated. For that they were conducted laboratory experiments, where the seeds received inoculation with rhizobia for germination. The strains were grown in culture medium for production IAA evaluation, siderophores and phosphate solubilization. Experiments were conducted in a greenhouse to evaluate the growth promotion of lettuce plants, beetroot, cabbage and parsley inoculated with rhizobia and field experiment with lettuce plants inoculated with rhizobia. Additionally, rhizobia studied in promoting growth and colonization experiments were genetically characterized by amplification of 16S rRNA gene. It can be seen that the Rhizobia inoculum accelerates the germination of lettuce seeds and rocket. And all the strains were able to produce IAA and solubilize phosphate and isolated UFRGS-Ls54 and UFRGS-VP16 were able to produce siderophores. Isolate UFRGS-Ls54 was more efficient in growth promotion and absorption of nutrients in sugar beet plants and has been identified as *Rhizobium leguminosarum*. In plants of cabbage isolated UFRGS-LS14 identified as *Bradyrhizobium* sp and isolated UFRGS-PS10, UFRGS-PS8 were identified. *R. leguminosarum* and were able to promote the growth of these plants. Isolated UFRGS-LS14, UFRGS-Lu45 were identified as *Mesorhizobium erdmanii* and isolated UFRGS-Lc348 was identified as *Mesorhizobium jarvisii* and were able to promote the growth of parsley plants. In lettuce isolated, UFRGS-Lc348, UFRGS-Lc336 identified as *Bradyrhizobium* sp, UFRGS-Ps 11 was identified as *Rhizobium leguminosarum* and SEMIA 3007 strain were able to promote the growth of lettuce plants in a greenhouse and the strain SEMIA 3007 also promoted the growth of lettuce plants in flower beds. Rhizobia inoculated in lettuce plants, beets, cabbage and salsa were able to colonize the tissues of these plants.

² 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. (81p.). May, 2016. work performed with financial support from CAPES-PDSE and CNPq project 478981.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. CAPÍTULO I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Hortaliças.....	3
2.2. Rizobactérias promotoras de crescimentos em plantas	4
2.2.1. Rizóbios como promotores de crescimento de plantas	6
2.3. Mecanismos de promoção de crescimento de plantas	6
2.3.1. Mecanismos diretos	6
2.3.1.1. Fixação biológica de nitrogênio	7
2.3.1.2. Produção de substâncias reguladoras do crescimento vegetal	8
2.3.1.3 Solubilização de Fosfato	10
2.3.1.4 Produção de Sideróforos.....	11
2.3.2. Mecanismos indiretos	12
2.4. Colonização bacteriana	13
2.5. Referencias Bibliográficas	14
3. CAPÍTULO II. INFLUÊNCIA DOS RIZÓBIOS NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE, CENOURA, RABANETE E RÚCULA	21
Resumo	21
3.1. Introdução.....	22
3. 2. Material e métodos	23
3.2.1. Isolados de rizóbios.....	23
3.2.2. Produção de ácido indolacético (AIA).....	23
3.2.3. Efeito de diferentes concentrações de AIA sintético na germinação de sementes de hortaliças.....	24

3.2.4. Efeito na germinação de sementes de plantas olerícolas inoculadas com rizóbios	25
3.2.5. Análise de dados.....	25
3. 3. Resultados e discussão.....	25
3. 4. Conclusões.....	33
3.5. Referências bibliográficas.....	33
4. CAPÍTULO III. RIZÓBIOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM ALFACE, BETERRABA, COUVE E SALSA.....	36
Resumo	36
4.1. Introdução.....	37
4.2. Material e métodos	38
4.2.1. Isolados de rizóbios.....	38
4.2.2. Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento dos rizóbios	38
4.2.3. Avaliação da promoção de crescimento em casa de vegetação	40
4.2.4. Avaliação da promoção de crescimento de alface em canteiro.....	41
4.2.5. Análise de dados	42
4.3. Resultados e discussão.....	42
4.3.1. Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento dos rizóbios	42
4.3.2. Avaliação da promoção de crescimento em casa de vegetação	44
4.3.3. Avaliação da promoção de crescimento em canteiro	55
4.4. Conclusões.....	57
4.5. Referências bibliográficas.....	57
5. CAPÍTULO IV. COLONIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE RIZÓBIOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM PLANTAS OLERÍCOLAS	61
Resumo	61
5.1. Introdução.....	62
5.2. Materiais e métodos	63
5.2.1. Rizóbios estudados.....	63
5.2.2. Caracterização genotípica dos isolados.....	63
5.2.2.1. Extração de DNA e amplificação do gene 16S rRNA.....	63
5.2.3 Avaliação da colonização endofítica de rizóbios em plantas olerícolas	64

5.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	66
5.3. Resultados e Discussão	76
5.4. Conclusões	72
5.5. Referências Bibliográficas	72
6. CONCLUSÕES GERAIS	75
APÊNDICES	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Produção de auxina, equivalente ao ácido indolacético, em meio de cultura por rizóbios.....	26
Tabela 3.2. Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de rabanete e cenoura inoculada com rizóbios.....	30
Tabela 3.3. Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de alface e rúcula inoculada com rizóbios.....	32
Tabela 4.1. Rizóbios utilizados no estudo e planta hospedeira.....	38
Tabela 4.2. Análise das Características químicas da amostra solo (0-20 cm) da área dos canteiros.....	42
Tabela 4.3. Mecanismos diretos de promoção de crescimento de planta, produção de AIA, solubilização de fosfato e produção de sideróforos por rizóbios.....	43
Tabela 4.4. Teores de nitrogênio e fósforo na parte aérea de plantas de beterraba inoculadas com rizóbios.....	46
Tabela 4.5. Teores de nitrogênio e fósforo na parte aérea de plantas de couve inoculadas com rizóbios.....	48
Tabela 4.6. Teores de nitrogênio e fósforo na parte aérea de plantas de salsa inoculadas com rizóbios.....	52
Tabela 4.7. Teores de nitrogênio e fósforo na parte aérea de plantas de alface inoculadas com rizóbios.....	54
Tabela5.1. Identificação dos isolados de rizóbios pela sequência parcial dos genes 16S rRNA obtida com o programa BLAST.....	67

Tabela 5.2 Capacidade de nodulação em plantas leguminosas a partir da inoculação da suspensão do macerado de hortaliças inoculadas com rizóbios. A presença de nodulação na leguminosa de origem foi considerada como confirmação da colonização na hortaliça.....69

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Porcentagem de germinação se sementes com adição de diferentes concentrações de ácido indolacético.....	27
Figura 3.2. Índice de velocidade de germinação se sementes com adição de diferentes concentrações de ácido indolacético.....	28
Figura 4.1. Massa seca de plantas de beterraba inoculadas com rizóbios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 1% de probabilidade de erro.....	45
Figura 4.2. Índice de eficiência relativa (%) dos rizóbios quanto ao aumento de massa de plantas de beterraba. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.....	47
Figura 4.3. Massa seca de plantas de couve inoculadas com rizóbios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.....	48
Figura 4.4. Índice de eficiência relativa (%) dos rizóbios quanto ao aumento de massa de plantas de couve. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.....	49
Figura 4.5. Massa seca de plantas de salsa inoculadas com rizóbios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.....	50
Figura 4.6. Índice de eficiência relativa (%) dos rizóbios quanto ao aumento de massa de plantas de salsa. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.....	51

Figura 4.7. Massa seca de plantas de alface inoculadas com rizóbios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.....	53
Figura 4.8. Índice de eficiência relativa (%) dos rizóbios quanto ao aumento de massa de plantas de alface. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.....	54
Figura 4.9. Massa seca de plantas de alface inoculadas com rizóbios em canteiros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.....	56
Figura 5.1. Plantas cultivadas em lampadário (A), macerado das raízes de parte aérea das plantas cultivadas em lampadário (B), plantas inoculadas com a suspensão do macerado em casa de vegetação (C).....	66
Figura 5.2. Formação de nódulos em plantas de <i>L. subflorus</i> inoculada com macerado de salsa inoculada com UFRGS-Ls14 (A) <i>L. uliginosus</i> inoculada com macerado de beterraba inoculada com UFRGS-Lc348 (B) <i>L. corniculatus</i> inoculadas com macerado de alface inoculadas com UFRGS-Lc348 (C) <i>P. sativum</i> inoculada com macerado de couve inoculadas com UFRGS-Ps8(D).....	70
Figura 5. 3. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a colonização do tecido radicular de plantas olerícolas. Controle não-inoculado (A) Lesão na raiz de plantas de couve (B) Formação de biofilme e bactérias penetrando na lesão de plantas de couve com UFRGS-Ps8 (C,D) Colonização das raízes de salsa inoculadas com o isolado UFRGS-Ls14 (E,F) Colonização das raízes de beterraba inoculadas com o isolado UFRGS-Lc348 (G) Colonização das raízes de alface inoculadas com o isolado UFRGS-Lc348.....	71

1. INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo de espécies olerícolas, a cada ano, expande-se mais. Até poucos anos atrás a produção e a comercialização de hortaliças no Brasil se caracterizavam pela informalidade. Mas essa realidade vem mudando devido à organização da cadeia produtiva, que vem investindo em estratégias para ampliar o consumo de hortaliças. Porém, os sistemas convencionais de produção de hortaliças utilizam grandes quantidades de fertilizantes minerais, principalmente os nitrogenados e potássicos, o que acarreta em custos elevados para o agricultor e para o meio ambiente.

É necessária a busca por tecnologias que proporcionem alimentos seguros e com qualidade, e que não gerem prejuízos na produção. O que justifica a busca de inoculantes bacterianos a fim de promover o crescimento de plantas olerícolas, como também aumentar a eficiência na utilização dos nutrientes do solo via adubação.

Neste sentido, as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR – do inglês “promoting growth plant rhizobacteria”), principalmente os rizóbios, que já são utilizadas como promotoras de crescimento vegetal quando em simbiose com leguminosas pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), podem promover o crescimento de plantas de espécies não-leguminosas. Em plantas não-leguminosas essa promoção do crescimento pode ser pela produção de substâncias reguladoras do crescimento, pelo aumento na disponibilidade de nutrientes na rizosfera, como também pelo controle de fitopatógenos.

A inoculação com rizóbios em hortaliças pode ser uma alternativa viável para aumentar a produção, sem aumentar os níveis de adubação no sistema. Porém ainda são poucos os trabalhos em relação a bactérias promotoras de crescimento em hortaliças. A grande maioria dos trabalhos são com bactéria dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*. Até o momento na literatura são dois os trabalhos encontrados, de Garcia-Fraile et al. (2012) e Flores-Félix et al. (2013) descrevendo rizóbios do gênero *R. leguminosarum* como promotores de crescimento e colonizadores em pimenta, tomate, alface e cenoura. A maioria dos trabalhos sobre promoção de crescimento em plantas não-leguminosas com rizóbios são com gramíneas, como, arroz, trigo e milho. A utilização de rizóbios na produção de hortaliças devido sua à capacidade em promover o crescimento dessas plantas traz benefícios para o agricultor como aumento da produtividade, como também na qualidade do produto.

Em função do exposto, a hipótese deste trabalho é que a inoculação de rizóbios, em plantas hortícolas estimula a germinação de sementes, promove o crescimento vegetal e aumenta a eficiência da absorção de nutrientes minerais pelas plantas. A capacidade destas bactérias de estimular o crescimento vegetal, como também melhorar a eficiência na absorção de nutrientes pode ser uma alternativa na redução dos impactos ambientais causados pelo uso intensivo de fertilizantes nos solos com cultivo olerícola.

Esse trabalho tem como objetivo geral avaliar a promoção de crescimento de plantas olerícolas inoculadas com rizóbios. E tem como objetivos específicos: (a) avaliar a produção de ácido indolacético e sua influência na germinação de quatro espécies olerícolas; (b) avaliar três mecanismos de promoção de crescimento, assim como a promoção de crescimento de plantas olerícolas inoculadas com rizóbios, através de parâmetros de massa seca, eficiência relativa e teor de nutrientes das plantas; (c) verificar a capacidade colonização dos rizóbios em plantas olerícolas e (d) identificar geneticamente os isolados.

2. CAPÍTULO I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Hortaliças

No Brasil, a produção de hortaliças tem evoluído desde a década de 40, durante a Segunda Guerra Mundial, de pequenas hortas a cultivos para exploração comercial (INCAPER, 2013). Entre os anos de 1997 e 2007, a produção nacional de hortaliças teve um aumento de 33% com redução de 5% da área cultivada e aumento de produtividade em 38 %, sendo que a maior parte da produção se concentra nas regiões sul e sudeste do país. É um dos setores do agronegócio brasileiro, mais dinâmicos e com maior inserção regional, gerando emprego e renda em praticamente todo o país.

A área cultivada no ano de 2011 foi de 946 mil toneladas com a produção estimada em 19,4 milhões de toneladas, gerando 2,4 milhões de emprego direto (ABCSEM, 2011). Atualmente, devido ao aumento de renda e de nível educacional da população brasileira, os consumidores brasileiros estão buscando cada vez mais alimentos mais saudáveis. O consumo de hortaliças está relacionado ao estilo de vida mais saudável dos consumidores, com isso a olericultura ganha uma posição de destaque no agronegócio. Pois há muito espaço para expansão na produção, mas apesar da conscientização cada vez maior dos brasileiros, o consumo médio de hortaliças no Brasil ainda é baixo. E é ainda menor pela população de baixa renda, que consome menos hortaliças na sua alimentação diária, com consumo médio anual de aproximadamente 19 kg/pessoa (SANTOS et al., 2015).

O cultivo predominante no Brasil ainda é o convencional, com uso intensivo de fertilizantes minerais e defensivos químicos, mas estudos relatam

o crescimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis, como, o cultivo orgânico (SOUZA, 2011).

2.2. Rizobactérias Promotoras de Crescimentos em Plantas

As bactérias capazes de colonizar a rizosfera ou as raízes das plantas e também auxiliar direta ou indiretamente no crescimento e desenvolvimento vegetal são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR – do inglês “promoting growth plant rhizobacteria”), (KLOEPPER et al., 1980; ABBASI et al., 2011). Essas rizobactérias são capazes de estimular o crescimento vegetal através do enriquecimento de nutrientes do solo. Seja pela fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e produção de reguladores de crescimento. Além disso, elas podem atuar como controle biológico, produzindo substâncias de defesa para as plantas, como, celulase, protease, lipase e β -1,3 glucanase. (AHEMAD et al., 2009; BULGARELLI et al., 2013; GOPALAKRISHNAN et al., 2015).

Na busca pela produção agrícola mais sustentável, as interações planta-rizobactérias são importantes quando se tratam da transformação, mobilização e solubilização de nutrientes para que a planta consiga absorver nutrientes que estariam de maneira indisponível para seu desenvolvimento (HAYAT et al., 2010; GOPALAKRISHNAN et al., 2015). A sustentabilidade na produção agrícola se baseia em abordagens biológicas para melhorar a produção na agricultura, buscando alternativas para reduzir o uso de fertilizantes (SAHARAN & NEHRAN, 2011). A utilização de rizobactérias na agricultura pode ser uma alternativa para auxiliar no crescimento e proteção das culturas.

Diversos estudos vêm sendo realizados, com o objetivo de investigar o potencial de rizobactérias na promoção do crescimento de plantas, pela produção de substâncias reguladoras de crescimento, tolerância dessas bactérias a agroquímicos, estresse abiótico, entre outros (AHAMAD & KHAN, 2012; GURURANI et al., 2013; GOPALAKRISHNAN et al., 2015). Vários gêneros de bactérias tais como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter*, *Actinobacter*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Pantoea* foram relatadas como sendo bactérias

estimuladoras do crescimento de plantas (ZAHIR et al., 2009; KARAKURT & KOTAN, 2011; VIAL et al., 2011; GARCÍA-FRAILE et al., 2012).

Apesar os resultados promissores encontrados com a utilização de rizobactérias na promoção de crescimento de várias espécies vegetais, como, arroz, trigo, milho, alface, cenoura, tomate, pimenta, entre outras (GARCÍA-FRAILE et al., 2012; FLORES-FELIX et al., 2013; HAHN, 2014; OSÓRIO FILHO, 2014) os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento por essas bactérias ainda não estão bem elucidados. As descobertas da utilização de rizobactérias no crescimento de plantas ampliam as perspectivas de seu uso nos mais variados sistemas agrícolas e nas diferentes espécies vegetais. Inicialmente, quando foi introduzido o termo rizobactérias, este era destinado às bactérias não simbiotes presentes na rizosfera com capacidade de colonizar o sistema radicular e favorecer o crescimento das plantas (KLOEPPER & SCHROTH, 1978).

Com os avanços nas pesquisas de interação planta-micro-organismo, novos conceitos foram estabelecidos. No qual inclui as bactérias que estabelecem relações simbióticas com a planta, no grupo das chamadas de PGPR intracelulares (iPGPR), que são as bactérias que vivem no interior das células das raízes, formam nódulos e vivem dentro de estruturas especializadas. E as bactérias que se desenvolvem na rizosfera, rizoplano ou nos espaços intercelulares, sem formação de nódulos, mas capazes de promover o crescimento vegetal pela produção de substâncias específicas, no grupo das chamadas de PGPR extracelulares (ePGPR) (GRAY & SMITH, 2005).

Entre as PGPRs intracelulares mais bem estudadas estão os rizóbios em simbiose com leguminosas (GRAY & SMITH, 2005) e entre as PGPRs extracelulares, as bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (HARTHMANN et al., 2001; ROCHA & MOURA, 2013). Entretanto, existem rizobactérias que podem se estabelecer tanto no interior como no exterior das células, pertencendo aos dois grupos, como exemplo, *Burkholderia* (GRAY & SMITH, 2005).

2.2.1. Rizóbios como Promotores de Crescimento de Plantas

O exemplo mais bem estudado de interação benéfica entre plantas e rizobactérias é a relação simbiótica entre rizóbios e plantas da família das *Fabaceae* (leguminosas), sendo aquelas as mais comumente utilizadas como inoculantes agrícolas no mundo. Em simbiose, o rizóbio cresce às custas dos carboidratos fornecidos pela planta hospedeira e, em troca, fornece nitrogênio fixado para a biossíntese de aminoácidos (BRENCIC & WINANS 2005; GRAY & SMITH, 2005). Esta simbiose é um exemplo de relação íntima entre uma bactéria do solo e sua planta hospedeira, e ilustra o conceito de iPGPR em solos com deficiência de nitrogênio, a bactéria converte o nitrogênio atmosférico (N_2) à amônia (NH_3), e assim promove o crescimento de plantas leguminosas pelo fornecimento desse nutriente (VAN LOON, 2007). Porém, os rizóbios também podem ser classificados como ePGPR quando associados a plantas não-leguminosas. Podendo se alojar nos espaços entre as células vegetais ou na rizosfera, na superfície das raízes. Estimulando o crescimento das plantas através da produção de reguladores de crescimento, pela solubilização de fosfato, produção de sideróforos, entre outro mecanismos (GARCIA-FRAILE et al., 2012; FLORES-FÉLIX et al., 2013).

2.3. Mecanismos de Promoção de Crescimento de Plantas

As interações que ocorre entre plantas-micro-organismos, podem afetar o crescimento dos vegetais por mecanismos diretos e indiretos de promoção de crescimento vegetal (GLICK, 2012).

2.3.1. Mecanismos Diretos

Entre os mecanismos que as bactérias utilizam para promover o crescimento de plantas estão a fixação biológica de nitrogênio (FBN); a produção de reguladores de crescimento de plantas, como o ácido indolacético (AIA), giberelinas, citocininas e etileno; a solubilização de fosfatos e a produção de sideróforos.

2.3.1. 1. Fixação Biológica de Nitrogênio

Os micro-organismos capazes de fixar nitrogênio atmosférico são denominados de diazotróficos. E podem ser classificados como: simbiontes; como rizóbios, que estabelecem relações com plantas leguminosas, assim como *Frankia* que estabelece relação com espécies arbóreas não-leguminosas ; vida livre; associativos e endofíticos como *Azospirillum*, *Azotobacter* e cianobactérias (*Anabaena*, *Nostoc*) (AHEMAD & KHAN, 2012; BHATTACHARYYA & JHA, 2012).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo no qual os micro-organismos diazotróficos presentes no solo realizam a conversão do nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), forma assimilável para as plantas, através de um complexo enzimático denominado nitrogenase (ZEHR et al., 2003; STEFAN et al., 2008; BULGARELLI et al., 2013). Através da FBN, os compostos nitrogenados são fornecidos prontamente para as plantas, por relações associativas, ou então, são liberados no ambiente, pela decomposição da biomassa microbiana (LINDERMANN & GLOVER, 2003; GOPALAKRISHNAN et al., 2015).

A relação simbiótica rizóbio-leguminosa é capaz de fixar aproximadamente até 460 Kg de N/ ha ao ano (BULGARELLI et al., 2013). Vários estudos demonstram a importância da FBN por rizóbios, não apenas pelo benefício causado nas plantas leguminosas, mas através de cultivos em consórcio beneficiando as espécies a serem plantadas após o cultivo com leguminosas (CASTRO et al., 2004; HAYAT et al., 2010). Diversas bactérias de vida livre, associativas e/ou endofíticas promovem o crescimento de diversas plantas pela FBN. Como, por exemplo, as do gênero *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* (JAMES et al., 2000; KENNEDY et al., 2004; GHOLAMI et al., 2009)

2.3.1.2. Produção de substâncias reguladoras do crescimento vegetal

Os reguladores de crescimento de plantas são compostos químicos que influenciam e promovem o crescimento e desenvolvimento das plantas. As principais classes são: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (SANTNER & ESTELLE, 2009). Na classe das auxinas, destaca-se o ácido indolacético (AIA), como molécula mais abundante e envolvida em vários processos celulares e de crescimento e desenvolvimento dos vegetais. É também a auxina fisiologicamente mais ativa nos vegetais e o foco das pesquisas relacionadas à rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (BULGARELLI et al., 2013).

Vários estudos têm demonstrado o envolvimento de rizobactérias na biossíntese de AIA, tanto em meio de cultura como no solo (HAMEED et al., 2004; KHALID et al., 2004; THAKURIA et al., 2004). Um dos efeitos diretos das rizobactérias produtoras de AIA é proliferação de raízes secundárias e pêlos radiculares, aumentando a absorção de nutrientes pelas plantas associadas a essas bactérias e com isso ajudando no crescimento e desenvolvimento vegetal (BISWAS et al., 200; LAMBRECHT et al., 2000; MACHADO, 2011).

A capacidade de produzir de ácido indolacético é um dos mecanismos mais estudados na promoção de crescimento de plantas por rizobactérias, aproximadamente 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir AIA. Diversos trabalhos têm relatado que a maioria dos rizóbios são capazes de produzir AIA. Esse está envolvido nos processos de divisão e diferenciação celular, que são essenciais para a formação do nódulo, quando em simbiose com espécies leguminosas (AHEMAD & KHAN, 2012; HAHN, 2014; OSÓRIO FILHO, 2014; MACHADO, 2015).

Outro regulador de crescimento produzido por PGPRs é a giberelina, que recebeu esse nome por ter sido descoberta a partir de compostos excretados pelo fungo *Giberella fujikuroi*. No qual provocava um crescimento exagerado na altura de plantas de arroz e suprimia a produção de sementes. O primeiro composto isolado da cultura do fungo foi denominado ácido giberélico (GA₃), que é responsável pelo crescimento do caule, devido ao estímulo que as giberelinas promovem nas taxas de alongamento e divisão celular. (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Por outro lado, as giberelinas nunca estão presentes em tecidos com ausência completa de auxinas, sendo que os efeitos da giberelina no

crescimento podem ainda depender da acidificação do meio promovido pelas auxinas. A giberelina também é responsável pela partenocarpia em frutas, por aumentar o tamanho do fruto e número de botões e germinação de sementes, mais especificamente, sobre a produção de α -amilase na camada de aleurona de cereais (CAMILI, 2007; TAIZ & ZEIGER, 2013). As giberelinas ajudam na germinação de sementes, como no caso de alface e cereais. Muitas rizobactérias são relatadas como produtoras de giberelinas (DOBBELAERE et al. 2003) incluindo *Rhizobium*, *S. meliloti* (BOIERO et al, 2007).

Na literatura, são poucos os trabalhos envolvendo a produção de citocinina pelas bactérias promotoras de crescimento vegetal. Ortiz-Castro et al. (2008) em trabalho envolvendo a sinalização de citocinina na promoção de crescimento vegetal por *Bacillus megaterim*, puderam observar que receptores de citocinina desempenham um papel complementar na promoção de crescimento vegetal. Esse regulador de crescimento possui grande capacidade de promover divisão celular, participando assim do processo de alongamento e diferenciação celular, principalmente, quando interage com as auxinas (TAIZ & ZEIGER, 2013).

O etileno é um regulador de crescimento produzido por todas as plantas, essencial para o crescimento e desenvolvimento adequado. A planta quando em situações de estresse, como, déficit hídrico, salinidade, alagamento, elementos traços, patógenos, o nível endógeno desse regulador de crescimento aumenta significativamente na planta, desencadeando respostas de defesa na mesma (SALEEM et al., 2007; BHATTACHARYYA & JHA, 2012). Mas se o estresse persistir, com um aumento severo nas concentrações de etileno pela planta, como resposta a planta irá desencadear processos de senescência, clorose, abscisão, acarretando em efeitos inibitórios para o crescimento e desenvolvimento da planta (STEARNS & GLICK, 2005).

Em relação à promoção de crescimento envolvendo o etileno, vários trabalhos têm sido realizados com bactérias capazes de promover o crescimento de plantas, relacionados à síntese da enzima ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) desaminase, a qual degrada o ACC, um precursor imediato do etileno. Como altas concentrações de etileno atuam na inibição do crescimento radicular e senescência, a ACC-desaminase regula os

níveis desse regulador de crescimento, de modo a auxiliar a planta em seu crescimento e desenvolvimento (ONOFRE-LEMUS et al., 2009)

As rizobactérias com capacidade de produzir a enzima ACC deaminase pertencem a vários gêneros como *Bacillus*, *Burkholderia*, e *Rhizobium*, entre outros (ZAHIR et al., 2008; ONOFRE-LEMUS, 2009; KANG et al., 2010). Estas bactérias associadas à planta ajudam a regular os níveis de etileno, atuando como drenos de ACC (1-aminociclopropano-1-carboxílico) reduzindo os efeitos deletérios do etileno, promovendo o crescimento das plantas. Os principais efeitos produzidos por plantas inoculadas por rizobactérias capazes de produzir ACC desaminase são, aumento nas taxas de germinação de sementes, estímulo no crescimento radicular, melhoria na absorção de nutrientes, como, nitrogênio, fósforo e potássio, aumento na nodulação em rizóbios (ZAFAR-UL-HYE et al., 2007; GLICK, 2012).

2.3.1.3. Solubilização de Fosfato

O fósforo, segundo nutriente limitante do crescimento vegetal depois do nitrogênio, é abundante nos solos em formas orgânicas e inorgânicas. Entretanto, em grande parte dos solos este elemento se encontra em baixa disponibilidade para as plantas, já que estas apenas conseguem absorvê-lo do solo nas formas solúveis, de íons H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} (KHAN et al., 2009; BHATTACHARYYA & JHA, 2012). A busca por estratégias para aumentar a disponibilidade desse mineral para plantas pode melhorar significativamente o crescimento e a produtividade vegetal, uma vez que a fração disponível de fósforo para a planta é relativamente baixa nos solos equivale a 5% de total de fósforo nos solos (DOBBELAERE et al., 2003).

A utilização de micro-organismos solubilizadores de fosfato pode vir auxiliar ou/e substituir o uso de fertilizantes fosfatados na agricultura (KHAN et al., 2006). O mecanismo utilizado pelas bactérias para solubilizar o fósforo inorgânico é através da produção de ácidos orgânicos, enquanto a mineralização de fósforo orgânico se dá pela produção de diversas fosfatases que acarreta na liberação de ácidos fosfóricos (BULGARELLI et al., 2013; GLICK, 2012). Rizobactérias como *Rhizobium*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, são eficientes no processo de solubilização de fosfato inorgânico, tornando o

fósforo disponível para as plantas. Estudos mostram o efeito positivo da inoculação com bactérias solubilizadoras de fosfato na promoção de crescimento de plantas (VIKRAM & HAMZEHZARGHANI, 2008; MARRA et al, 2011; AHMAD & KHAN, 2012;).

2.3.1.4. Produção de Sideróforos

O ferro, assim como o fósforo é um elemento abundante nos solos, mas devido à baixa solubilidade dos óxidos de ferro, é pouco disponível para as plantas (RAJKUMAR et al., 2010). Dessa maneira, as plantas precisam utilizar estratégias, para aumentar a disponibilidade de Fe, através da liberação de prótons H^+ a fim de baixar o pH do solo e aumentar a disponibilidade de Fe para as plantas ou pela liberação de um quelante de ferro, sideróforos, que irá se ligar ao Fe para que ele possa ser absorvido pelas raízes das plantas (JEONG & GUERINOT, 2009)

As rizobactérias, assim como as plantas, também têm a capacidade de produzir moléculas quelantes de ferro, chamadas de sideróforos, quando em baixa disponibilidade de Fe para o seu desenvolvimento. A liberação de sideróforos pelas bactérias rizosféricas, auxiliam no crescimento vegetal, impedindo a proliferação de patógenos de raiz, devido à competição pelo Fe no solo (DOBBELAERE et al., 2003; BULGARELLI et al., 2013). As plantas tem a capacidade de absorver o complexo Fe-sideróforos bacterianos, que quando dentro da planta o Fe se desliga do sideróforo, e essa molécula é então reciclada ou destruída (RAJKUMAR et al., 2010).

Estudos com plantas de *Arabidopsis thaliana*, foi constatada a presença de ferropioverdinas, sideróforo produzido por *P. fluorescens*, com aumento dos teores de Fe no interior da planta e de crescimento vegetal (VANSUYT et al., 2007). As rizobactérias também atuam no controle biológico reduzindo, principalmente, doença de origem fúngica nas plantas, e com isso promovendo o crescimento dessas plantas. (DEY et al., 2004).

O sequestro e transporte de ferro na célula vegetal através de sideróforos por rizóbios é uma das maneiras de fornecer ferro para planta quando em condições de baixa disponibilidade de ferro no ambiente. Diversas estirpes de rizóbios são capazes de produzir sideróforo que irão de ligar Fe^{3+} e reduzi-lo a

Fe²⁺ deixando-o disponível para a planta (CARSON et al. 2000; ARORA et al. 2001).

2.3.2. Mecanismos Indiretos

O principal mecanismo indireto de promoção do crescimento vegetal está relacionado ao uso de rizobactérias como agentes de biocontrole contra fitopatógenos, pela indução de resistência e pela produção de substâncias antifúngicas. Muitas bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são capazes de produzir metabólitos antifúngicos, como, o ácido cianídrico e enzimas, como, quitinases e glucanases que degradam a parede celular dos fungos (PERSELLO-CARTIEAUX et al., 2003).

A interação planta-rizobactéria estimula o vegetal a adquirir resistência contra alguns micro-organismos patogênicos, como, bactérias, fungos e vírus. Esse processo é chamado de resistência sistêmica induzida (ISR), que é desencadeado por meio da liberação algumas moléculas bacterianas que ativam genes promotores de compostos de defesa na planta (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009).

Estirpes de *B. subtilis*, quando utilizadas como agente de biocontrole contra fitopatógeno, realizam esse mecanismo pela produção substâncias antibióticas (KOKALIS-BURELLE et al., 2003). *P. fluorescentes* são bactérias conhecidas pela supressão de fungos patogênicos no solo, pela produção de metabólitos antifúngicos e pela liberação de sideróforos, indisponibilizando ferro para os patógenos de raiz (DWIVEDI & JOHRI, 2003). Várias espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas* são utilizadas no controle biológico, como em plantas de tomate quando inoculadas com bactérias desses gêneros, ocasiona uma redução nos sintomas de murcha causados por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (ROCHA & MOURA, 2013).

As BPCVs além de atuarem no controle de bactérias, fungos e vírus, também podem atuar no controle de nematoides. Estudos com plantas de melancia e melão quando inoculadas com BPCVs, resultou em uma redução ao ataque de nematoide nessas plantas (KOKALIS-BURELLE et al., 2003). Em sementes de arroz inoculadas com BPCVs pôde-se observar o controle de

Meloidogyne graminicola associado à promoção de crescimento das plantas (SOUZA JUNIOR et al., 2010)

2.4. Colonização Bacteriana

A colonização das raízes das plantas por rizobactérias benéficas é um passo importante para a interação bactérias-planta, entretanto, é um processo complexo influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos, tais como a quantidade de bactérias e exsudatos radiculares. (BENIZRI et al., 2001). O sucesso da colonização radicular por rizobactérias, bem como sua persistência na rizosfera são fatores fundamentais para exercer os efeitos benéficos sobre as plantas. É necessária uma densidade bacteriana mínima para que os mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos de interação planta-microrganismo se estabeleçam, sendo esse conceito denominado *quorum sensing* (QS) (WILLIAMS et al., 2007; SANCHEZ-CONTRERAS et al., 2007).

O mecanismo de QS depende da síntese e liberação de sinais químicos pelas bactérias no ambiente, e na detecção destes sinais como em função da densidade da população de células (CAMILLI & BASSLER, 2006). Tal comportamento de grupo resulta na alteração da expressão genética, a qual impulsiona as atividades dos microrganismos de forma coordenada (WILLIAMS et al., 2007). Dentre os sinais químicos liberados, os mais comumente utilizados por bactérias Gram-negativas denominam-se homoresinas lactonas, originalmente chamadas de N-acil lactonas homoserinas (AHLs). A biossíntese e efeitos de autoindutores como as AHLs dependem principalmente da atividade das famílias de proteínas e LuxI LuxR, respectivamente. Depois que as AHLs são produzidas pelas enzimas AHL sintases, elas difundem através de membranas bacterianas e acumulam até atingirem concentrações mais elevadas. Num dado limiar de concentração intracelular (cerca de 10nM), o AHL liga-se ao gene LuxR formando um complexo que regula a expressão do gene (HANZELKA & GREENBERG, 1995).

A comunicação via *quorum sensing* pelas AHLs em rizóbios afeta seus processos metabólicos e fisiológicos, incluindo motilidade, síntese de exopolissacarídeos, formação de biofilme, produção de fatores de virulência, transferência de plasmídeo, eficiência na nodulação das raízes e eficiência de

fixação de nitrogênio (GONZÁLEZ & MARKETON, 2003; SANCHEZ-CONTRERAS et al., 2007; PIERSON & PIERSON, 2007). Estudos realizados com rizobactérias do gênero *Pseudomonas* marcados com genes de fluorescência verificaram que, em consequência da colonização radicular por essas bactérias, houve aumento na biossíntese de sideróforos, reguladores de crescimento, antibióticos e hidrolases (COMPANT et al., 2010).

2.5. Referencias Bibliográficas

ABBASI, M.K. et al. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. **Plant Biosystems**, v.145, p.159-168, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS – ABCSEM. **Projeto para levantamento dos dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil 2010/2011**. Campinas: ABCSEM, 2011. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/docs/direitos_resevados.pdf>. Acesso em: 05 mai. 2015.

AHEMAD, M. et al. Remediation of herbicides contaminated soil using microbes. In: KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (Eds.), *Microbes in Sustainable Agriculture*. New York: Nova **Science Publishers**, 2009.

AHEMAD, M. & KHAN, M.S. Productivity of greengram interconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. MRM6 strain. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.34, p.245-254, 2012.

ARORA, N.K et al.. Isolation of siderophore producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. **Curr Sci.**, v.81,p. 673–677, 2001.

BHATTACHARYYA, P.N. & JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1327-1350, 2012.

BENIZRI E et al. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology** v. 11p. 557-574, 2001.

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

BOIERO L. et al. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.74, p.874–880, 2007.

BRENCIC A. & WINANS S.C. Detection of and response to signals in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. V.69, p.155-194, 2005.

BULGARELLI, D. et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.64, p.807-838, 2013.

CAMILI, E.C. Ação de biorreguladores na brotação, produção e algumas características físico-químicas de uva do cultivar superior seedless. Tese (Doutorado em Agronomia)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2007.

CAMILLI A. & BASSLER B. L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science**, v. 311, p. 1113-1116, 2006.

CARSON, K. C. et al. Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. **Soil Biol. and Biochem**. V.32, p.11-21, 2000.

CASTRO, C.M. et al. Adubação verde como fonte de nitrogênio para a cultura da berinjela em sistema orgânico. **Pesq. agropec. bras.**, v.39, n.8, p.779-785, ago. 2004.

COMPANT S. et al. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p.669-678, 2010.

DEY, R. et al. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L) by application of plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v.159, p.371-394, 2004.

DOBBELAERE, S. et al. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.107149, 2003

DWIVEDI, D. & JOHRI, B.N. Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. **Current Science**, v.12, p.1693-1703, 2003.

FLORES-FELIX, J.D. et al. Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. **J Plant Nutr Soil Sci** v.176, p. 876–882, 2013.

GARCIA-FRAILE, P. et al. Rhizobium Promotes Non-Legumes Growth and Quality in Several Production Steps: Towards a Biofertilization of Edible Raw Vegetables Healthy for Humans. **Plos One**, v.7, p.1-7, 2012.

GHOLAMI, A. et al. The effect of plant growth promoting rizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. **International Journal of Biological Life Sciences**, v.1, p.35-40, 2009.

GLICK, B.R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v.251, p.1-7, 2005.

- GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Hindawi Publishing Corporation**, v.2012, p.1-15, 2012.
- GONZÁLEZ J.E. & MARKETON M.M. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 67:574-592, 2003.
- GOPALAKRISHNAN, S. et al. The extent of grain yield and plant growth enhancement by plant growth-promoting broad-spectrum *Streptomyces* sp. in chickpea. **SpringerPlus**, v. 4:31, p. 1-10, 2015.
- GRAY, E.J.& SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.395-412, 2005.
- GURURANI, M.A. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.32, p.245-258, 2013.
- HAMEED, S. et al. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. **Biology Fertility Soils**, v. 39, p. 179-185, 2004.
- HAHN, L. et al. Growth promotion in maize with diazotrophic bacteria in succession with ryegrass and white clover. **American and Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**, v.14. n.1, p.11-16, 2014.
- HANZELKA, B.L. & GREENBERG, E.P. Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. **J. Bacteriol.** 177:815-817, 1995.
- HARTHMANN, O.E.L. et al. Rizobactérias no crescimento e na produtividade da cebola. **Ciência Rural**, v.40, p.462-465, 2001.
- HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals Microbiology**, v.60, p.579-598, 2010.
- INCAPER. **Instituto Capixaba de Pesquisa**, Assistência Técnica e Extensão Rural. Disponível em <<http://www.incaper.es.gov.br/pedeag/setores07.htm>> Acesso em 29. Abr. 2013.
- JAMES, E.K. et al. Endophytic diazotrophs associated with rice. In: LADHA, J.K.; REDDY, P.M. (Eds.), **The quest for nitrogen fixation in rice**. Los Banos: International Rice Research Institute, p.119-140, 2000.
- JEONG, J. & GUERINOT, M.L. Homing in on iron homeostasis in plants. **Trends of Plant Science**, v.14, p.280-85, 2009.
- KANG, B.G. et al. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. **Plant Biotechnology Reports**, v.4, p.179-183, 2010.

KARAKURT, H. & KOTAN, R. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on fruit set, pomological and chemical characteristics, color values, and vegetative growth of sour cherry (*Prunus cerasus* cv. kütahya). **Turkish Journal of Biology**, v.35, p.283-291, 2011.

KENNEDY, I.R. et al. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. **Soil Biology and Biochemistry**, v.3, p.1229-1244, 2004.

KHAN, M.S. et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. **Environmental Chemistry Letters**, v.7, p.1-19, 2009.

KHAN, M.S. et al. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.27, p.29-43, 2006.

KHALID A. et al. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.473-480, 2004.

KLOEPPER, J.W. et al. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Ecology and Epidemiology*, v.70, p.1078-1082, 1980.

KLOEPPER, J.W. & SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: **Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**. Angers: INRA, v.2, p.879-882, 1978.

KOKALIS-BURELLE, N. et al. Amendment of muskmelon and watermelon transplant media with plant growth promoting rhizobacteria: effects on disease and nematode resistance. **Horticultural Technology**, v.13, p.476-48, 2003.

LAMBRECHT, M. et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.8, p.298-300, 2000.

LINDERMANN, W.C. & GLOVER, C.R. Nitrogen fixation by legumes. **College of Agriculture, Consumer and Environmental Sciences**. Guide A-129, 4p., 2003.

LUGTENBERG, B. & KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.63, p.541-556, 2009.

MACHADO, R.G. **Promoção de Crescimento em Gramíneas Forrageiras por Rizóbios Isolados de *Lotus Corniculatus***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do rio Grande do Sul. Porto alegre. 70 p. 2011.

MACHADO, R.G. **Seleção de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas Forrageiras**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do rio Grande do Sul. Porto alegre. 123 p. 2015.

MARRA L.M. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Sci. Agric.**, v.68, n.5, p.603-609, 2011.

ONOFRE-LEMUS J, et al. ACC (1-aminocyclopropane-1- carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth promoting effect on tomato plants. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, p. 6581–6590, 2009.

ORTÍZ-CASTRO et al. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. **Plant Signaling e Behavior**, v.3:4, p.263-265, 2008.

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

PERSELLO-CARTIEAUX, F. et al. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant, Cell & Environment**, v.26, p.189-199, 2003.

PIERSON L.S. & PIERSON E.A. Roles of diffusible signals in communication among plant-associated bacteria. **Phytopathology**, v. 97, p 227–232, 2007.

RAJKUMAR, M. et al. Potential of siderophoreproducing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v.28, p.142-149, 2010.

RUBIO, L.M. & LUDDEN, P.W. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Annual Review of Microbiology**, v.62, p.93-111, 2008.

ROCHA, D.J.A.& MOURA, A.B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v.38, p.423-430, 2013.

SAHARAN, B.S. & NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 21, p.1-30, 2011.

SALEEM, M. et al. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.34, p.635-648, 2007.

SANCHEZ-CONTRERAS, M. et al. Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Philosophical Transactions – The Royal Society Biological Sciences*, v. 362, p.1149-1163, 2007.

SANTOS C. E. et al. **Anuário brasileiro de hortaliças**. Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta Santa Cruz, 68 p. 2015.

SANTNER, A. & ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. **Nature**, v.459, p.1071-78, 2009.

SOUZA J. L. N. **O uso de agrotóxico entre produtores de hortaliças na localidade do Passo do Vigário, Viamão/RS.** Trabalho de conclusão de curso. Universidade federal do Rio Grande do Sul. Pinhal. 66 p. 2011

SOUZA JÚNIOR, I.T. et al. Biocontrole da queima-das-bainhas e do nematoide-das-galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.1259-1267, 2010.

STEFAN, M. et al. Plant growth promoting Rhizobacteria can inhibit the in vitro germination of *Glycine Max* L. seeds. **Scientific Annals of "Alexandru Ioan Cuza" University Iasi**, Section Genetics and Molecular Biology, v.3, p.105-110, 2008.

STEARNS, J.C. & GLICK, B.R. Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. **Biotechnology Advances**, v.21, p.193-210, 2003.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Art Med, 2013. 954p.

THAKURIA, D. et al. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. **Current Science**, v. 86, p. 978-985, 2004.

VAN LOON, L.C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **Eur J Plant Pathol**, v. 119, p. 243–254, 2007.

VANSUYT, G. et al. Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.20, p.441-7, 2007.

VIAL, L. et al. The various lifestyles of the Burkholderia cepacia complex species: a tribute to adaptation. **Environ Microbiol**, v.13, p.1–12, 2011.

VIKRAM, A. & HAMZEHZARGHANI, H. Effect of phosphate solubilizing bacteria on nodulation and growth parameters of greengram (*Vigna radiata* L. Wilczec). **Research Journal of Microbiology**, v.3, p.62-72, 2008.

WILLIAMS, P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. **Microbiology**, v.153, p. 3923-3938, 2007.

ZAHIR, Z.A. et al. Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. **Arch Microbiol**, v. 191, p.415–424, 2009.

ZAHIR, Z.A. et al. Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.958-963, 2008.

ZAFAR-UL-HYE, M .et al. Preliminary screening of rhizobacteria containing ACC-deaminase for promoting growth of lentil seedlings under axenic conditions. **Pakistan Journal of Botany**, v.39, p.1725-1738, 2007.

ZEHR, J.P. et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environ. Microbiol**, v.5, p. 539–554, 2005.

3. CAPÍTULO II. INFLUÊNCIA DOS RIZÓBIOS NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE, CENOURA, RABANETE E RÚCULA

Resumo: A inoculação com rizóbios, tem se mostrado capazes de promover o crescimento de plantas não-leguminosas, principalmente pela produção de reguladores de crescimento, como o ácido indolacético (AIA). O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da inoculação de bactérias produtoras de AIA e da adição de diferentes concentrações de AIA sintético na germinação de sementes de rabanete, rúcula, alface e cenoura. Foram utilizados 27 isolados de rizóbios os quais foram crescidos por sete dias em meio levedura-manitol. Posteriormente foi avaliada a capacidade de produção de AIA e a influencia na germinação de sementes pela inoculação com rizóbios como também pelas diferentes concentrações de AIA sintético. Todos os isolados foram capazes de produzir ácido indolacético *in vitro* variando entre 0,7 à 56 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com destaque para a estirpe SEMIA 3007, recomendada para inoculantes de ervilha, que apresentou uma maior produção de AIA. Nas sementes de rabanete a adição de ácido indolacético não teve efeito na verminação e velocidade de germinação. Em sementes de rúculas a adição das diferentes doses de AIA aumentaram a germinação e o IVG. Em sementes de alface a inoculação de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA não teve efeito na germinação e as demais doses tiveram efeito negativo, já as doses de 1 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aceleraram a germinação dessas plantas. Em sementes de cenoura a adição de AIA não teve efeito e na dose mais alta, houve uma redução na germinação e no IVG dessas sementes. A inoculação com rizóbios teve efeito positivo nas sementes de rúcula, alface. Já em sementes de rabanete e cenoura a inoculação com rizóbios não teve efeito na germinação dessas sementes.

Palavras-Chaves: germinação, rizóbios, ácido indolacético, hortaliças

3.1. INTRODUÇÃO

As espécies olerícolas constituem um grupo bastante variado de plantas abrangendo mais de 100 espécies cultivadas, sendo a produção anual em torno de 19 milhões de toneladas (ABCSEM, 2011). São espécies exigentes em nutrientes os quais devem estar disponíveis no solo para seu crescimento e desenvolvimento.

Uma das alternativas para diminuir o uso de fertilizantes minerais é o enriquecimento da rizosfera com bactérias que promovam o crescimento de plantas. A inoculação de bactérias sobre as sementes e substrato pode favorecer a produção de mudas mais vigorosas devido à proteção contra patógenos presentes no solo, a produção de reguladores de crescimento, o melhor uso de fertilizantes e indução de tolerância ao estresse ambiental (COMPANT et al, 2010; GLICK, 2010).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs) vivem associadas à rizosfera, colonizando as raízes das plantas e podem promover efeitos benéficos sobre as mesmas, como o aumento a taxa de germinação de sementes (AMORIN & MELO, 2002; DEY et al., 2004; KOZUSNY-ANDREANI et al. 2012). Que pode ocorrer pela sua capacidade em produzir substâncias reguladoras de crescimento, como as da classe das giberelinas, que estão diretamente ligadas aos processos de germinação de sementes.

Durante a germinação de sementes o ácido indolacético (AIA) exógeno pode estimular a biossíntese de giberelina, que irá induzir a síntese de α -amilase que é uma enzima hidrolítica conhecida por desempenhar importante papel na degradação de carboidratos de reservas durante a germinação de sementes. Assim, a indução de α -amilase é essencial para manter a atividade do metabolismo respiratório e, por conseguinte, a germinação das sementes (PERATA et al., 1997; BERI & GUPTA, 2007).

Um dos mecanismos mais estudados por bactérias promotoras de crescimento vegetal é a produção de auxina equivalente a AIA, que é um regulador de crescimento que está envolvido na regulação de vários processos celulares de crescimento e desenvolvimento dos vegetais. Um dos efeitos da inoculação dessas bactérias é na proliferação de raízes aumentando a absorção de nutrientes pela planta e promovendo o crescimento do vegetal

(LAMBRECHT et al., 2000). Esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da inoculação de rizóbios produtores de AIA e da adição de diferentes concentrações de AIA sintético na germinação de sementes de alface, cenoura, rabanete e rúcula.

3. 2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Isolados de rizóbios

Foram utilizados rizóbios isolados de trevo branco (UFRGS-Vp 16), cornichão (UFRGS-Lc 348, UFRGS-Lc 336, UFRGS-Lc 394 e UFRGS-LG 111) ervilha (UFRGS-Ps1, UFRGS-Ps2, UFRGS-Ps3, UFRGS-Ps4, UFRGS-Ps5, UFRGS-Ps6, UFRGS-7, UFRGS-Ps8, UFRGS-Ps9, UFRGS-Ps10, UFRGS-Ps11, UFRGS-Ps12, UFRGS-Ps13, UFRGS-Ps14, UFRGS-Ps15, UFRGS-Ps16, UFRGS-Ps17), obtidos da Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS. Além destes isolados, também foi utilizada a estirpe SEMIA3007, liberada para produção de inoculantes para ervilha, obtida da Coleção de Culturas do Rizóbios da Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO) e três isolados de ervilha (EEL5501, EEL6802, EEL212-7) da coleção de cultura da EPAGRI.

3.2.2. Produção de ácido indolacético (AIA)

Para quantificação da produção de AIA pelos rizóbios foi utilizado o procedimento descrito por Asghar et al. (2002). Os isolados foram incubados durante 7 dias a 28°C sob agitação de 120 rpm. Posteriormente foi retirada uma alíquota de 10 mL da suspensão bacteriana contendo cerca de 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) mL^{-1} e colocada em tubos de centrífuga para que fossem centrifugadas durante 10 minutos a 10000 rpm a 4°C. Então, foi retirado 3 mL do sobrenadante e adicionado 2 mL do reagente de Salkowski, as amostras ficaram no escuro, a temperatura ambiente durante 30 minutos para que ocorra a reação. A quantificação de ácido indolacético produzido foi realizada através de leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530 nm. Para a determinação de ácido indol-acético, foi realizada uma curva padrão com concentrações conhecidas da forma

sintética do regulador de crescimento (0, 0,2, 1, 2, 3, 6, 11, 15, 20, 45, 100, 200 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), cujas leituras foram a base para calcular a concentração de AIA nas amostras.

3.2.3. Efeito de diferentes concentrações de AIA sintético na germinação de sementes de hortaliças

De modo a avaliar a influência da concentração de ácido indol-acético sintético na germinação de rabanete, alface, rúcula e cenoura, as sementes foram desinfestadas com álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 2,5% por 1 min, seguida de sete lavagens com água destilada estéril. Foram colocadas 40 sementes por placa contendo papel toalha umedecido previamente com 10 mL de meio líquido levedura-manitol (LM) estéril. E posteriormente adicionadas diferentes doses de AIA nas concentrações de 0; 1,0; 10, 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (SCHLINDWEIN et al., 2008). Após a montagem das placas, as sementes foram acondicionadas em estufa à 25° C.

Para avaliar a qualidade das sementes foram realizadas contagens no intervalo de 24h até o sétimo dia. Obtendo-se assim o índice de velocidade de germinação (IVG), calculado pela soma do número de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo respectivo número de dias transcorridos a partir da instalação do experimento, conforme Maguire (1962). Já para o teste de germinação (FERREIRA & BORGUETTI, 2004) foi levado em conta o total de sementes geminadas ao final dos sete dias. Os valores das variáveis germinação (G) e índice de velocidade de germinação (IVG) foram obtidos através das seguintes expressões:

$$G = \frac{N}{A} 100 ,$$

onde:

G = percentual de germinação;

N = número total de sementes germinadas;

A = número total de sementes colocadas para germinar;

$$IVG = \frac{\sum n_i}{\sum n_i t_i} ,$$

onde:

IVG = índice de velocidade de germinação;

n_i = número total de sementes germinadas num intervalo t_i ;

t_i = intervalo de tempo.

3.2.4. Efeito na germinação de sementes de plantas olerícolas inoculadas com rizóbios

Para avaliar o efeito dos rizóbios na germinação de sementes de rabanete, alface, rúcula e cenoura foram utilizadas sementes submetidas previamente à desinfestação com álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 2,5% por 1 min, seguida de sete lavagens com água destilada estéril. Foram colocadas 40 sementes por placa contendo papel toalha umedecido previamente com 10 mL de meio líquido levedura-manitol (LM) estéril, em seguida, 500 μ L de inóculo contendo cerca de 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) mL^{-1} em cada amostra, com quatro repetições. No tratamento controle adicionou-se apenas meio de cultura. Os inóculos foram obtidos através da multiplicação celular dos isolados em meio líquido LM e incubado sob agitação orbital à 120 rpm e 28° C por sete dias. Após a montagem das placas, as sementes foram acondicionadas em estufa à 25° C por sete dias, com avaliação diária. As avaliações foram realizadas conforme o item anterior.

3.2.5. Análise de dados

Para análise de variabilidade dos dados, aplicou-se análise de variância (ANOVA) utilizando o software Assistat versão 7.6 beta (SILVA, 2015) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott 5% de probabilidade de erro.

3. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 26 isolados foram capazes de produzir ácido indolacético *in vitro* sem a adição de triptofano (Tabela 3.1), com destaque para a estirpe SEMIA 3007, recomendada para produção de inoculantes para ervilha, que foi

capaz de produzir a maior concentração AIA em meio de cultura. O ácido indolacético é um regulador de crescimento de plantas sem função aparente em células bacterianas, e pode-se especular que produção AIA pode melhorar a interação entre plantas e bactérias (PATTERN & GLICK, 2002). A maioria dos rizóbios é capaz de produzir AIA, com variações nas faixas de concentração. Alguns autores relatam que o aumento na taxa de germinação de sementes está relacionado a baixos níveis de AIA, pois do contrário, pode inibir a germinação de sementes (PERATA et al., 1997; SCHLINDWEIN et al., 2008).

Tabela 3.1. Produção de auxina, equivalente ao ácido indolacético, em meio de cultura por rizóbios.

Rizóbios	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
EEL 212-7	11,02 e**
EEL 5501	43,37 b
EEL6802	38,43 c
UFRGS-Lc336	1,94 g
UFRGS-Lc348	7,86 e
UFRGS-Lc394	1,12 g
UFRGS-Lg111	0,91 g
UFRGS-Ps1	15,41 d
UFRGS-Ps2	12,7 e
UFRGS-Ps3	16,41 d
UFRGS-Ps4	4,93 f
UFRGS-Ps5	12,34 e
UFRGS-Ps6	10,29 e
UFRGS-Ps7	1,79 g
UFRGS-Ps8	0,71 g
UFRGS-Ps9	11,11 d
UFRGS-Ps10	0,95 e
UFRGS-Ps11	16,53 f
UFRGS-Ps12	9,45 d
UFRGS-Ps13	5,37 e
UFRGS-Ps14	15,07 f
UFRGS-Ps15	8,74 d
UFRGS-Ps16	7,24 g
UFRGS-Ps17	14,7 e
UFRGS-Vps18	1,6 g
SEMIA 3007	56,31 a
CV (%)	19,52

**= médias (3 repetições) seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias Scott-Knott (1%). CV= coeficiente de variação

Os efeitos do ácido indolacético (AIA) sintético na germinação (Figura 3.1) e na velocidade de germinação (Figura 3.2) de sementes de alface, cenoura, rabanete e rúcula, variaram de acordo com a dose e com espécie olerícola utilizada. Para as sementes de rabanete, no que se refere à germinação final e IVG, a adição de AIA não teve efeito. Para as sementes de rúcula a adição de AIA promoveu um aumento na taxa de germinação como também na velocidade de germinação. Diferentemente das sementes de alface na qual a adição de dose a partir de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ AIA apresentam efeito negativo na germinação, enquanto a adição de 1 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ AIA promoveu aumento na velocidade de germinação dessas sementes. Em relação às sementes de cenoura a adição de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AIA teve efeito negativo tanto na germinação final como também na velocidade de germinação dessas sementes

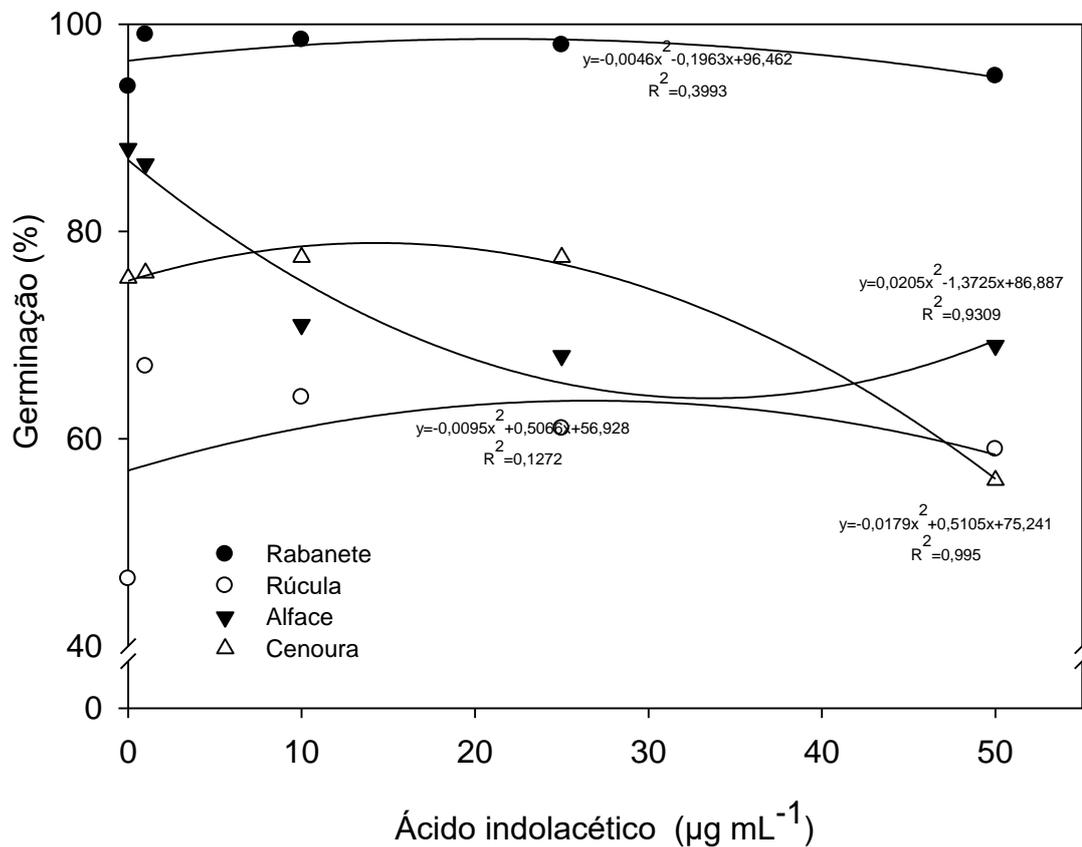


Figura 3.1. Porcentagem de germinação se sementes com adição de diferentes concentrações de ácido indolacético.

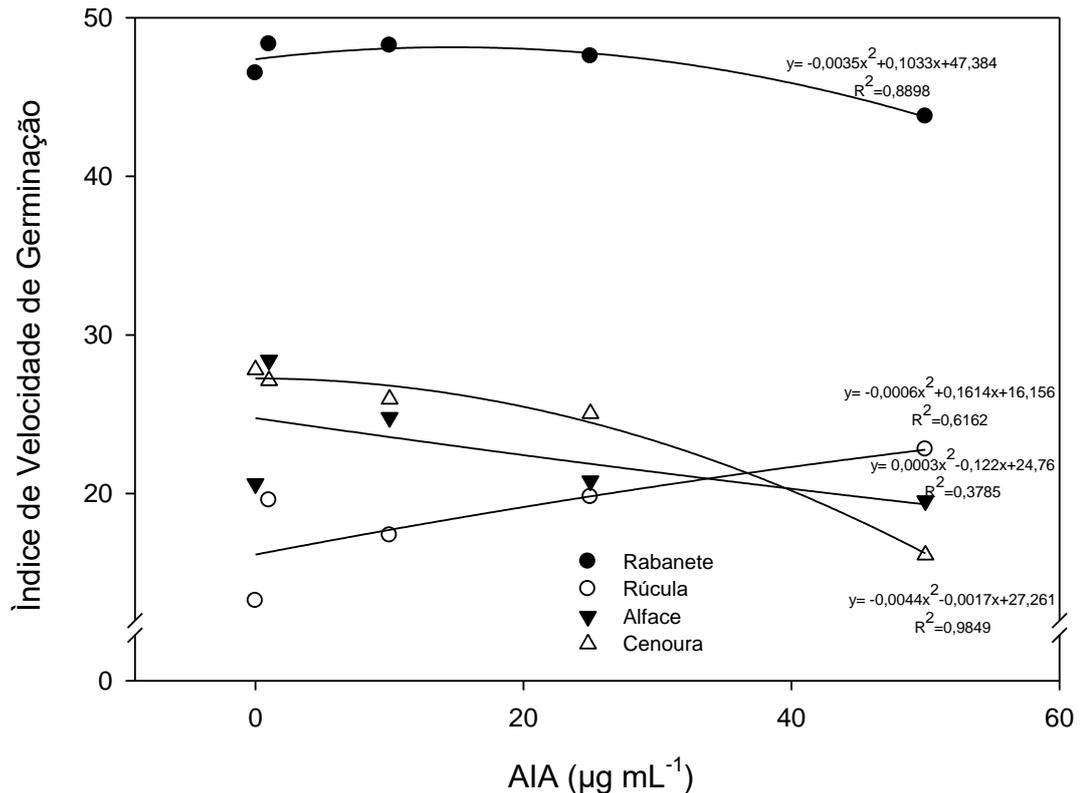


Figura 3.2. Índice de velocidade de germinação se sementes com adição de diferentes concentrações de ácido indolacético.

Estudos com rizobactérias produtoras de AIA, relatam que baixas concentrações de AIA promovem a indução da enzima α -amilase na germinação de sementes, pois o AIA exógeno estimula a biossíntese de ácido giberélico (GA). Com isso o ácido indolacético atua em conjunto com ácido giberélico e citocinina para regular os processos de germinação (PAULSEN & AULD et al., 2004; ANITHA, 2010; Li et al, 2012). Durante a germinação de sementes e as fases iniciais de crescimento das plântulas, as raízes em desenvolvimento liberam alguns exsudados, incluindo L-Triptofano, precursor de ácido indolacético, que algumas rizobactéria utilizam para produzir AIA. Esta interação positiva entre as raízes das plantas e AIA bacteriano pode, por sua vez, estimular o desenvolvimento radicular (LAMBRECHT et al., 2000). As auxinas, particularmente em concentrações elevadas, tendem a exercer impactos inibidores nas plantas. Este efeito inibidor tem, praticamente, sido associado com a auxina na induzindo de biossíntese de etileno (DAVIES, 2010).

Além da germinação, o alongamento do caule, que é uma característica normalmente associada à produção de giberelina, pode ser governada tanto

pelo AIA como GA. O ácido indolacético pode promover a biossíntese de giberelina na parte aérea das plantas. Portanto, as mudanças ainda que moderadas na oferta de AIA por bactérias, podem conduzir a alterações fisiologicamente significativas nos atributos de crescimento das mudas (O'NEILL & ROSS, 2002; DAVIES, 2010).

Os resultados obtidos nesse estudo, possivelmente podem ser explicados pela sensibilidade das plantas as diferentes concentrações de auxina exógena. Pois existe uma faixa de concentração ótima para atuação de um regulador de crescimento na planta e valores abaixo dessa faixa não apresentam respostas fisiológicas e valores acima irão causar efeitos inibitórios na planta. (ARAÚJO, 2008; BIANCHET *et al.*, 2013; SAHARAN & NEHRA, 2011).

As inoculações dos mesmos isolados nas diferentes espécies olerícolas apresentaram respostas diferentes de acordo com a semente inoculada. Possivelmente devido ao fato de a sensibilidade da planta a concentrações de auxina exógena variar de acordo como o estágio fisiológico do vegetal e também da espécie de planta utilizada. (JUNGLAUS, 2008; SAHARAN & NEHRA, 2011).

A inoculação de rizóbios em sementes de rabanete e cenoura (Tabela 3.2) não teve efeito sobre a germinação e de velocidade de germinação, na qual a maioria dos rizóbios inoculados reduziu a germinação dessas sementes em relação ao tratamento controle sem inoculação. A inoculação com os isolado EEL 5501, EEL 212-7 e UFRGS Lg 111 nas sementes de rabanete foram os que apresentaram menor porcentagem de germinação 64; 55 e 39,5% respectivamente. Quando observado o IVG, das plantas de rabanete, no tratamento controle sem a inoculação de micro-organismos observou-se a maior velocidade, superando todos os tratamentos avaliados. Como verificado anteriormente, no tratamento sem a inoculação de rizóbios a porcentagem de germinação de sementes de rabanete também foi superior às sementes inoculadas. Mahmoudi *et al.* (2014) observaram que, na presença de extratos de rabanete, há a inibição do mecanismo de *quorum sensing* de bactérias, afetando negativamente seus possíveis efeitos benéficos sobre a planta.

Nas sementes de cenoura a inoculação com os isolados UFRGS- Ps2, UFRGS-Ps3, UFRGS-Ps4, UFRGS-Ps5, UFRGS-Ps6, UFRGS-Ps7, UFRGS-

Ps8, UFRGS-Ps14 e UFRGS-Ps17 não tiveram efeito sobre a germinação e a inoculação como os demais teve efeito negativo na germinação das sementes. Resultado semelhante a velocidade de germinação na qual os isolados UFRGS-Ps1, UFRGS-Ps3, UFRGS-Ps4, UFRGS-Ps5, UFRGS-Ps7, UFRGS-Ps8, UFRGS-Ps10, UFRGS-Ps14 e UFRGS-Ps17 não tiveram efeito na velocidade germinação e a inoculação como os demais teve efeito negativo na velocidade germinação das sementes de cenoura.

Tabela 3.2. Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de rabanete e cenoura inoculadas com rizóbios.

Isolados	Rabanete		Cenoura	
	%G	IVG	%G	IVG
Controle	94 a	46,25 a	72 a	26,45 a
EEL 5501	64 c	19,04 f	29,5 c	8,87 c
EEL 6802	83 a	25,58 d	34,5 c	11,25 c
EEL 212-7	55 c	15,75 f	28 c	7,45 c
UFRG-Lc348	73 b	24,66 d	39 c	12,25 c
UFRGS-Lc 336	83 a	35,66 c	47 c	15,37 c
UFRGS-Lc394	76,5 b	22,04 e	30 c	9,66 c
UFRGS -Lg111	39,5 d	12,04 g	33,5 c	8,95 c
UFRGS-Ps1	84 a	37,87 c	63 b	25,2 a
UFRGS-Ps2	77 b	35,87 c	67,5 a	23,62 b
UFRGS-Ps3	82,5 a	37,75 c	72,5 a	28,2 a
UFRGS-Ps4	84 a	38,04 c	73,5 a	28,37 a
UFRGS-Ps5	78 b	36,25 c	73 a	28,37 a
UFRGS-Ps6	81 b	35,83 c	69 a	24,25 b
UFRGS-Ps7	78,5 b	33,87 c	68 a	26,54 a
UFRGS-Ps8	84 a	37,79 c	69 a	25,25 a
UFRGS-Ps9	75 b	34,95 c	63,5 b	23,04 b
UFRGS-Ps10	76 b	33,45 c	57 b	26,04 a
UFRGS-Ps11	80 b	34,58 c	59,5 b	21,7 b
UFRGS-Ps12	86 a	39,79 b	58,5 b	21,45 b
UFRGS-Ps13	82 a	36,83 c	61,5 b	20,95 b
UFRGS-Ps14	79,5 b	35,7 c	69 a	25,2 a
UFRGS-Ps15	77,62 b	28,5 d	64 b	22,58 b
UFRGS-Ps16	83 a	36,95 c	60 b	20,83 b
UFRGS-Ps17	89 a	38,58 c	71 a	27,25 a
UFRGS-Vp16	77,5 b	21,37 e	35 c	11,5 c
SEMIA 3007	89 a	40,7 b	56,5 b	21,5 b
CV(%)	8,26	9,21	15,21	16,61

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro. CV= coeficiente de variação

Com os resultados da inoculação de rizóbios em sementes de cenoura, não podemos inferir que altas doses de AIA, causem efeitos negativos no processo de germinação, pois os isolados que reduziram a germinação são produtores de AIA variando na faixa de 0,91 a 43,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Provavelmente a redução na germinação deve por algum outro metabólito produzido por essas bactérias, que não o ácido indolacético.

Para as sementes de alface e rúcula (Tabela 3.3) a inoculação com os isolados de rizóbios acelerou a germinação das sementes. Para rúcula, a inoculação com todos os rizóbios aumentou e acelerou a germinação, para todos os tratamentos inoculados, com destaque para os isolados EEL 212-7, UFRGS Lc 336, UFRGS Ps2, UFRGS Ps3, UFRGS Ps4, UFRGS Ps5, UFRGS Ps6, UFRGS Ps7, UFRGS Ps8, UFRGS Ps9, UFRGS Ps10, UFRGS Ps13, UFRGS Ps14, UFRGS Ps15, UFRGS Ps16, UFRGS Ps17 e SEMIA 3007, com germinação variando de 87-91% em relação ao controle sem inoculação na qual a taxa de germinação foi abaixo de 50%.

Em sementes de alface, a inoculação com os rizóbios isolados de ervilha UFRGS Ps1, UFRGS Ps2, UFRGS Ps3, UFRGS Ps4, UFRGS Ps5, UFRGS Ps6, UFRGS Ps7, UFRGS Ps8, UFRGS Ps9, UFRGS Ps11, UFRGS Ps12, UFRGS Ps13, UFRGS Ps14, UFRGS Ps15, UFRGS Ps16, UFRGS Ps17 e SEMIA 3007 aumentou a taxa de germinação em torno de 20 a 30% em relação ao controle com 70% de germinação. Entretanto os isolados EEL 6802, EEL 5501 e EEL 212-7, Lc348, Lc336, Lc394 e Lg111, Vp16 tiveram um efeito negativo na germinação de alface com valores entre 16-45% de germinação. A produção de AIA pelos isolados que aceleraram a germinação e o IVG variou entre aproximadamente 0,71 a 16,53 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valores esses que com exceção da estirpe SEMIA 3007 que produziu em torno de 56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e mesmo esta alta dose de AIA não teve efeito negativo na germinação de sementes de alface. Com a inoculação de AIA sintético em sementes de alface, as concentrações acima de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ já afetam negativamente a germinação. Esses valores de AIA produzidos pelo rizóbios inoculados nas sementes, não se enquadram nos valores de faixa ótima de concentração desse regulador de crescimento que podemos observar, em relação às doses de ácido indolacético sintético aplicado sobre a germinação de sementes de alface.

Os isolados de ervilha, UFRGS-Ps1 ao UFRGS-Ps17 juntamente com a SEMIA 3007, apresentam a mesma resposta na germinação de sementes de alface e rúcula, e foram capazes de produzir AIA na faixa de concentração entre 0,95-56,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 3.3. Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de alface e rúcula inoculada com rizóbios

Isolados	Alface		Rúcula	
	%G	IVG	%G	IVG
Controle	70 b	18,33 c	46,5 d	13,25 d
EEL 5501	16,5 d	4,58 d	80 b	34,75 b
EEL 6802	34 c	8,25 d	83,5 b	35,95 b
EEL 212-7	36 c	8,37 d	87 a	38,95 a
UFRG-Lc348	43 c	13,04 d	81 b	36,29 b
UFRGS-Lc336	45,5 c	11,95 d	87,5 a	41,79 a
UFRGS-Lc394	43,5 c	10,58 d	76 b	32,79 b
UFRGS -Lg111	33 c	10,29 d	70,5 c	29,08 c
UFRGS-Ps1	95,5 a	26,37 b	89 a	40,75 a
UFRGS-Ps2	89,5 a	26,04 b	90,5 a	42,16 a
UFRGS-Ps3	95 a	28,58 b	91,5 a	42,75 a
UFRGS-Ps4	93,5 a	26,79 b	90,5 a	42,04 a
UFRGS-Ps5	99 a	30,50 b	92,5 a	43,00 a
UFRGS-Ps6	91,5 a	25,29 b	89,5 a	41,75 a
UFRGS-Ps7	94,5 a	28,33 b	89 a	40,41 a
UFRGS-Ps8	95,5 a	29,45 b	91 a	40,91 a
UFRGS-Ps9	98,5 a	29,29 b	87,5 a	40,16 a
UFRGS-Ps10	81 b	39,37 a	89 a	40,70 a
UFRGS-Ps11	100 a	35,62 a	68 c	28,50 c
UFRGS-Ps12	90,5 a	32,62 a	85 b	39,37 a
UFRGS-Ps13	99 a	35,41 a	90,5 a	39,45 a
UFRGS-Ps14	98 a	34,75 a	89,5 a	41,58 a
UFRGS-Ps15	100 a	37,08 a	87,5 a	37,04 b
UFRGS-Ps16	98 a	34,54 a	89,5 a	39,16 a
UFRGS-Ps17	93 a	35,54 a	90 a	41,87 a
UFRGS-Vp16	68 b	17,16 c	84,5 b	36,66 b
SEMIA 3007	93,5 a	32,66 a	86,5 a	38,33 b
CV (%)	14,06	15,02	5,91	7,62

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro. CV= coeficiente de variação

3. 4. CONCLUSÕES

Tanto a adição de adição de AIA sintético como a inoculação de rizóbios em sementes de rabanete não melhorou a qualidade fisiológica dessas sementes, sem efeito sobre a germinação e IVG das mesmas.

As sementes de rúcula se mostraram mais sensíveis à adição de AIA, com aumento na germinação e IVG em todas as concentrações testadas, como também com a inoculação de rizóbios.

A adição de AIA não teve efeito sobre a germinação final de sementes de alface, porém as menores concentrações aceleram a germinação dessas sementes. E a inoculação com rizóbios aumentou a germinação e a velocidade germinação das mesmas.

Em sementes de cenoura a adição da maior concentração de ácido indolacético teve efeito negativo na germinação e na velocidade de germinação dessas sementes. Assim como a inoculação de rizóbios nessas sementes não teve efeito.

Apesar o ácido indolacético não estar envolvido diretamente no processo de germinação, a inoculação com rizóbios capazes de produzir AIA acelerou a germinação de sementes de alface e rúcula. Seja pela interação com outros reguladores de crescimento ou por outros metabólitos produzidos por essas bactérias.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS – ABCSEM. **Projeto para levantamento dos dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil 2010/2011**. Campinas: ABCSEM, 2011. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/docs/direitos_resevados.pdf>. Acesso em: 05 mai. 2015.

AMORIN, E.P.R. & MELO, I.S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeitos no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 565-568, 2002.

ANITHA, K.G. Enhancing seed germination of mono and dicotyledons through IAA production of PPFM Trends. **Soil Sci Plant Nutr** v.1, p. 14-18, 2010.

ARAÚJO, A. E. **Caracterização e uso de bactérias diazotróficas isoladas de diferentes cultivares de arroz originárias do estado do Maranhão.** Tese Doutorado em Ciências. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 99p. 2008

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

BERI. V. & GUPTA, R. Acetyl cholinesterase inhibitors neostigmine and physostigmine inhibit induction of alphaamylase activity during seed germination in barley, *Hordeum vulgare* var. Jyoti. **Life Sci** , v.80, p. 2386-2388, 2007.

BIANCHET, P. et al. Formulações simples e mista de inoculantes com bactérias diazotróficas, sob diferentes doses de nitrogênio na cultura do arroz irrigado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2655-2666, 2013.

COMPANT, S. et al. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biol. Biochem.**, v. 42, p.669-678, 2010.

DAVIES, P.J. 2010. **Plant hormones, biosynthesis, signal transduction, action**, rev. 3rd edn. Springer, 2010.

DEY, R. et al. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 159, p. 371-394, 2004.

FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F.: **Germinação: do básico ao aplicado.** Porto Alegre, Artmed, 520p., 2004.

GLICK, B.R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. **Biotechnol. Adv.** 28:367-374, 2010.

JUNGLAUS, R. W. **Aplicação de bioestimulante vegetal sobre o desenvolvimento de pepineiro (*cucumis sativus*) enxertado e não enxertado.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrônômica, Universidade Federal Paulista. Botucatu. 65p. 2008.

KOZUSNY-ANDREANI, D.I. et al. Efeito de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas no desenvolvimento de mudas de salsa. **Revista Cultivando Saber**, Cascavel, v.5, n.4, p. 203-212, 2012.

LAMBRECHT, M. et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.8, p.298-300, 2000.

LI, F. et al. Promotion of IAA, NAA on seed germination of Jacaranda mimosifolia. **J Ag Sci Tech** v.2, n. 2, p. 1184-1189, 2012.

MAHMOUD, E. et al. Dual behavior of plants against bacterial quorum sensing: inhibition or excitation. **Journal of Plant Pathology**, v.96, p.295-301, 2014.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination – and in selection for seedling emergence and vigor. **Crop Science, Madison**, v.2, n.2, p.176-177, 1962

O'NEILL, D.P. & ROSS J.J. Auxin regulation of the gibberellin pathway in pea. **Plant Physiol** v. 130, p. 1974-1982, 2002.

PAULSEN, G.M. & AULD, A.S. **Preharvest sprouting of cereals**. In: Benech-Arnold, R.L., and Sanchez, R.A. (eds) Handbook of seed physiology applications to agriculture. Food Products Press, New York, USA, p. 199-219, 2004.

PERATA, P. et al. Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. **Ann Bot**, v.79, p. 49-56, 1997.

PATTERN, C.L. & GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* in lactic acid development of the host plant root system. **App. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 3795-3801, 2002.

SAHARAN, B.S. & NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 21, p.1-30, 2011.

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

SILVA, F. Assistat versão 7.6 beta. Programa de análise estatística. Disponível em: <http://www.assistat.com/> 2015

4. CAPÍTULO III. RIZÓBIOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM ALFACE, BETERRABA, COUVE E SALSA

Resumo: Sistemas de produção de hortaliças demandam grandes quantidades de fertilizantes. Uma das alternativas para melhorar a produção no setor olerícola com redução de custos econômicos e ambientais, seria a inoculação de micro-organismos promotores de crescimento vegetal, como rizóbios. Devido sua capacidade de promover o crescimento de plantas de outras famílias além das leguminosas. O objetivo desse estudo foi avaliar a promoção de crescimento e seus mecanismos. Todos os isolados estudados foram capazes de produzir AIA e solubilizar fosfato. Apenas os isolados UFRGS-Vp16 e UFRGS-Ls 54 de produzir sideróforos. Nas plantas de beterraba, a inoculação com UFRGS-Ls 54 ocasionou em acréscimo na produção de massa seca e melhorou a absorção de nutrientes das plantas inoculadas em relação ao controle não inoculado com 50% N. Para as plantas de couve, a inoculação com UFRGS Ls14, UFRGS Ps10, UFRGS-Ps8, promoveu um aumento de massa seca como também melhorou a absorção de nitrogênio em relação ao controle não inoculado com 50% de N. Para as planta de salsa, a inoculação com UFRGS-Ls14, UFRGS-Lu45 e UFRGS-Lc38 não apresentou diferença estatística em relação ao controle não inoculado com 100% N como também melhorou a absorção de N nas plantas inoculação em relação ao controle não inoculado com 50% N. A inoculação com UFRGS-Ps11, UFRGS-Lc336, UFRGS-348 e da estirpe SEMIA 3007 em plantas de alface, promoveu um aumento de massa seca em relação a plantas não inoculadas com 50%N e a inoculação da estirpe SEMIA 3007 melhorou a absorção de nitrogênio pelas plantas inoculadas, não diferindo do tratamento controle não inoculado com 100% N. A inoculação com rizóbios auxiliou o crescimento de plantas de beterraba, couve, salsa e alface em relação ao controle com metade da dose usual de nitrogênio para cada cultura.

Palavras-chaves: rizóbios; hortaliças; ácido indolacético, solubilização de fosfato, sideróforos

4.1. INTRODUÇÃO

Com a atual preocupação com a saúde e com a qualidade dos alimentos, tem se buscado alternativas para reduzir o uso de fertilizantes minerais. Uma das alternativas para a redução de fertilizantes na produção de alimentos é a utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCVs). Porém é importante selecionar micro-organismos seguros para os seres humanos, para que possam ser utilizados como inoculantes, principalmente em hortaliças que são consumidas cruas, a fim de evitar problemas sanitários oriundos de bactérias patogênicas nos produtos finais (GARCÍA-FRAILE, 2012; FLORES-FELIX et al, 2013).

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs), quando inoculadas em diversas culturas não-leguminosas podem afetar positivamente o crescimento das plantas por mecanismos diretos, como a aquisição de nutrientes e biossíntese de reguladores de crescimento. Como também por mecanismos indiretos, tais como a produção de enzimas líticas, quitinases e β -1,3-glucanases (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009;. DODD et al 2010;. GLICK 2012; GAIERO et al. 2013; AHEMAD & KIBRET, 2014).

Em plantas não-leguminosas as BPCVs já são utilizadas como inoculantes comerciais no Brasil para gramíneas, como exemplo, estirpes de *Azospirillum brasiliense* utilizadas para promover o crescimento de arroz, milho e trigo e *Bacillus subtilis* em eucalipto (BRASIL, 2011). Embora a eficácia de rizóbios em interações simbióticas com plantas leguminosas através da fixação biológica de nitrogênio seja bem conhecida, recentemente, tem sido relatado que as estirpes de rizóbios são também excelentes promotores de crescimento de plantas. (GARCÍA-FRAILE et al., 2012; FLORES-FELIX et al. 2013; OSÓRIO FILHO et al., 2014; HAHN et al.,2014).

Até o momento não há inoculantes comerciais para não-leguminosas com base em rizóbios. Após décadas de inoculação com sucesso em leguminosas, esses micro-organismo também tem potencial como promotores de crescimento em não-leguminosas. Os resultados promissores encontrados em estudos envolvendo rizóbios, em plantas não-leguminosas, como, arroz, milho, cevada (MIRANSARI & SMITH, 2009; OSÓRIO FILHO et al., 2014; HAHN et al.,2014) despertam o interesse e busca de estirpes de rizóbios,

capazes de promover o crescimento de hortaliças. Este estudo tem como objetivos: a) avaliar os mecanismos diretos de promoção de crescimento de rizóbios; b) avaliar os efeitos da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento de plantas olerícolas, como, alface, beterraba, couve e salsa.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Isolados de rizóbios

Os isolados de rizóbios utilizados nesse estudo foram isolados de nódulos de leguminosas forrageiras e de plantas de ervilha. (Tabela 4. 1).

Tabela 4.1. Rizóbios utilizados no estudo e planta hospedeira.

Rizóbio	Planta hospedeira
SEMIA 3007	<i>Trifolium repens</i>
UFRGS-Ps1	<i>Pisum sativum</i>
UFRGS-Ps8	<i>Pisum sativum</i>
UFRGS-Ps10	<i>Pisum sativum</i>
UFRGS-Ps11	<i>Pisum sativum</i>
UFRGS-Ps15	<i>Pisum sativum</i>
UFRGS-Vp16	<i>Trifolium repens</i>
UFRGS-Lc128	<i>Lotus corniculatus</i>
UFRGS-Lc348	<i>Lotus corniculatus</i>
UFRGS-Lc336	<i>Lotus corniculatus</i>
UFRGS-Lc156	<i>Lotus corniculatus</i>
UFRGS-Ls14	<i>Lotus subbiflorus</i>
UFRGS-Ls54	<i>Lotus subbiflorus</i>
UFRGS-Lu45	<i>Lotus uliginosus</i>

4.2.2. Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento dos rizóbios

A avaliação quanto à capacidade dos isolados de produzirem ácido indolacético (AIA) foi realizada em meio de cultura levedura-manitol (LM) (VINCENT, 1970) de acordo com o método colorimétrico de Asghar *et al.* (2002). Os isolados foram cultivados em meio LM, e incubados durante 7 dias a 28°C, sob agitação de 120 rpm. Posteriormente, retirou-se uma alíquota de

10 mL da suspensão bacteriana, contendo cerca de 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) mL^{-1} , e colocou-se em tubos de centrífuga para centrifugação por 5 minutos a 10000 rpm a 4°C . Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 1,5 mL do sobrenadante e adicionado 1 mL do reagente de Salkowski (2 mL de FeCl_3 + 98 mL de HClO_4 35%). O ácido perclórico tem a função de oxidar o ácido indolacético na presença de cloreto de ferro, produzindo uma coloração rosada, na qual a intensidade é proporcional à quantidade de ácido indolacético na amostra conforme leitura em espectrofotômetro. Posteriormente, as amostras com adição o reagente de Salkowski foram mantidas no escuro, a temperatura ambiente durante 30 minutos para que ocorresse a reação de oxidação. Posteriormente, foi realizada a quantificação de ácido indolacético produzido pelos rizóbios, em triplicada, utilizando-se espectrofotômetro a um comprimento de onda de 530 nm (GORDON & WEBER, 1951). A concentração de AIA nas amostras foi calculada comparando-se as leituras das amostras inoculadas com uma curva padrão, com 0; 0,2; 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11; 13; 15; 17; 20; 25; 50; 100 $\mu\text{g/mL}$ de AIA sintético.

A metodologia para quantificação de sideróforos em solução foi efetuada conforme Schwyn & Neiland (1987) com modificações. A solução de cromoazurol S (CAS) foi feita como descrito a seguir, 6 mL de HDTMA 10 mM foram adicionados em balão volumétrico de 100 mL e diluído em pouca quantidade de água. Uma mistura de 1,5 mL de ferro III (1mM Fe_3Cl_3 em HCl 10 mM) e 7,5 mL de solução CAS (2 mM) foi adicionada ao balão volumétrico. Piperazina anidra 4,307g foi dissolvida em água e 6,25 mL de HCl 12 M foram adicionados. Essa solução (pH 5,6) foi adicionada ao balão volumétrico até completar os 100 mL.

Os isolados em estudo foram inoculados em meio King B, incubados a 28°C durante 7 dias. Após o período de incubação do inóculo foi retirada uma alíquota de 50 μL da suspensão bacteriana contendo cerca de 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) mL^{-1} e colocada em placa de ELISA e adicionados 50 μL da solução indicadora de CAS. Os rizóbios que conseguiram converter a cor azul para o amarelo no período de 15 minutos, foram considerados produtores de sideróforo. Como controle positivo foi utilizado à

estirpe SEMIA 4077 e como controle negativo foi utilizado o isolado UFRGS-Lu25.

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada em meio de cultura com 10 g/L de glicose, 5 g/L de NH_4Cl , 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/L de ágar (VERMA et al., 2001) e adicionado 1 g/L fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], em pH 6,8. Os isolados foram crescidos em meio levedura manitol (LM) e mantidos sob agitação constante a 120 rpm, a 28°C durante 7 dias. Foi realizada a inoculação em placas de petri pelo método da gota com 20 μL da suspensão bacteriana contendo cerca de 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) mL^{-1} , em triplicada por isolado bacteriano. As placas foram incubadas em estufa a 28°C durante sete dias. Após o período de incubação, os isolados capazes de solubilizar fosfato formaram um halo de solubilização transparente ao redor da colônia. Foram medidos os diâmetros dos halos e colônias de crescimento para a obtenção do índice de solubilização de fosfato (ISF) que é a razão do diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia. Como controle positivo, foi utilizado o isolado UFRGS-Vp16, como controle negativo o isolado UFRGS-Vp5.

4.2.3. Avaliação da promoção de crescimento em casa de vegetação

O experimento de promoção de crescimento em vasos foi realizado em casa de vegetação a fim de avaliar a capacidade dos isolados promoverem o crescimento de plantas de alface, beterraba, couve e salsa. As hortaliças foram cultivadas em vasos com areia e vermiculita (2:1) estéril, com variação nas doses de nitrogênio de acordo com a recomendação para cada cultura (recomendação: 150 Kg N.ha⁻¹ para alface e couve, 100 Kg N.ha⁻¹ para salsa e beterraba). Foi utilizada a dose usual de nitrogênio (100%N) e a metade da dose (50%N). As plantas foram inoculadas com 1 mL do caldo bacteriano contendo cerca de 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) mL^{-1} e foram feitas 4 repetições por tratamento e utilizada de solução nutritiva (SARRUGE, 1979). Aos 40 dias, as plantas foram retiradas dos vasos com raiz, lavadas e secas em estufa a 65°C por 72 horas, para pesagem e obtenção da massa seca. O teor de nitrogênio total na parte aérea foi determinado pela metodologia semi micro Kjeldhal e teor de fósforo total por colorimetria descrita

por Tedesco et al. (1995). Também foi calculada a eficiência relativa da inoculação dos rizóbios pelo método de Brockwell et al. (1966) modificado. Para determinação deste parâmetro, foram utilizados os valores obtidos na massa seca da parte aérea das plantas inoculadas com rizóbios e os valores dos tratamentos controles sem inoculação. Pelo quociente entre a diferença entre o tratamento inoculado (MSPA inoculação) e tratamento controle com 50% de nitrogênio (MSPA 50%N) e a diferença entre o tratamento controle com 100% de nitrogênio (MSPA 100%N) e tratamento controle com 50% de nitrogênio (MSPA 50%N). De acordo com a equação abaixo.

$$ER (\%) = \left(\frac{MSPA \text{ inoculação} - MSPA 50\%N}{MSPA 100\%N - MSPA 50\%N} \right) \times 100$$

Onde:

ER (%) = eficiência relativa;

MSPA inoculação = massa seca da parte aérea do tratamento inoculado;

MSPA 50%N = massa seca da parte aérea do controle sem inoculação com 50% de nitrogênio;

MSPA 100%N = massa seca da parte aérea do controle sem inoculação com 100% de nitrogênio;

4.2.4. Avaliação da promoção de crescimento de alface em canteiro

O experimento foi realizado a campo na área da Escola Estadual Nossa Senhora da Conceição, no Distrito de Três Vendas, Cachoeira do Sul/RS, com delineamento de blocos ao acaso, com três repetições. Não foi realizado nenhum tipo de adubação mineral, devido aos altos teores de fósforo e potássio no solo determinados após amostragem e análise de solo (Tabela 4.2). As mudas foram transplantadas com aproximadamente três folhas, a inoculação foi realizada no dia do transplante, com aplicação de 5 mL de caldo contendo os rizóbios por muda transplantada. No tratamento controle, sem inoculação, as mudas receberam caldo de crescimento esterilizado.

Aos 35 dias após o transplante, as plantas de alface foram retiradas com raiz do solo, lavadas e separadas a parte aérea e raiz e posteriormente foram secas em estufa a 65°C por 72 horas, para posterior pesagem e obtenção da massa seca.

Tabela 4.2. Análise das Características químicas da amostra solo (0-20 cm) da área dos canteiros.

pH	P -----mg/dm ³ ----	K -----mg/dm ³ ----	MO %	Al+H -----cmol _d /dm ³ -----	Al -----cmol _d /dm ³ -----	Ca -----cmol _d /dm ³ -----	Mg -----cmol _d /dm ³ -----	CTC %
5,7	15,3	88	2,3	3,9	0	4,9	2,0	11

4.2.5. Análise de dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e em caso de significância estatística, aplicou-se o teste de Scott-Knott para comparação das médias obtidas entre os diferentes tratamentos testados. Para tanto, foi utilizado o software Assistat versão 7.6 beta (SILVA, 2015).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento dos rizóbios

No experimento para avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento pelos rizóbios observou-se que todos os rizóbios estudados foram capazes de produzir AIA, como também solubilizar fosfato inorgânico em meio de cultura. Entretanto, em relação à produção de sideróforos, apenas os isolados UFRGS-Vp16 e UFRGS-Ls54 foram capazes de produzir sideróforo (Tabela 4.3). Estes dois isolados foram os únicos que apresentam os três mecanismos, avaliados, para a promoção de crescimento de plantas.

O isolado UFRGS-Vp16 foi o que mais solubilizou fosfato em meio de cultura com ISF>3. De acordo com Silva Filho & Vidor (2000) a capacidade das bactérias em solubilizar fosfato inorgânico pode ser classificada, como baixa (ISF<2), média (2<ISF<3) ou alta (ISF>3). Este isolado também é capaz de

auxiliar a planta na aquisição de Fe através da produção de sideróforos e também foi capaz de produzir de AIA em meio de cultura ($1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). Outro isolado que apresentou os três mecanismos de promoção de crescimento avaliados, foi o UFRGS-Ls54, com capacidade de solubilizar fosfato em meio de cultura ($\text{ISF} < 2$), também foi capaz de produzir sideróforos e AIA em meio de cultura ($24,9 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Esses resultados indicam que esses dois isolados podem ser promissores na promoção de crescimento de plantas olerícolas, auxiliando na aquisição de nutrientes. Garcia-Fraile et al. (2012) trabalhando com espécies olerícolas, como, tomate e pimenta, puderam observar que dos quatro mecanismos de promoção de crescimentos avaliados pelos rizóbios, como, a produção de AIA, solubilização de fosfato, sideróforos e ACC desaminase. Apenas a produção de AIA e sideróforos por rizóbios foi eficiente na promoção de crescimentos destas plantas.

Tabela 4.3. Mecanismos diretos de promoção de crescimento de planta, produção de AIA, solubilização de fosfato e produção de sideróforos por rizóbios.

Rizóbios	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Solubilização de fosfato (ISF)	Sideróforo
SEMIA 3007	56,16 a**	1,14 e**	-
UFRGS-Ps1	1,79 g	1,56 c	-
UFRGS-Ps8	7,24 e	1,14 e	-
UFRGS-Ps10	0,70 g	1,26 d	-
UFRGS-Ps11	11,11 d	1,32 d	-
UFRGS-Ps15	12,34 d	1,16 e	-
UFRGS-Vp16	1,60 g	3,5 a	+
UFRGS-Lc128	14,73 c	1,87 b	-
UFRGS-Lc348	7,86e	1,12 e	-
UFRGS-Lc336	1,94g	1,28 d	-
UFRGS-Lc156	9,06 f	1,07 e	-
UFRGS-Ls14	5,37 f	1,13 e	-
UFRGS-Ls54	24,95 b	1,16 e	+
UFRGS-Lu45	4,81 f	1,33 d	-
CV (%)	13,37	6,07	

**= médias (3 repetições) seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias Scott-Knott (1%). CV= coeficiente de variação

Há muitas evidências de que a produção de AIA por bactérias é um dos principais fatores envolvidos na promoção de crescimento de plantas comparada a produção de sideróforos, solubilização de fosfato e atividade da enzima ACC desaminase. Além do AIA bacteriano promover o crescimento de plantas por mecanismo direto, atuando no crescimento das nas raízes e com isso melhorando a absorção de nutrientes pelas plantas. O AIA também está envolvido no sucesso de invasão dentro da planta hospedeira, no qual requer que as bactérias sejam capazes de desencadear respostas de defesa nas plantas. Após o reconhecimento microbiano, um processo no qual polissacarídeos de superfície, inibidores da biossíntese de etileno e genes de virulência estão envolvidos (SOTO et al. 2006). Pode-se considerar que a produção de AIA é parte da estratégia usada pelas bactérias para contornar o sistema de defesa da planta (SPAEPEN et al., 2007).

4.3.2. Avaliação da promoção de crescimento em casa de vegetação

Com os resultados obtidos dos experimentos em casa de vegetação foi observada que a inoculação de rizóbios promoveu o crescimento de alface, couve, beterraba e salsinha quando comparadas a tratamento controle com metade da dose de nitrogênio. A inoculação do UFRGS-Ls 54 na beterraba (Figura 4.1) resultou em acréscimo na produção de massa seca da parte aérea das plantas inoculadas em relação ao controle não inoculado com metade da dose de nitrogênio recomendada para a cultura e não diferiu do controle com a dose de nitrogênio recomendada para o cultivo de beterraba. Mas a inoculação não teve efeito na produção de massa seca das raízes, porém esse resultado pode ter sido subestimado no momento de retirada e lavagem do material, pois são raízes muito finas e pode-se ter perdido material durante o processo. Pois essas plantas tiveram melhorada sua absorção de nutrientes, possivelmente pela capacidade de produzir AIA, o qual estimula a formação de raízes laterais, muito sensíveis, e como resultado melhorando a absorção de nutrientes elas plantas inoculadas.

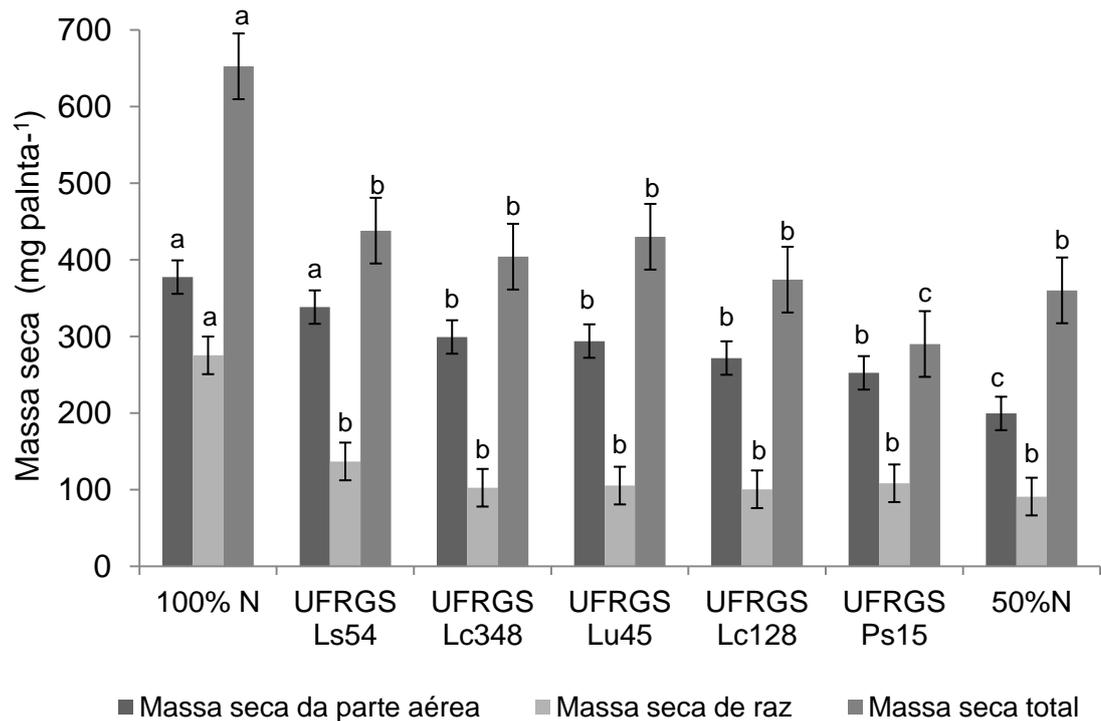


Figura 4.1. Massa seca de plantas de beterraba inoculadas com rizóbios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 1% de probabilidade de erro.

Esses resultados de promoção de crescimento na parte aérea de plantas de beterraba inoculadas com rizóbios estão de acordo com os resultados encontrados por Garcia-Fraile et al. (2012) e Flores-Felix et al. (2013) trabalhando com tomate e pimenta, alface e cenoura respectivamente. No qual puderam observar que inoculação dessas plantas com estirpes de rizóbios melhorou significativamente o crescimento das mesmas, como também aumento nos teores de nutrientes dessas plantas.

O isolado UFRGS-Ls54 também melhorou a absorção de nitrogênio e fósforo de plantas de beterraba inoculadas. Pois os teores de N e P não tiveram diferença significativa em relação ao controle com 100%N recomendado para cultivo de beterraba e foi superior ao controle não inoculado com 50%N. (Tabela 4.4). Stajkovic-Srbinovic et al. (2014), observaram que a inoculação de plantas de aveia com rizóbios melhorou a absorção de nutrientes das mesmas, pois teor de nitrogênio nos tratamento inoculado com rizóbio, não diferiu estatisticamente do tratamento controle com NPK, e foi superior em relação as outras bactérias diazotróficas utilizadas. Em relação aos teores de

fósforo, o tratamento inoculado com rizóbio foi o que apresentou maiores teores, superando todos a todos os tratamentos.

Tabela 4.4. Teores de nitrogênio e fósforo na parte aérea de plantas de beterraba inoculadas com rizóbios

Isolados	Teor de Nitrogênio (mg.kg ⁻¹)	Teor de Fósforo (mg.kg ⁻¹)
100%N	20,83 a	7,4 a
UFRGS Ls54	21,10 a	7,0 a
UFRGS Lc348	17,87 b	6,2 b
UFRGS Lu45	20,56 a	6,4 b
UFRGS Lc128	17,80 b	6,0 b
UFRGS Ps15	17,30 b	6,0 b
50%N	14,38 c	3,3 c
CV (%)	8,24	19,97

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro. CV= coeficiente de variação

Três dos isolados apresentaram eficiência relativa superior a 50% com destaque para o isolado de cornichão UFRGS-Ls54 com 78% de eficiência relativa em relação ao tratamento com 50%N (Figura 4.2). Um estudo recente em plantas de pimentão e tomate demonstrou a capacidade de uma estirpe de *Rhizobium leguminosarum*, aumentar os teores de N e P na parte aérea, a massa seca e a produção de frutos (GARCÍA-FRAILE et al., 2012).

Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados em alface, girassol, tomate e pimentão em que a inoculação com estirpes de *R. leguminosarum* levaram ao aumento na absorção de N e P pelas espécies hortícolas inoculadas (CHABOT et al., 1996; ALAMI et al., 2000; GARCÍA-FRAILE et al., 2012)

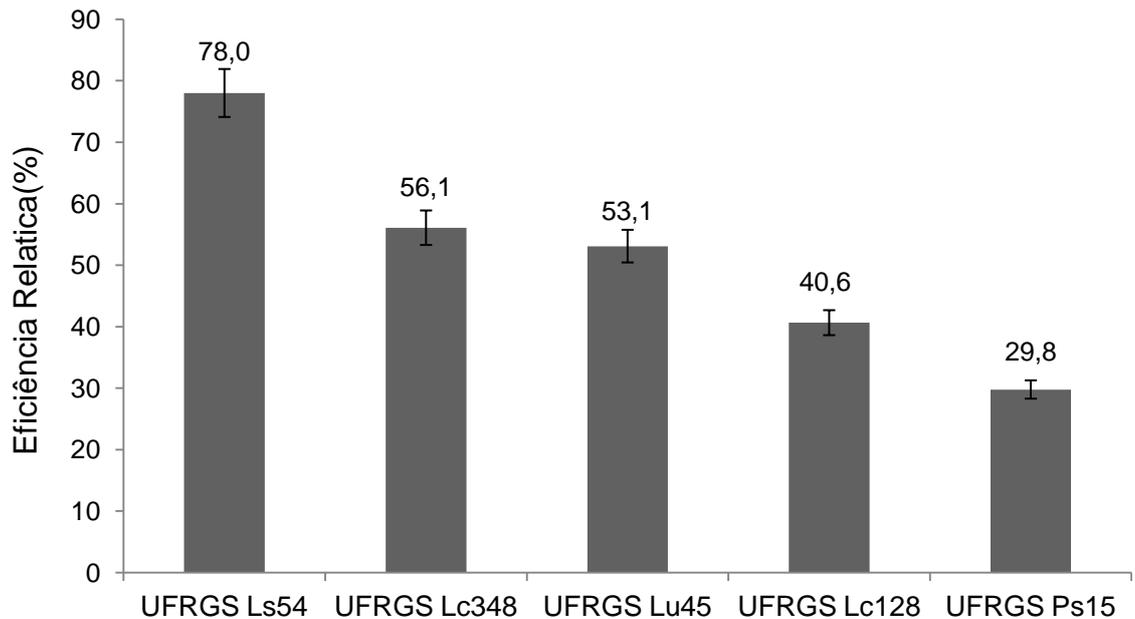


Figura 4.2. Índice de eficiência relativa (%) dos rizóbios quanto ao aumento de massa de plantas de beterraba. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro

Nas plantas de couve apenas o isolado de cornichão UFRGS-Ls14, e os isolados de ervilha UFRGS-Ps10, UFRGS-Ps8, tiveram um aumento de massa seca da parte aérea (Figura 4.3) em relação ao controle não inoculado com 50%N. Nenhum dos isolados inoculados apresentou produção de massa seca equivalente ao controle não inoculado com 100%N. Este efeito estimulatório, em relação ao controle com metade da dose recomendada de nitrogênio para o cultivo de couve, por parte dos isolados de ervilha (UFRGS-Ps10, UFRGS-Ps80) é bastante interessante, visto que, plantas de ervilha inoculada com estes isolados, poderiam ser plantas na horta em consórcio com plantas de ervilha inoculada com esses mesmos isolados. Pelos resultados obtidos nos mecanismos de promoção de crescimento avaliados, podemos inferir que as plantas de couve respondem melhor a baixas concentrações de AIA ($0,7 - 7,2 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Em relação à produção de massa seca das raízes (Figura 4.3) todos os isolados foram superiores ao controle não inoculado com 50%N. O estímulo a produção de raízes por plantas inoculadas com rizóbios, está relacionado à produção AIA ou ao bloqueio da síntese de etileno pela enzima ACC desaminase, que é capaz de hidrolisar o ACC (precursores imediato da

biossíntese de etileno nas plantas) em amônia e α -cetobutirato, que pode ser utilizada pela bactéria como uma fonte de nitrogênio e carbono. O etileno, é um regulador de crescimento, geralmente causa melhoria na iniciação e crescimento de raízes em baixos níveis, mas em níveis mais elevados podem levar à supressão no alongamento da raiz (SHAHAROONA et al., 2006).

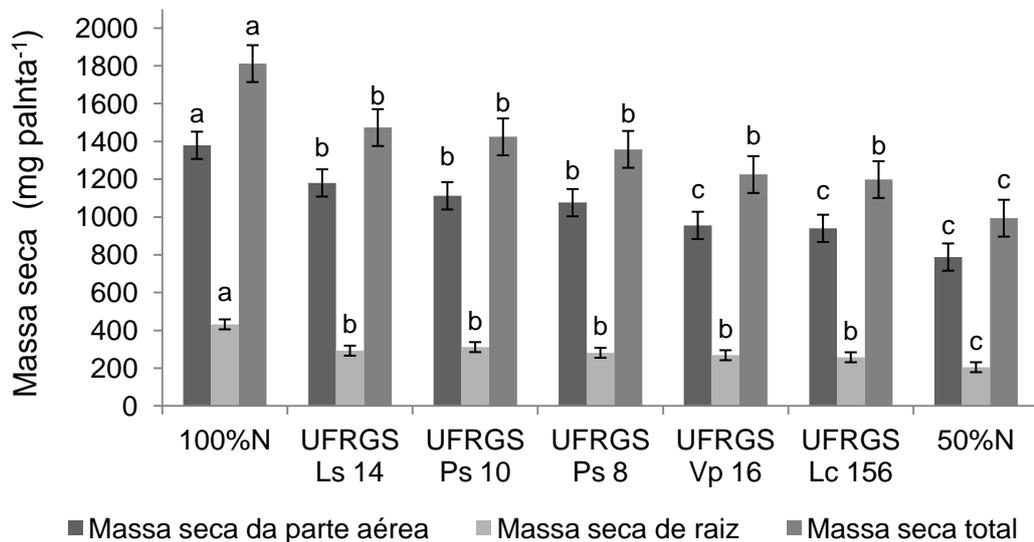


Figura 4.3. Massa seca de plantas de couve inoculadas com rizóbios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro

Quanto à absorção de nutrientes pelas plantas de couve inoculadas com rizóbios, podemos verificar diferença estatística apenas para o teor de nitrogênio, para os teores de fósforo não podemos observar diferença estatística (Tabela 4.5). Quanto à eficiência da inoculação (Figura 4.4) desses isolados em couve, apenas dois isolados foram superiores a 50% de eficiência relativa, foram eles, UFRGS-Ls 14 com 66% e UFRGS-Ps10 com 54%.

Tabela 4.5. Teores de nitrogênio e fósforo na parte aérea de plantas de couve inoculadas com rizóbios

Isolados	Teor de Nitrogênio (mg.kg ⁻¹)	Teor de Fósforo (mg.kg ⁻¹)
100%N	20,6 a*	2,2 ^{ns}
UFRGS Ls14	14,2 b	2,5
UFRGS Ps10	14,5 b	2,7
UFRGS Ps8	16,1 b	2,7
UFRGS Vp16	17,0 b	3,1
UFRGS Lc156	12,2 c	2,2
50%N	12,2 c	2,7
CV (%)	12,10	13,27

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro. CV= coeficiente de variação

Os efeitos da inoculação de BPCV em plantas de couve já foram comprovados quando inoculadas estirpes do gênero *Bacillus megaterium*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus subtilis*. As plantas apresentaram um aumento de peso fresco e seco, os teores de nutrientes foram significativamente afetados pelos tratamentos inoculados com estirpes de BPCV e as maiores concentração de N e P ocorreram com a inoculação de *B. megaterium*. Além disso, a inoculação com BPCV aumentou os teores de reguladores de crescimento, como, ácido giberélico, ácido salicílico e ácido indolacético (TURAN et al., 2014).

É importante a busca de estirpes de rizóbios, para serem utilizadas na promoção de crescimento de espécies olerícolas, pois esses micro-organismos já são amplamente utilizados em plantas leguminosas. Já que a maioria das pesquisas envolvendo bactérias promotoras de crescimento de plantas olerícolas, são principalmente para bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* (YILDIRIM et al., 2011; AHMAD et al., 2013; ASHWINI & SRIVIDYA et al., 2014; TURAN et al., 2014).

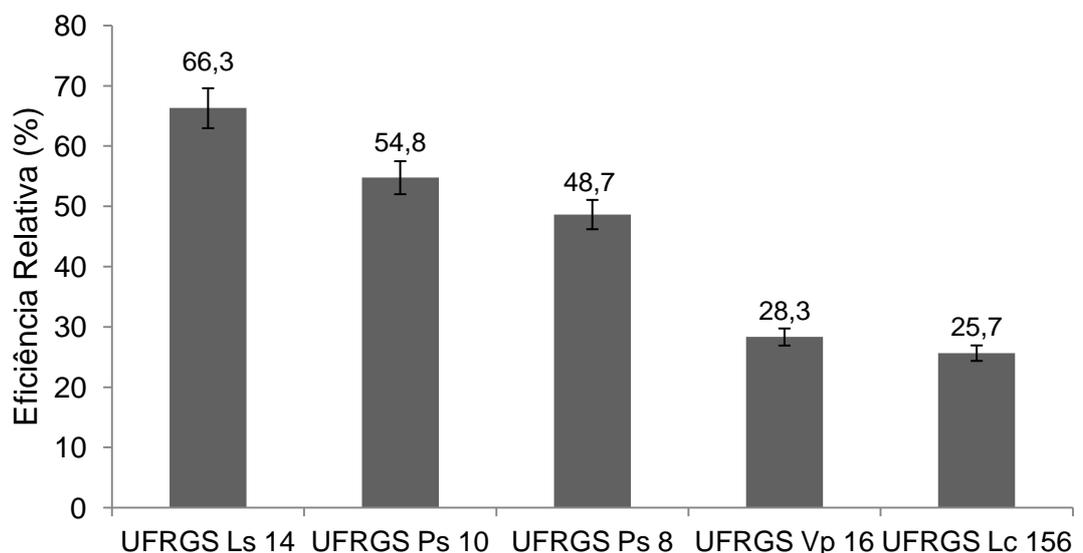


Figura 4.4. Índice de eficiência relativa (%) dos rizóbios quanto ao aumento de massa de plantas de couve. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.

Todos os isolados de rizóbios inoculados em plantas de salsa promoveram acréscimo na massa seca da parte aérea (Figura 4.5) dessas plantas. Com destaque para os isolados UFRGS-Ls14, UFRGS-Lu45 e UFRGS-Lc38 que não apresentaram diferença estatística em relação ao controle não inoculado com 100% N. Resultado semelhante pode ser observado quanto à produção de massa seca de raiz (Figura 4.5) de plantas de salsa no qual a inoculação com os isolados UFRGS-Ls14, UFRGS-Lu45, UFRGS-Lc348 e UFRGS-Lc128 foram superiores ao tratamento controle não inoculado com 50% N equivalente da dose recomendada de nitrogênio para o cultivo de salsa.

Nessa espécie olerícola todos os rizóbios inoculados foram eficientes (Figura 4.6), com ER superior a 50% para todos os isolados testados. Os isolados mais eficientes foram o UFRGS Ls-14 e o UFRGS-Lu45 com IER de 94 e 85% respectivamente. O efeito da inoculação de rizóbios na absorção de nutrientes (Tabela 4.6) em plantas de salsa foi semelhante ao observado em plantas de couve, onde pode ser observada diferença significativa apenas em relação à absorção de nitrogênio por essas plantas.

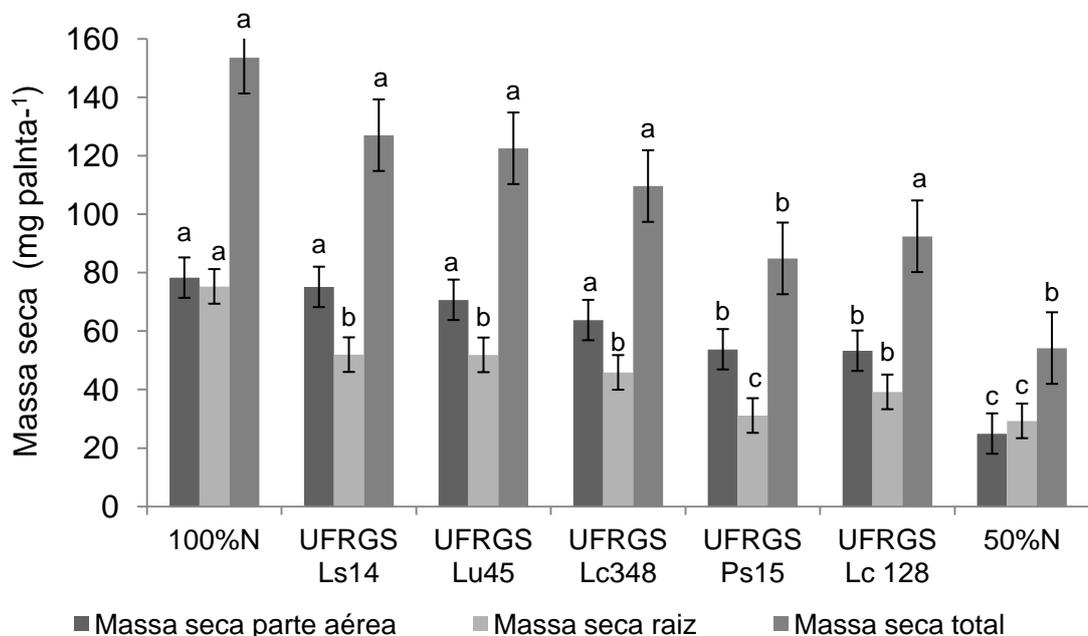


Figura 4.5. Massa seca de plantas de salsa inoculadas com rizóbios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.

Todos os isolados de rizóbios inoculados melhoraram a absorção de nitrogênio em relação ao tratamento como 50% de N, porém nenhum isolado superou o controle com 100%N. Para os teores de fósforo é possível observar diferença estatística entre os tratamentos inoculados e controles.

Os três isolados de rizóbios, inoculados na salsa, que responderam positivamente ao crescimento dessas plantas, apresentam dois mecanismos diretos de promoção de crescimento: produção de ácido indolacético e capacidade de solubilização de fosfato na forma de $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$ em meio de cultura. Essas bactérias produzem AIA numa faixa de concentração de aproximadamente $4\text{-}7 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $\text{ISF} < 2$. Considerando o fato que todos os tratamentos receberam fosfato de maneira assimilável pela planta, via solução nutritiva, pode-se observar que o efeito positivo no crescimento dessas plantas não é devido à capacidade dos rizóbios em solubilizar fosfato e provavelmente esse efeito esteja relacionado à capacidade desses isolados em produzir AIA em concentração que cause efeito positivo na planta ou por outros mecanismos não avaliados.

Schindwein et al. (2008), verificaram que a inoculação de estirpes de rizóbios que produziam entre $1,2$ a $3,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ aumentava significativamente o vigor de plântulas de alface. Enquanto a estirpe que produziu maior quantidade de AIA ($171,1 \mu\text{g.ml}^{-1}$) teve efeito negativo, provocando perdas no vigor das sementes e na formação de plântulas anormais.

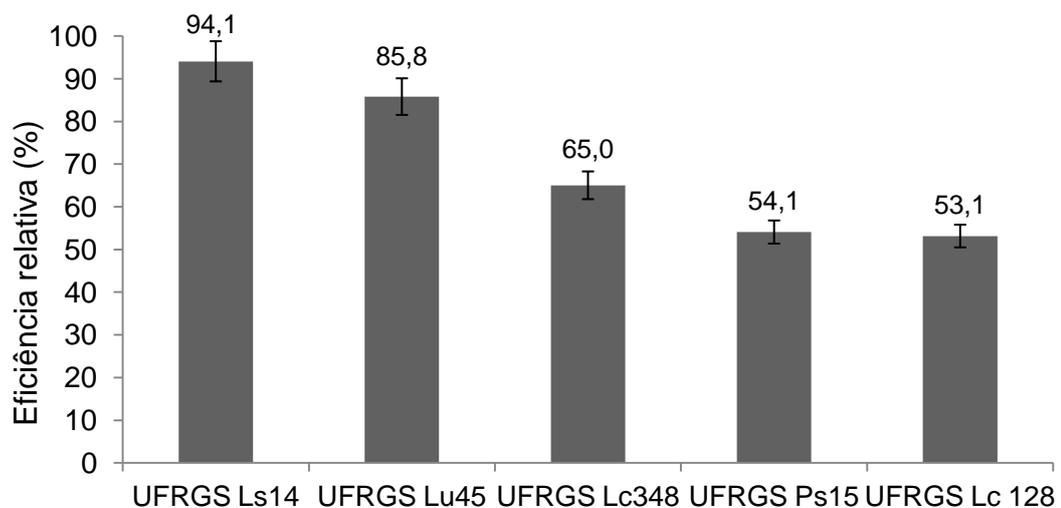


Figura 4.6. Índice de eficiência relativa (%) dos rizóbios quanto ao aumento de massa de plantas de salsa. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.

O efeito das auxinas no crescimento de desenvolvimento vegetal depende da concentração deste regulador de crescimento, assim como também da espécie vegetal. Baixas concentrações de AIA podem estimular o crescimento enquanto que concentrações muito altas podem ter um efeito inibitório na planta (GROSSMANN, 2003; SAHARAN & NEHRA, 2011). Estudos de plantas de arroz, quando inoculadas com bactérias produtoras de ácido indolacético, tiveram um aumento significativo no crescimento, entretanto dois isolados que produziram quantidade maiores de AIA ocasionou no desenvolvimento de plantas menores (KEYEO et al., 2011).

Tabela 4.6. Teores de nitrogênio e fósforo na parte aérea de plantas de salsa inoculadas com rizóbios.

Isolados	Teor de Nitrogênio (mg.kg ⁻¹)	Teor de Fósforo (mg.kg ⁻¹)
100%N	18,8 a	1,8 a
UFRGS Ls14	16,3 b	2,0 a
UFRGS Lu45	15,5 b	1,8 a
UFRGS Ps15	14,9 b	1,5 b
UFRGS Lc348	14,1 b	1,8 a
UFRGS Lc128	13,3 b	1,9 a
50%N	9,4 c	1,4 b
CV(%)	12,04	16,13

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro. CV= coeficiente de variação

A inoculação dos isolados UFRGS-Ps11, UFRGS-Lc336, UFRGS-348 e da estirpe SEMIA 3007 em plantas de alface, promoveu um aumento, de massa seca da parte aérea (Figura 4.7) em relação a plantas não inoculadas com 50%N e não apresentaram diferença estatística quando comparadas ao tratamento controle sem inoculação com 100% da dose de nitrogênio recomendada para o cultivo de alface. Esses isolados atuaram de maneira semelhante nas raízes dessas plantas (Figura 4.7), com exceção do isolado UFRGS Lc348, que não diferiu do tratamento controle sem inoculação com 50%N.

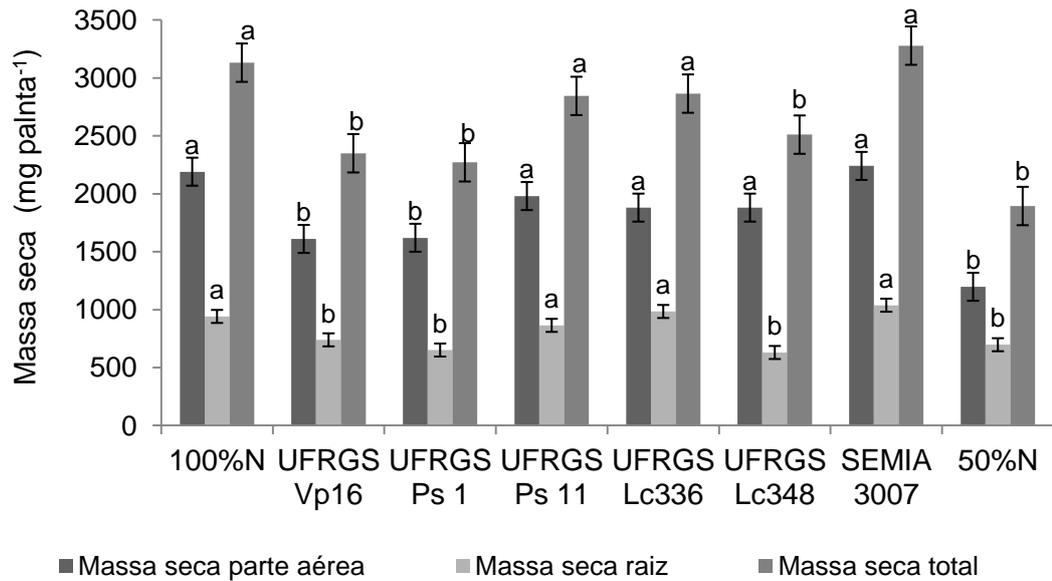


Figura 4.7. Massa seca de plantas de alface inoculadas com rizóbios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.

Alface foi a espécie olerícola que respondeu melhor a inoculação, como a estirpe SEMIA 3007, com ER de 105%, seguida do isolado UFRGS-Ps11 com 78% de ER, ambos isolados de nódulos de ervilhas (Figura 4.8). Resultado interessante, já que plantas de ervilha, assim como, alface, são plantas em canteiros, podendo então, ser realizado um consórcio, onde os rizóbios inoculados em ervilha (leguminosa) ficariam disponíveis no solo para o cultivo posterior de alface, beneficiando as plantas de ervilha e de alface.

A inoculação da estirpe SEMIA 3007 em alface promoveu uma melhoria na absorção de nitrogênio pelas plantas inoculadas, não diferindo do tratamento não inoculado com 100% de N. Assim como para as plantas de couve e salsa, a inoculação não teve diferença em relação aos teores de fósforo na parte aérea das plantas (Tabela 4.7).

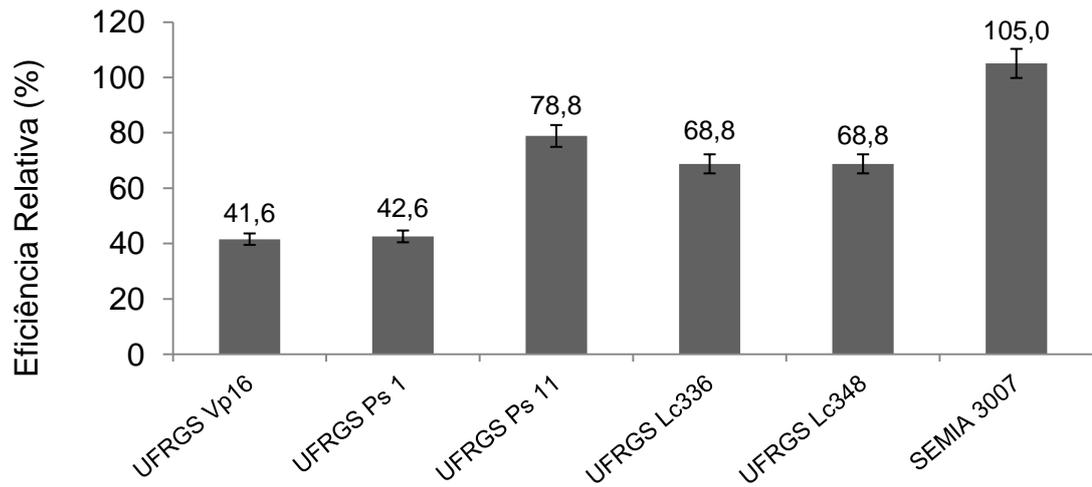


Figura 4.8. Índice de eficiência relativa (%) dos rizóbios quanto ao aumento de massa de plantas de alface. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.

Em estudos recentes, a inoculação *Rhizobium leguminosarum* com capacidade de solubilizar fosfato, produzir sideróforos e ácido indolacético foi capaz de promover o crescimento de plantas de alface e aumentou os teores de macronutrientes como N e P nas suas folhas (FLORES-FÉLIX et al. 2013).

É importante a busca e seleção por estirpes de micro-organismos capazes de promover o crescimento de plantas. Mas para entender melhor o que leva esses micro-organismos a promover o crescimento vegetal, são necessários mais estudos envolvendo outros mecanismos, como produção de ACC, citocininas, giberelinas, citocinicas entre outros. Pois as causas do crescimento em plantas não-leguminosas por rizóbios até o momento não são bem elucidadas.

Tabela 4.7. Teores de nitrogênio e fósforo na parte aérea de plantas de alface inoculadas com rizóbios.

Isolados	Teor de Nitrogênio (mg.kg ⁻¹)	Teor de Fósforo (mg.kg ⁻¹)
100%N	2,9 a*	1,7 ^{ns}
UFRGS Vp16	2,2 b	1,4
UFRGS Ps1	2,3 b	1,4
UFRGS Ps11	2,9 b	1,5
UFRGS Lc336	2,4 b	1,5
UFRGS Lc348	2,8 b	1,3
SEMIA 3007	3,1 a	1,3
50%N	2,3 b	1,2
CV (%)	8,7	15,83

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro. CV= coeficiente de variação

Apesar das BPCVs apresentarem diferentes mecanismos para promover o crescimento vegetal, sua utilização tem sido um pouco limitada devido às inconsistências no seu desempenho, e sua comercialização tem sido limitada a alguns países desenvolvidos. Em muitos casos, estas bactérias quando inoculadas a campo não apresentam os efeitos desejados. Isso pode ser devido às características do solo, que têm sido frequentemente associadas à ausência de resposta à inoculação (DOBBELAERE et al., 2002). Como também pela influência dos diversos fatores ambientais, como temperatura, umidade e competição com micro-organismos do solo. Além da colonização, que é um passo importante e necessário para que a inoculação apresente efeitos benéficos na planta (LUGTENBERG et al., 2001).

4.3.3. Avaliação da promoção de crescimento em canteiro

Os resultados da inoculação em canteiro foram semelhantes aos encontrados em casa de vegetação. Com destaque para a estirpe, SEMIA 3007 (Figura 4.9), recomendada para inoculação de ervilha no Brasil, a qual pertence à espécie *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. A inoculação de alface com esta estirpe acarretou um aumento significativo de 76% na massa seca dessas plantas, promovendo o crescimento de plantas de alface.

Estes resultados podem estar relacionados à produção de ácido indolacético por esta estirpe, que produziu em torno de $56 \mu\text{g mL}^{-1}$ em meio de cultura, sugerindo que plantas de alface, respondem melhor a maiores concentrações de AIA, que tem como um dos principais efeitos, o aumento de raízes secundárias que irá resultar num melhor aproveitamento dos nutrientes presentes no solo (BISWAS et al., 2000).

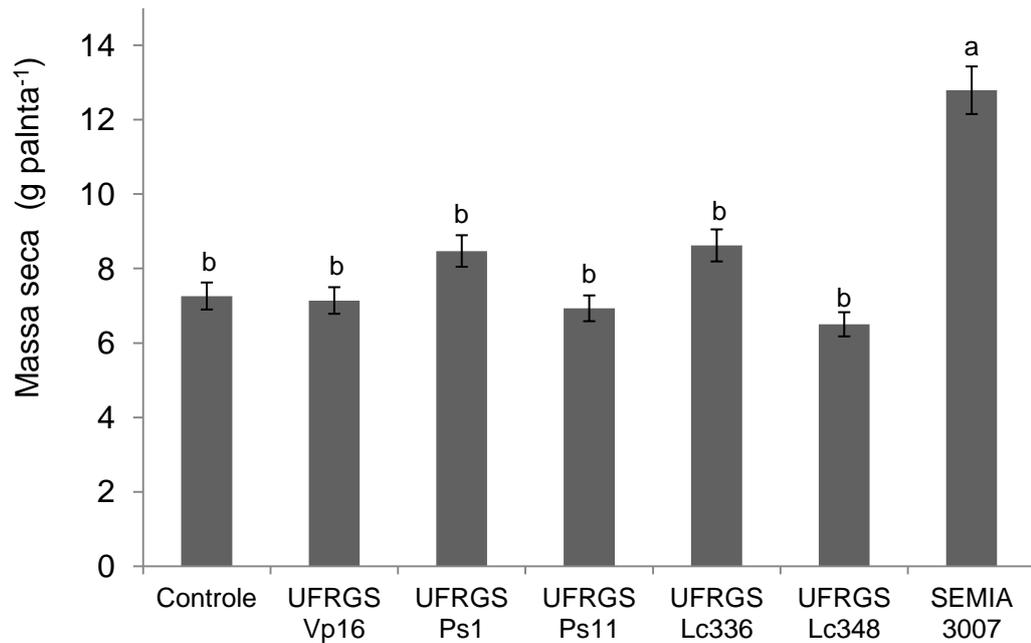


Figura 4.9. Massa seca de plantas de alface inoculadas com rizóbios em canteiros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott 5% de probabilidade de erro.

Esta estirpe tem potencial na promoção de crescimento de plantas de alface, devido sua capacidade de produzir AIA, solubilizar fosfato, aumentar a germinação de sementes, promover o aumento de massa seca tanto em casa de vegetação como a campo, onde é preciso competir com outras espécies presentes na rizosfera e por melhorar o uso de fertilizantes, como o nitrogênio.

Além de ser uma estirpe simbiote em ervilha, na qual poderá beneficiar as plantas de alface, quando realizado um consórcio com esta leguminosa, que irão se beneficiar pelos rizóbios deixados no solo após o cultivo de ervilha. Yanni & Dazzo (2010) trabalhando com rizóbios simbiotes de trevo (*Trifolium alexandrinum*,) quando em rotação com arroz puderam observar a capacidade desses rizóbios em colonizar plantas de arroz e promover o crescimento das mesmas. Beneficiando as duas culturas, fixando nitrogênio na leguminosa e promovendo o crescimento por diversos mecanismos na gramínea.

A busca por rizobactérias que possam vir a ser utilizadas como inoculantes, principalmente em hortaliças, deve ser segura para os seres humanos, pois os compostos químicos utilizados nos fertilizantes minerais não devem ser substituídos por inoculantes à base de micro-organismos

potencialmente nocivos a saúde (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ, 2006; GARCIA-FRAILE, 2012).

4.4. CONCLUSÕES

Todos os isolados de rizóbios utilizados nesse estudo são capazes de produzir ácido indolacético e solubilizar fosfato em meio de cultura;

Em plantas de alface a inoculação com a estirpe SEMIA 3007 é a que apresenta melhor desempenho tanto em casa de vegetação como em canteiros;

As plantas de beterraba respondem melhor a inoculação do isolado de rizóbio UFRGS-Ls54, o qual apresenta os três mecanismos de promoção de crescimento, indicando ser um bom candidato a ser utilizado como promotor de crescimento de beterraba;

Os isolados UFRGS-Ls14, UFRGS-Ps10 e UFRGS-Ps8 promovem crescimento em plantas de couve;

Para plantas de salsa todos os isolados inoculados são capazes de promover o crescimento das plantas, indicando que a interação micro-organismo planta em salsa é menos específica em relação às demais plantas.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEMAD M., KIBRET M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J. King. Saud. Univ. Sci.*, v. 26, p.1–20, 2014

AHMAD E., et al., ACC deaminase producing *Pseudomonas putida* strain PSE3 and *Rhizobium leguminosarum* strain RP2 in synergism improves growth, nodulation and yield of pea grown in Alluvial soils. *Symbiosis*, v.61, p. 93–104, 2013.

ALAMI Y. et al. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl Environ Microbiol*, v. 66, p. 3393–3398, 2000.

ASHWINI N. & SRIVIDYA S. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech*, v. 4, p. 127–136, 2014.

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

BISWAS, J. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v.92, n.5, p.880-886, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária **Instrução Normativa** N° 13, De 24 De Março de 2011.

BROCKWELL, J. et al. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, v.6, p.365-370, 1966.

CHABOT R. et al. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, p. 2767–2772, 1996.

DOBBELAERE, S. et al. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, p.284-297, 2002.

DODD,I.C. et al. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Ann. Appl. Biol**, v.157, p. 361-379, 2010.

FLORES-FELIX J.D., et al. Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. **J Plant Nutr Soil Sci** v.176, p. 876–882, 2013.

GAIERO J.R. et al.,. Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. **Am J Bot.**, v.100, p.1738–1750, 2013

GARCÍA-FRAILE P. et al. Rhizobium Promotes Non-Legumes Growth and Quality in Several Production Steps: Towards a Biofertilization of Edible Raw Vegetables Healthy for Humans. **Plos One**, v.7, p.1-7,2012

GROSSMANN K. Mediation of herbicide effects by hormone interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**,v. 22, p.109-122, 2003.

GORDON, S. A.& WEBER, P. R. Colorimetric estimation of indolacetic acid. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 26, p. 192-195, 1951.

GLICK, B.R., Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation, **Scientifica**, v.2012, p.1-15, 2012

HAHN, L. et al. Growth promotion in maize with diazotrophic bacteria in succession with ryegrass and white clover. **American and Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**, v.14. n.1, p.11-16, 2014.

KEYEO, et al. The effects of nitrogen fixation activity and phytohormone production of diazotroph in promoting growth of rice seedlings. **Biotechnology**, v.10, p. 267-273, 2011.

LUGTENBERG, B.J.J. et al. Molecular determinants of rhizosphere colonization by Pseudomonads, **Annual Review of Phytopathology**, v39, p.461-490, 2001.

LUGTENBERG, B. & KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 63, p. 541–556, 2009.

MIRANSARI, M. & SMITH, D.L. Rhizobial lipo-chitooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hoedum vulgare* L.) seed germination. **Biotechnol**, v.8, 270–275, 2009.

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

ROSENBLUETH M. & MARTÍNEZROMERO E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Mol Plant Microbe Interact**. V.19, p. 827-837, 2006.

SHAHAROONA B. et al. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Lett Appl Microbiol**, v. 42, p.155– 159, 2006.

SAHARAN, B.S.& NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v.2011, LSMR-21, 2011.

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

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

SCHWYN, B.& NEILAND, J.B. Universal chemical assay for the detection of siderophores. **Anal Biochem**. v. 160, p. 47–56, 1987.

SILVA FILHO, G. N. & VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 311-329, 2000.

SILVA, F. Assistat versão 7.6 beta. Programa de análise estatística. Disponível em: <http://www.assistat.com/> 2015

SOTO M.J. et al. Rhizobia and plant-pathogenic bactéria: common infection weapons. **Microbiology**, v.152, p. 3156-3179, 2006.

SPAEPEN, J. et al. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling, **FEMS Microbiol. Rev.** V.3, p.1425–448, 2007.

STAJKOVIC-SRBINOVIC, O. et al. J. Growth and nutrient uptake in oat and barley plants as affected by rhizobacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 19, n. 3, p. 9429-9436, 2014.

TEDESCO M. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2^a ed. Porto Alegre: UFRGS, 174p, 995.

TURAN M. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 38, p. 327-333, 2014.

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

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

YANNI Y.G. et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Plant Physiol**, v.28, p. 845–870, 2001

YANNI Y.G. & DAZZO F.B. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile Delta. **Plant and Soil**, v. 336, p. 129-142, 2010.

YILDIRIM E. et al. Growth nutrient uptake, and yield promotion of broccoli by plant growth promoting rhizobacteria with manure. **Hortic. Sci.**, v. 46, p. 932–936, 2011.

5. CAPÍTULO IV. COLONIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE RIZÓBIOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM PLANTAS OLERÍCOLAS

Resumo: Entre as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas no qual se inclui os rizóbios, observa-se a capacidade de estimular o crescimento vegetal por diversos mecanismos diretos e indiretos. Este estudo teve como objetivo identificar geneticamente os rizóbios e avaliar a capacidade dos mesmos de colonizar plantas de alface, beterraba, couve e salsa. Para identificação, o DNA foi extraído utilizando wizard kit (Promega). Para amplificação do 16S rRNA, pela técnica de PCR foram utilizados os primers F27 e R530. Os fragmentos foram sequenciados e todas as sequencias obtidas foram comparadas com as sequencias de DNA existentes na base de dados NCBI-BLAST. As hortaliças foram inoculadas com rizóbios e mantidas em condições axênicas. Posteriormente foram maceradas e a suspensão obtida foi inoculada na leguminosa das quais os rizóbios foram isolados a fim de avaliar a colonização, pela produção de nódulos nas leguminosas, demonstrando a presença dos rizóbios e nas hortaliças. Foram identificadas as espécies *Burkholderia lata*, *Mesorhizobium erdmanii*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium jarvisii*, *Bradyrhizobium sp.* e *Rhizobium leguminosarum*. O UFRGS-Lc336 não foi capaz de colonizar plantas de alface. UFRGS-Ps8 foi capaz de colonizar plantas de couve. Os isolados UFRGS-Lc348 e UFRGS-Lc128 foram capazes de colonizar plantas de beterraba. Com relação às plantas de salsa os isolados UFRGS-Ls14 e UFRGS-Lc128 foram capazes de colonizar a parte aérea e as raízes e o isolado UFRGS-Lu45 foi capaz de colonizar apenas as raízes das plantas. Os rizóbios podem atuar como endofíticos em espécies olerícolas, podendo entrar fissões nas raízes como também por pêlos secundários das raízes.

Palavras-chave: colonização, rizóbio, endofítico, hortaliça

5.1. INTRODUÇÃO

Entre as bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCVs), na qual se incluem os rizóbios, essas são capazes estimular o crescimento das plantas através de mecanismos como, mobilização de nutrientes no solo, produção de diversas substâncias reguladoras de crescimento vegetal, protegendo a planta contra ataques de patógenos, melhorando a estrutura do solo, como também degradando compostos poluentes (BRAUD et al., 2009; HAYAT et al., 2010; RAJKUMAR et al., 2010; AHEMAD, 2012). O grupo de bactérias que vivem dentro ou ao redor das raízes está mais envolvido nos processos de transformação, mobilização e solubilização de nutrientes em comparação as que vivem livres no solo (HAYAT et al., 2010; AHEMAD & KIBRET, 2014).

Porém, é importante que a bactéria tenha capacidade de colonizar as raízes e/ou os tecidos das plantas. Os passos fundamentais para que ocorra a colonização bacteriana na planta é a ligação através de adesinas (proteínas de adesão estirpe específica), penetração, como o rompimento de barreiras do hospedeiro. Para isso é necessário uma forte interação de fatores bióticos e abióticos (WILSON et al., 2002). Quando as bactérias se aproximam da planta no solo, elas são atraídas pelos exsudatos das raízes (BACILIO-JIMÉNEZ et al. 2003; HUANG et al. 2014). A ligação e colonização da parte aérea das plantas também podem ocorrer após mecanismos de dispersão, tais como chuva, fluxo de ar e vetores biológicos (BOCK et al. 2012). A penetração é geralmente nos locais de emergência das raízes secundárias (HALLMANN et al., 1997) ou em regiões feridas da epiderme, e requer a ativação de um grupo de genes utilizados pelo micro-organismo para evitar o sistema imunológico do hospedeiro, para que possa avançar em direção para dentro da planta (INIGUEZ et al., 2005). Para se estabelecer nas plantas, as bactérias podem formar micro-colônias, agregados ou biofilmes, que facilitam a sua sobrevivência na planta (COOMBS & FRANCO 2003; GERMAIN et al. 2006).

Se comparados os micro-organismos colonizadores da rizosfera, com os endofíticos, estes podem apresentar um benefício adicional na promoção de crescimento. Isto porque a planta fornece abrigo e nutrientes, e as bactérias

podem se desenvolver em condições menos competitivas. Um dos fatores que podem influenciar a colonização e o desenvolvimento de bactérias endofíticas é o genótipo da planta hospedeira (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; ROSENBLUETH & MARTINEZ-ROMERO; 2006; MENDES et al., 2007)

Diferentes espécies de rizóbios são bem conhecidas como promotoras do crescimento de plantas em simbiose com plantas leguminosas, pela sua capacidade de capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (PEIX et al., 2015), entretanto em trabalhos atuais eles também têm sido relatados como promotores de crescimento e colonizadores de raiz em hortaliças, tais como pimentão (*Capsicum annuum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), alface (*Lactuca sativa*) e cenoura (*Daucus carota*) (GARCÍA-FRAILE et al 2012; FLORES-FÉLIX et al 2013). Este estudo tem como objetivo identificar geneticamente os rizóbios estudados e avaliar a capacidade dos rizóbios de colonizar plantas de alface, beterraba, couve e salsa.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Rizóbios estudados

Foram estudados os rizóbios UFRGS-Vp 16 (isolado de trevo branco), UFRGS-Lc 348, UFRGS-Lc 336, UFRGS-Lc 128 UFRGS-Lc 156, UFRGS-Ls 14, UFRGS-Ls 54, UFRGS-Lu45 (isolados de cornichão), e UFRGS-Ps1, UFRGS-Ps8, UFRGS-Ps10, UFRGS-Ps11, UFRGS-Ps15 (isolados de ervilha), os quais foram mantidos sob refrigeração na Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS. Além desses rizóbios, também foi estudada a estirpe SEMIA 3007, liberada para produção de inoculantes para ervilha, fornecida pela Coleção de Culturas do Rizóbios da Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO).

5.2.2. Caracterização genotípica dos isolados

5.2.2.1. Extração de DNA e amplificação da região do gene 16S rRNA

O DNA genômico foi extraído utilizando o wizard kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Para a amplificação da sequência

conservada do gene 16S rRNA, a partir do DNA genômico dos isolados, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores FC27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R530 (5'-CCGCGGCTGC TGGCACGTA-3'), descritos por Gotang et al. (2007). A reação da PCR foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 1X de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia), 1,5 mM de MgCl₂ (Ludwig Biotecnologia), 200µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 1U de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia), 100 ng de DNA e água ultra pura estéril para completar o volume da reação (MiliQPlus, Milipore®).

A reação foi incubada em termociclador “Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler” nas seguintes reações: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®) e visualizados sob luz ultravioleta.

Os fragmentos de DNA de aproximadamente 500 pb foram sequenciados utilizando o equipamento automático ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Todas as sequencias nucleotídicas obtidas foram analisadas utilizando o software Chromas e comparadas com as sequencias de DNA existentes na base de dados do “National Center for Biotechnology Information – Basic Local Alignment Search Tool” (NCBI-BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5.2.3. Avaliação da colonização endofítica de rizóbios em plantas olerícolas

Para esse estudo, as plantas de alface, beterraba, couve e salsa foram cultivadas em tubos de ensaio, com 25 cm de comprimento e 2,4 cm de diâmetro, contendo 20 mL de solução nutritiva (SARRUGE, 1975) com 7,5 % de ágar. Os tubos foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos a 121° C. As sementes foram desinfestadas com álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 2,5% por 1 minuto, seguida de sete lavagens com água

destilada estéril. Estas sementes foram pré-germinadas em papel toalha estéril umedecido com água destilada estéril e posteriormente colocadas em estufa durante dois dias a 28°C, posteriormente as sementes foram transplantadas para os tubos de ensaio. Os rizóbios foram cultivados em frascos contendo meio levedura-manitol (LM), e incubados durante sete dias a 28°C, sob agitação de 120 rpm para obtenção do inóculo bacteriano. Posteriormente, foram inoculados 500 µL do caldo com 10⁸ cel/mL em cada tubo de ensaio contendo as plantas em crescimento. Os tubos foram mantidos em lampadário com fotoperíodo com 12 horas de luz diária durante 30 dias.

As sementes das leguminosas, ervilha (*Pisum sativum*), cornichão (*Lotus corniculatus*, *Lotus subbiflorus*, *Lotus uliginosus*), trevo-branco (*Trifolium repens*) foram desinfestadas com álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 2,5% por 1 minuto, seguida de sete lavagens com água destilada estéril. As sementes foram pré-germinadas em papel toalha estéril umedecido durante dois dias a 28°C, posteriormente as sementes foram transplantadas para os copos com areia e vermiculita (2:1) em casa de vegetação. Após o período de 30 dias das hortaliças em lampadário, as plantas foram assepticamente retiradas dos tubos de ensaio, separando-se as raízes e a parte aérea, as quais foram desinfestadas e, posteriormente, foram maceradas separadamente em 10 mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril com auxílio de um almofariz e pistilo de porcelana estéril. Uma alíquota de 1 mL da suspensão do macerado foi inoculada nas leguminosas de onde os rizóbios foram inicialmente isolados (Figura 5.1). Após 40 dias de cultivo as plantas foram retiradas dos copos e lavadas a fim de se observar a presença de nódulos radiculares, causados pelos rizóbios presentes endofiticamente no tecido das hortaliças.



Figura 5.1. Plantas cultivadas em lampadário (A), macerado das raízes de parte aérea das plantas cultivadas em lampadário (B), plantas inoculadas com a suspensão do macerado em casa de vegetação (C).

5.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para o estudo de MEV das raízes das hortaliças, as sementes foram desinfestadas com álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 2,5% por 1 minuto, seguida de sete lavagens com água destilada estéril. Posteriormente as sementes foram inoculadas e colocadas em tubos de ensaio contendo 20 mL de solução nutritiva estéril (SARRUGE, 1975). Em seguida, os tubos foram mantidos a 28° C durante 48 h no escuro (para promover a germinação das sementes) e em seguida colocadas em fotoperíodo de 12 horas de luz diária durante 20 dias. As raízes de plantas crescidas foram cortadas, lavadas em água destilada estéril e fixadas em glutaraldeído a 25% em tampão fosfato 0,2 M e água destilada (pH 7,0). Após a fixação o material foi lavado em tampão fosfato, para retirada do excesso do fixador. A desidratação dos tecidos foi realizada de maneira lenta e gradual, como desidratante, foi utilizada acetona, 30%, 50%, 70%, 90% até 100%, seguido por dessecação por ponto crítico. Em seguida, as amostras foram montadas nos stubs e metalizadas com ouro. As amostras foram visualizadas o equipamento JEOL JSM 6060.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o sequenciamento, o DNA dos isolados foi comparado com as sequencias de DNA existentes na base de dados do “National Center for Biotechnology Information – Basic Local Aligment Search Tool” (NCBI-BLAST).

Pelo alinhamento das sequencias obtidas pode-se identificar os isolados em diferentes espécies de rizóbios (Tabela 5.1). Não foram obtidas seqüências ainda não cadastradas no “GenBank” e a taxa de similaridade das seqüências dos isolados variou entre 89 a 100 % em relação às do banco de dados do NCBI-BLAST. Os resultados indicaram que os rizóbios UFRGS-Ps1, UFRGS-Ps8, UFRGS-Ps10, UFRGS-Ps11, UFRGS-Ps15 e UFRGS-Ls54 pertencem a espécie *Rhizobium leguminosarum*.

Tabela 5.1. Identificação dos isolados de rizóbios pela sequência parcial dos genes 16S rRNA obtida com o programa BLAST

Isolados	Verossimilhança ⁽¹⁾	Identidade (%) ⁽²⁾	Fragmento ⁽³⁾	GenBank ⁽⁴⁾
UFRGS-Vp 16	<i>Burkholderia lata</i>	98	371 pb	NR102890.1
UFRGS-Lc128	<i>Mesorhizobium erdmanii</i>	100	391 pb	NR135857.1
UFRGS-Lc156	<i>Mesorhizobium hawassense</i>	99	388 pb	NR108624.1
UFRGS-Lc336	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	95	390 pb	JN392462.1
UFRGS-Lc348	<i>Mesorhizobium jarvisii</i>	98	389 pb	NR135858.1
UFRGS-Ls14	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	97	364 pb	NR074315.1
UFRGS-Ls54	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	96	393 pb	NR103919.1
UFRGS-Lu45	<i>Mesorhizobium erdmanii</i>	99	390 pb	NR135857.1
UFRGS-Ps1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	96	400 pb	NR103919.1
UFRGS-Ps8	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	96	391 pb	NR103919.1
UFRGS-Ps10	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	96	383 pb	NR103919.1
UFRGS-Ps11	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	99	396 pb	NR103919.1
UFRGS-Ps15	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	89	396 pb	NR103919.1

(1) Verossimilhança: organismo que possui a sequência com a qual a sequência parcial do gene 16S rRNA do rizóbio estudado que apresentou maior homologia. (2) Identidade: porcentagem de identidade entre a sequência dos isolados estudados e o organismo relacionado. (3) Fragmento: tamanho do fragmento, tamanho da sequência consenso. (4) GenBank, número de acesso da sequência do organismo relacionado.

Garcia-Fraile et al. (2012) e Flores-Félix et al. (2013) puderam observar a eficiência dessa espécie na promoção de crescimento de hortaliças. O isolado UFRGS-Vp16 pertence a espécie *Burkholderia lata*, essa espécie foi descrita por Vanlaere et al. (2009) como fazendo parte do taxon K, dentro do complexo de *Burkholderia cepacia* essa espécie pode ser encontrada em humanos, animais e amostras, como no solo. Silva et al. (2012) trabalhando com diferentes espécies de *Burkholderia* de solo de diferentes regiões da Amazônia, identificou essa espécie com potencial para promoção de crescimento de plantas, pela capacidade de fixar nitrogênio, solubilizar fosfato

de cálcio, porém com cautela, devido a ocorrência de espécies de *Burkholderia* como patógenos oportunistas.

Os isolados UFRGS-Lc128 e UFRGS-Lu45 foram identificados com *Mesorhizobium erdmanii* e o UFRGS-Lc348 foi identificado como *Mesorhizobium jarvisii*, essas duas espécies foram descritas recentemente por Martínez-Hidalgo et al. (2015) que reclassificou estirpes de *Mesorhizobium loti*, com o surgimento dessas duas novas espécies, no Brasil até o momento não existem relatos dessas duas espécies. Frizzo (2007) isolou esses rizóbios de *L. corniculatus* e *L. uliginosus*, porém até o momento não tinha sido feita identificação genética desses rizóbios. O isolado UFRGS-Lc156 foi identificado como *Mesorhizobium hawassense*, esta espécie foi identificada recentemente por Degefu et al. (2013) através de análise de sequências multilocus (MLSA) de isolados de nódulos de sesbania (*Sesbania sesban*).

Os resultados quanto à capacidade de colonização dos rizóbios em plantas olerícolas são apresentados na tabela 5.2. Observa-se que os rizóbios estudados foram capazes de colonizar tanto a raiz quanto a parte aérea das plantas de alface, beterraba, couve. Nas plantas de alface o isolado UFRGS-Lc336 não foi capaz de colonizar a parte aérea e as raízes da planta. Diferentemente do observado nas plantas de alface, em plantas de couve observou-se que o isolado UFRGS-Ps8 foi capaz de colonizá-las. Já nas plantas de beterraba, os rizóbios UFRGS-Lc348 e UFRGS-Lc128 colonizaram a parte aérea e as raízes dessas plantas. Com relação às plantas de salsa os rizóbios UFRGS-Ls14 e UFRGS-Lc128 foram capazes de colonizar a parte aérea e as raízes e o isolado UFRGS-Lu45 foi capaz de colonizar apenas as raízes das plantas.

Esses resultados foram obtidos seguindo-se os princípios do postulado de Koch. As hortaliças inoculadas com rizóbios foram cultivadas em condições axênicas, maceradas e a suspensão obtida foi inoculada na leguminosa hospedeira de onde o rizóbio estudado havia sido isolado visando-se a confirmação da presença do rizóbio pela formação de nódulos radiculares (Figura 5.2).

Tabela 5.2 Capacidade de nodulação em plantas leguminosas a partir da inoculação da suspensão do macerado de hortaliças inoculadas com rizóbios. A presença de nodulação na leguminosa de origem foi considerada como confirmação da colonização na hortaliça.

Hortaliças	Isolados	Colonização	
		Parte aérea	Raiz
Alface	UFRGS-Vp16	+	+
	UFRGS-Ps1	+	+
	UFRGS-Ps11	+	+
	UFRGS-Lc336	-	-
	UFRGS-Lc348	+	+
	SEMIA 3007	+	+
	Controle	-	-
Couve	UFRGS-Ls14	-	-
	UFRGS-Ps10	-	-
	UFRGS-Ps8	+	+
	UFRGS-Vp16	-	-
	UFRGS-Lc156	-	-
	Controle	-	-
Beterraba	UFRGS-Ls54	-	-
	UFRGS-Lc348	+	+
	UFRGS-Lu45	-	-
	UFRGS-Lc128	+	+
	UFRGS-Ps15	-	-
	Controle	-	-
Salsa	UFRGS-Ls14	+	+
	UFRGS-Lu45	-	+
	UFRGS-Lc348	-	-
	UFRGS-Ps15	-	-
	UFRGS-Lc128	+	+
	Controle	-	-

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode ser utilizada para detecção de endofíticos em diversas plantas (YANNI et al., 1997; GUERRERO-MOLINA et al., 2012). A MEV revelou que as raízes de plantas inoculadas foram colonizadas com sucesso pelos isolados bacterianos (Figura 5.3).

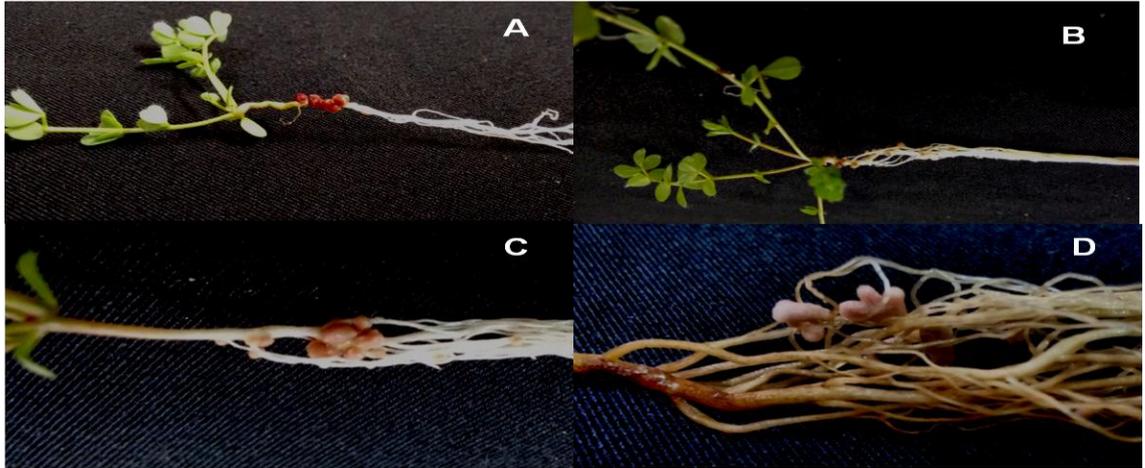


Figura 5.2. Formação de nódulos em plantas de *L. subflorus* inoculada com macerado de salsa inoculada com UFRGS-Ls14 (A) *L. uliginosus* inoculada com macerado de beterraba inoculada com UFRGS-Lc348 (B) *L. corniculatus* inoculadas com macerado de alface inoculadas com UFRGS-Lc348 (C) *P. sativum* inoculada com macerado de couve inoculadas com UFRGS-Ps8(D).

As observações da MEV de todas as plantas inoculadas mostraram diferentes padrões de colonização bacteriana na superfície radicular (Figura 5.3), áreas com baixa densidade de bactérias associadas às raízes, outras com alta densidade de bactéria associadas às raízes e outras com biofilmes recobrendo a superfície da raiz resultados similares aos padrões de colonização encontrados por Guerrero-Molina et al. (2012) trabalhando com a inoculação de *Azospirillum* em morango. Observou-se a colonização bacteriana na região dos pêlos radiculares (figura 5.3G), lesões nas raízes (figura 5.3D), formação de biofilme (figura 5.3H).

Essas regiões podem ser o ponto de entrada de rizóbios em hortaliças, já que micro-organismos endofíticos podem entrar na planta por regiões de lesões nas raízes, emergência das raízes laterais, ou pela produção de enzimas hidrolíticas que irão degradar a parede celular da planta hospedeira, dito caminho ativo de entrada na planta. (HALLMANN et al., 1997; STURZ et al., 2000). Em hortaliças a colonização de raiz de alface por rizóbio tem sido relatada (CHABOT et al., 1996; GARCIA-FRAILE et al., 2012) , mas são poucos os estudos em outros vegetais consumidos crus.

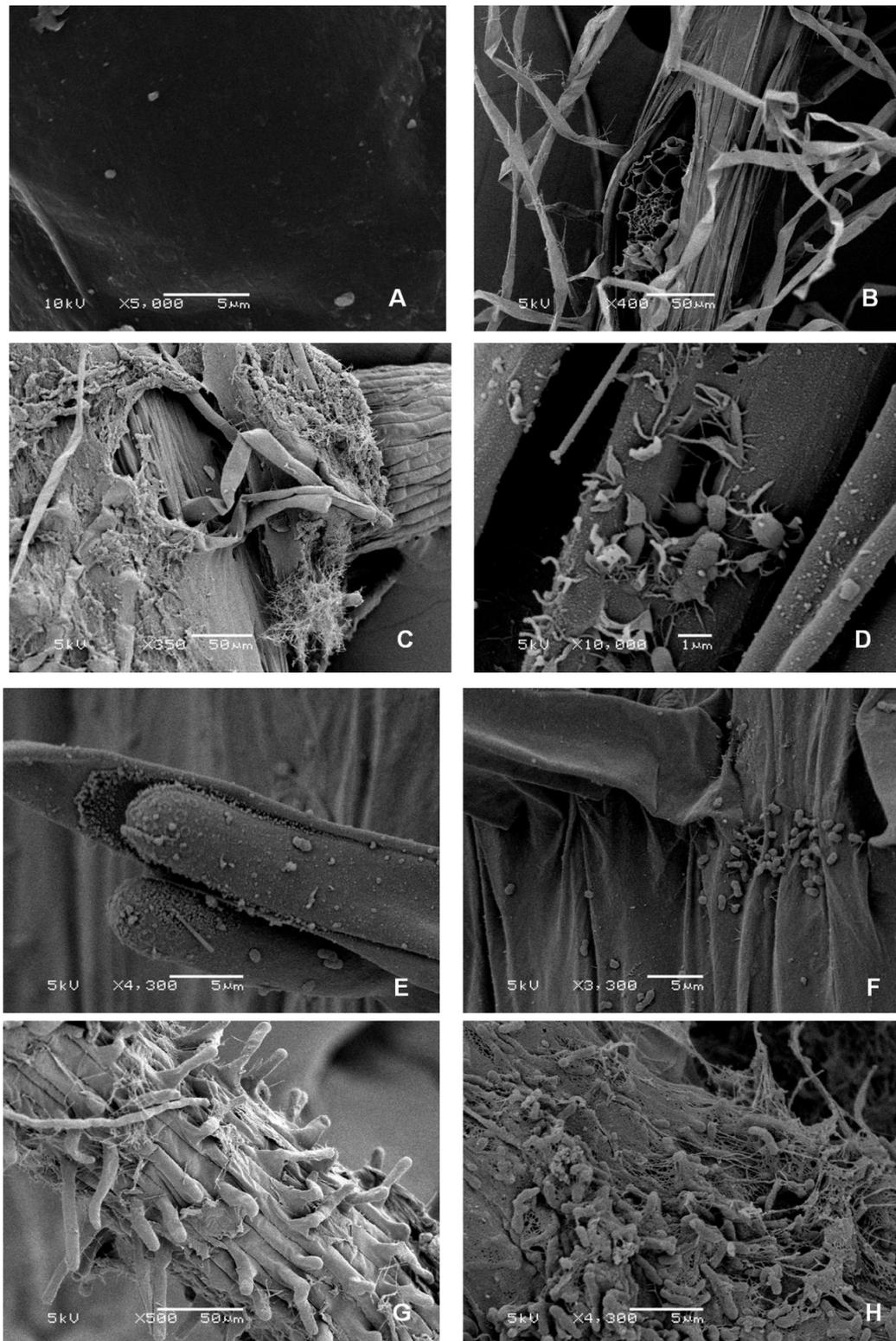


Figura 5. 3. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a colonização do tecido radicular de plantas olerícolas. Controle não-inoculado (A) Lesão na raiz de plantas de couve (B) Formação de biofilme e bactérias penetrando na lesão de plantas de couve com UFRGS-Ps8 (C,D) Colonização das raízes de salsa inoculadas com o isolado UFRGS-Ls14 (E,F) Colonização das raízes de beterraba inoculadas com o isolado UFRGS-Lc348 (G) Colonização das raízes de alface inoculadas com o isolado UFRGS-Lc348.

Flores-Félix et al. (2013) estudando estirpe de *R leguminosarum*., PEPV16, nodulante de *Phaseolus vulgaris* pode observar que essa estirpe apresentava vários mecanismos de promoção de plantas *in vitro*, e também mostrou capaz de colonizar as raízes de alface, o que é um passo importante para a obtenção de efeitos benéficos sobre o crescimento das plantas (LUGTENBERG et al., 2001; COMPANT et al. 2010).

5.4. CONCLUSÕES

Os rizóbios são capazes de colonizar as raízes e parte aérea das plantas de alface, beterraba, couve e salsa.

O padrão de colonização é diferente de acordo com a planta e em diferentes porções das raízes.

A interação dos rizóbios com as hortaliças é diferente em função da planta estudada. Um determinado isolado pode se encontrar presente no tecido de uma planta e no de outra não.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEMAD, M. Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: a review. **IIOABJ**, v. 3, p. 39–46, 2012.

AHEMAD M. & KIBRET M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **J. King. Saud. Univ. Sci.**,v. 26, p.1–20, 2014

BACILIO-JIMÉNEZ M. et al. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria . **Plant Soil**, v. 249, p. 271–277, 2003.

BRAUD, A., et al. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr-, Hg- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophoreproducing bacteria. **Chemosphere**, v. 74, p. 280–286, 2009

BOCK C.H. et al. Short-distance dispersal of splashed bacteria of *Xanthomonas citri subsp. citri* from canker-infected grapefruit tree canopies in turbulent wind. **Plant Pathol**, v. 61, p. 829–836, 2012.

CHABOT R. et al. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, p. 2767–2772, 1996.

COMPANT S. et al. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p.669-678, 2010.

COOMBS J.T. & FRANCO C.M.M. Visualization of an Endophytic *Streptomyces* Species in Wheat Seed. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 4260–4262, 2003.

DEGEFU Y. et al.. A new clade of *Dickeya* spp. plays a major role in potato blackleg outbreaks in North Finland. **Annals of Applied Biology**, v.162, p.231–241, 2013.

FLORES-FÉLIX J.D. et al Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. **J Plant Nutr Soil Sci** v. 176, p. 876–882, 2013.

FRIZZO, M.L. dos S. **Seleção e caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Su. Porto Alegre. 87p.2007.

GARCIÍA-FRAILE P. et al. *Rhizobium* Promotes Non-Legumes Growth and Quality in Several Production Steps: Towards a Biofertilization of Edible Raw Vegetables Healthy for Humans. **Plos One**, v.7, p.1-7,2012

GERMAIN K.J. Et al. Endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 57, p. 302–310, 2006.

GOTTANG E.A. et al. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p.3272-3282, 2007.

GUERRERO-MOLINA et al. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 205-212, 2012.

HUANG X.F. et al. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. **Botany**, v. 92, p. 267–275, 2014.

HALLMANN J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can J Microbiol**, v. 43, p. 895–914, 1997.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Ann Microbiol**. v. 60, p. 579–598, 2010.

INIGUEZ A.L. et al.Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 18, p. 169–178, 2005.

KUKLINSKI-SOBRAL J. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, p.1244-1251, 2004.

LUGTENBERG, B.J.J. et al. Molecular determinants of rhizosphere colonization by Pseudomonads, **Annual Review of Phytopathology**, v39, p.461-490, 2001.

MARTÍNEZ-HIDALGO P., et al. Revision of the taxonomic status of type strains of *Mesorhizobium loti* and reclassification of strain USDA 3471T as the type strain of *Mesorhizobium erdmanii* sp. nov. and ATCC 33669T as the type strain of *Mesorhizobium jarvisii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 1703–1708, 2015.

MENDES, R. et al. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, p. 7259-7267, 2007.

PEIX, A. et al. Bacterial associations with legumes. **Crit Rev Plant Sci** v. 34, p. 17–42, 2015.

RAJKUMAR, M., AE, N., PRASAD, M.N.V., FREITAS, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends Biotechnol**, v. 28, p. 142–149, 2010.

ROSENBLUETH, M. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interaction with hosts. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.19, p. 827-837, 2006.

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

SILVA, K. et al., Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35 p. 253– 262, 2012.

STURZ, A.V. et al. Bacterial endophytes: potencial role in developing sustainable systems of crops production. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 19. P. 1-30, 2000.

VANLAERE, E. et al. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** , v. 59, p. 102–111, 2009.

WILSON, M. et al. **Bacterial invasion as a virulence mechanism**. In: *Bacterial Disease Mechanisms*. Cambridge University Press. p 405-465, 2002.

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

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os isolados de rizóbios apresentam potencial para promover o crescimento de espécies. Todos os isolados utilizados apresentam pelo menos dois dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal avaliados.

A inoculação com a estirpe SEMIA 3007 foi a que apresentou resultados mais promissores na promoção de crescimento de plantas de alface, aumentando e acelerando a germinação, aumentando a biomassa dessas plantas tanto em casa de vegetação como no campo, como também os teores de nitrogênio, apresentando uma eficiência relativa de 105% em relação aos tratamentos controles sem inoculação. Estirpe esta com capacidade de colonizar os tecidos de plantas de alface foi nesta espécie hortícola onde pode-se verificar um maior número de isolados que conseguiram colonizar o interior da planta.

O isolado de rizóbio UFRGS-Ls54 apresenta-se como potencial promotor de crescimento para plantas de beterraba, devido aos seus três mecanismos de crescimento, pode o ter levado a promover o crescimento da parte aérea e das raízes, assim aumentar a absorção de nutrientes, como nitrogênio e potássio pelas plantas inoculadas. Isolado este que não foi possível verificar sua colonização no interior de plantas de beterraba, podendo ser considerado um colonizador rizosférico para plantas de beterraba.

Os rizóbios UFRGS-Ls14, UFRGS-Ps10 e UFRGS-Ps8 são capazes de promover o crescimento de plantas de couve. Na salsa os rizóbios inoculados

promovem o crescimento da parte aérea e das raízes e melhoram a absorção de nitrogênio e potássio pelas plantas de salsa.

Os rizóbios são capazes de colonizar as plantas de alface, beterraba, couve e cenoura.

APÊNDICES

Apêndice I: Meio Levedura Manitol Sólido (LM) (Vincent, 1970)

Composição	Concentração (gL ⁻¹)
Manitol	10
K ₂ HPO ₄ (*)	0,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O (*)	0,2
NaCl (*)	0,1
Extrato de levedura	0,5
Ágar	15g

Modo de preparo:

- Dissolver o manitol e o extrato de levedura em água destilada;
- Adicionar os sais (*) preparados previamente em solução estoque;
- Ajustar o volume para 1000 mL;
- Para preparar o meio levedura-manitol-vermelho congo (LMV), adicionar 10 mL de vermelho congo (solução de 250 mg de vermelho congo em 100 mL de água destilada) em 1 L de meio LM;
- Ajustar o pH em 6,8.

Apêndice II: Solução Nutritiva de Sarruge (1975).

Composição	Para 1L (sol. estoque)	Para 1L de meio	
Macronutrientes	KH_2PO_4	1M (136,1g)	1mL
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1M (246,4g)	2mL
	CaCl_2	1M (111,1g)	5mL
	KCl	1M (74,6g)	5mL
	NH_4NO_3	1M (80g)	1mL
	Fe EDTA	1M	10mL
Micronutrientes	H_3BO_3	2,86g	1mL
	ZnCl_2	0,1g	1mL
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**)	0,04g	1mL
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,02g	1mL

(*) retirou-se o $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pois o solo do RS possui muito manganês;

- Preparar as soluções estoque de macro e micronutrientes;
- Juntar os itens, exceto NH_4NO_3 , que deve ser autoclavado separadamente;
- Autoclavar a 121°C por 15min;
- Colocar em um galão com água esterilizada (de aproximadamente 20L).

SOLUÇÃO ESTOQUE DE FERRO EDTA

Composição	Para 1L solução estoque
Na EDTA (titriplex III – $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3,72g
$\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,78g
Água destilada	1L

- Dissolver o Na EDTA e o $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 900 mL de água;
- Aquecer até 80°C até dissolver totalmente;

Completar o volume com água.

Apêndice III. Meio King B

Composição	Concentração (gL ⁻¹)
Peptona	20g
K ₂ HPO ₄	1,15g
MgSO ₄	1,5g
Glicerol	15g

- Dissolver todos os ingredientes e completar para 1000mL de água destilada;
- Autoclavar a 121°C por 15 min.

Apêndice IV: Corante Cromoazurol-S (CAS)

- Dissolver 60,5 mg de Cromoazurol S em 50 ml de água ultrapura;
- Misturar com 10 ml de solução de ferro (III) (1 mM FeCl₃. 6H₂O, 10 mM HCl);
- Sob agitação suave, adicionar lentamente a mistura a 72,9 mg de HDTMA (CTAB) dissolvido em 40 ml de água ultrapura;
- A solução azul escura resultante deve ser autoclavada;
- Volume total = 100 ml de solução de CAS;

Preparar o meio de cultura e autoclavar

Adicionar a solução corante de CAS lentamente ao longo da parede do frasco, contendo o meio de cultura já preparado, com agitação suficiente para misturar o corante sem produção de espuma.

OBS: o pH do meio não deve estar acima de 6,8 para evitar alterações no CAS.