

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS SIMBIONTES DE *Desmodium incanum* E  
AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE GRAMÍNEAS**

FRANQUIÉLE BONILHA DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

Porto Alegre  
Fevereiro/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS SIMBIONTES DE *Desmodium incanum* E  
AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE GRAMÍNEAS**

Franquiéle Bonilha da Silva  
Engenheira Florestal

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de Concentração: Microbiologia Agrícola

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Fevereiro/2016

### CIP - Catalogação na Publicação

Bonilha da Silva, Franquiele  
SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS SIMBIONTES DE  
Desmodium incanum E AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO DE GRAMÍNEAS / Franquiele Bonilha da  
Silva. -- 2016.

62 f.

Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. RPCP. 2. Interação Planta-Microrganismo. 3.  
FBN. 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).

“O otimista é um tolo.  
O pessimista é um chato.  
Bom mesmo é ser um realista esperançoso.”

Ariano Suassuna

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, assim como ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, professores e funcionários, pela oportunidade de realizar esse sonho.

Ao meu orientador, Enilson Luiz Saccol de Sá, pelo conhecimento a mim passado, por acreditar no meu potencial e me conduzir até aqui, estando sempre disposto nos momentos em que eu precisei.

Aos técnicos, Márcio e Adão, pelo apoio técnico, gentilezas e amizade, dos quais sempre pude contar, assim como o seu Zé, que sempre foi incansável em me ajudar na casa de vegetação.

Aos colegas do PPG Ciência do Solo, do qual compartilhei por tantas vezes os laboratórios, a sala de aula, o chimarrão, as confraternizações, que me acolheram como se fosse uma integrante do programa.

Aos meus queridos colegas de laboratório, Franciane, Gleidson, Márcia, Priscila, Renata, Taís, Vitor, Vanessa, e em especial à Clarissa, por me estender a mão e me ajudar a dar os primeiros passos, ao Victor, meu primeiro amigo do laboratório, companheiro de disciplinas e “braço forte” que me ajudou sempre que solicitei e a Bruna, que me ensinou a pensar através das tantas conversas intelectuais que tivemos, pela parceria e companheirismo nos momentos de descontração. Obrigada a todos vocês, meus amigos, que quero levar para a vida toda!

Aos amigos e família, os quais sempre me apoiaram de alguma forma e que me privei tantas vezes de estar na presença para que esse sonho se tornasse realidade.

À minha mãe, dona Jussara, que está aí para provar que filho de empregada doméstica/diarista, pode sim fazer faculdade e ir muito mais além. Por ser mãe e pai de forma exemplar, sempre forte e dura sempre que necessário, de caráter inabalável. Obrigada por não medir esforços para que eu chegasse aonde cheguei.

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos a todos aqui citados.

# SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS SIMBIONTES DE *Desmodium incanum* E AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE GRAMÍNEAS<sup>1</sup>

Franquiéle Bonilha da Silva

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

## RESUMO

Rizóbios são bactérias do solo que, em simbiose com leguminosas, são capazes de fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico tornando-o disponível ao seu hospedeiro, que por sua vez fornece carboidratos para a bactéria. Além da simbiose com leguminosas, rizóbios podem interagir com plantas não-leguminosas de forma endofítica, sendo benéficos para planta por meio de múltiplos mecanismos, como a produção de fitormônios, solubilização de fosfatos e proteção contra patógenos. Sendo assim, o presente estudo visou isolar e selecionar rizóbios nativos do Rio Grande do Sul, simbioses em plantas de pega-pega (*Desmodium incanum*), capazes de promover o crescimento de gramíneas como arroz (*Oriza sativa*), trigo, (*Triticum aestivum*), aveia (*Avena sativa*) e milho (*Zea mays*). Para isso, os rizóbios foram isolados, autenticados e caracterizados morfológicamente. Posteriormente, foram caracterizados quanto à capacidade de solubilizar fosfato, produzir melanina e produzir ácido indol-acético (AIA) em meio de cultura com e sem adição de triptofano. Os rizóbios isolados foram avaliados quanto à eficiência simbiótica em plantas de pega-pega, quanto ao efeito na germinação em sementes de arroz e trigo, à interação com plantas de arroz e trigo *in vitro* e à promoção de crescimento em plantas de aveia e milho cultivadas em casa de vegetação. Os rizóbios isolados e autenticados em pega-pega solubilizaram fosfato tricálcico em meio de cultura, não foram capazes de produzir melanina e produziram AIA com e sem adição de triptofano. Os rizóbios foram eficientes simbioticamente, aceleraram a germinação de sementes de arroz e aumentaram a parte aérea de plantas de arroz e as raízes de plantas trigo *in vitro*. Aumentaram a massa seca da parte aérea e raiz, comprimento de parte aérea e acúmulo de nutrientes em plantas de aveia e milho em casa de vegetação, sendo os rizóbios Dinc1, Dinc3, Dinc9, Dinc13 e Dinc18 os mais eficientes em aveia e Dinc1, Dinc3 e Dinc8 os mais eficientes em milho.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (50 p.) fevereiro, 2016.

# SELECTION OF NATIVE RHIZOBIA SYMBIONTS FROM *Desmodium incanum* AND EVALUATION OF GROWTH PROMOTION OF GRASSES<sup>1</sup>

Franquiéle Bonilha da Silva

Advisor: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

## ABSTRACT

Rhizobia are soil bacteria that in symbiosis with leguminous are capable of biologically fix atmospheric nitrogen making it available to its host, which in turn provides carbohydrates for bacteria. Besides the symbiosis with leguminous, rhizobia can interact with non-leguminous plants of endophytic form, being beneficial to the plant through multiple mechanisms such as the production of phytohormones, phosphate solubilization and protection against pathogens. Therefore the study aimed to isolate and select native rhizobia of Rio Grande do Sul, symbionts in plant *Desmodium incanum*, which promote the growth of grasses such as rice (*Oryza sativa*), wheat (*Triticum aestivum*), oats (*Avena sativa*) and maize (*Zea mays*). For this, strains were isolated, authenticated and characterized morphologically. Subsequently, they were characterized for their ability to solubilize phosphate, produce melanin and indole acetic acid (IAA) in the growth medium, with and without added tryptophan. The isolated rhizobia were evaluated for symbiotic efficiency in *D. incanum* plants, as to the effect on the germination of rice and wheat seeds, to the interaction with rice plants and wheat *in vitro* and growth promoting in oat and maize plants growth in a greenhouse. The rhizobia isolated and authenticated in *D. incanum*, were able to solubilize tricalcium phosphate in growth medium, were unable of producing melanin and produced IAA with and without the addition of tryptophan. The strains were symbiotically efficient, accelerated the rice seed germination and increased the shoot of rice plants and roots of wheat plants *in vitro*. Increased the dry weight of shoot and root, shoot length and nutrient accumulation in oat and maize plants in the greenhouse, and the rhizobia Dinc1, Dinc3, Dinc9, Dinc13 and Dinc18 the most efficient in oats and Dinc1, Dinc3 e Dinc8 the most efficient in maize.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (50 p.) february, 2016.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1 Objetivo geral .....	3
2.2 Objetivos específicos .....	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
3.1 Simbiose entre rizóbios e leguminosa .....	4
3.2 Mecanismos utilizados por rizóbios para promoção de crescimento de plantas ...	5
3.2.1 Solubilização de fosfato .....	5
3.2.2 Produção de fitormônios .....	6
3.2.3 Produção de sideróforos .....	8
3.3 Rizóbios como promotores de crescimento em gramíneas .....	9
3.4 <i>Desmodium incanum</i> (pega-pega) .....	10
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
4.1 Isolamento dos rizóbios .....	12
4.2 Autenticação dos isolados .....	13
4.3 Solubilização de fosfato .....	13
4.4 Teste da atividade da tirosinase .....	14
4.5 Produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético (AIA) .....	15
4.6 Avaliação da eficiência dos isolados na fixação simbiótica de nitrogênio em pega-pega ( <i>Desmodium incanum</i> ) .....	15
4.7 Efeito da inoculação de rizóbios na germinação de sementes de arroz ( <i>Oriza sativa</i> ) e trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) .....	17
4.8 Avaliação da interação dos rizóbios com plântulas de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) e arroz ( <i>Oriza sativa</i> ) <i>in vitro</i> .....	17
4.9 Avaliação da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento de milho ( <i>Zea mays</i> ) e aveia ( <i>Avena sativa</i> ) em casa de vegetação .....	18
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>20</b>
5.1 Caracterização morfológica e autenticação .....	20
5.2 Capacidade de solubilização de fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) .....	20

5.3 Teste da atividade da tirosinase .....	22
5.4 Produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético (AIA) .....	22
5.5 Avaliação da eficiência dos isolados na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de <i>D. incanum</i> cultivadas em casa de vegetação .....	23
5.6 Efeito sobre a germinação de sementes de arroz e trigo.....	25
5.7 Avaliação da interação dos rizóbios com arroz e trigo <i>in vitro</i> .....	28
5.8 Avaliação da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento de plantas de aveia em casa de vegetação .....	30
5.9 Avaliação da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento de plantas de milho em casa de vegetação .....	33
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>38</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Morfologia colonial de rizóbios isolados de nódulos radiculares de plantas de <i>D. incanum</i> coletadas na Estação Experimental Agrônômica da UFRGS.....	20
<b>Tabela 2</b>	Médias seguidas do desvio padrão da quantificação por colorimetria da produção de ácido indol-acético (AIA) em meio de cultura LM, sem e com adição de triptofano (50 mg.L <sup>-1</sup> ) por rizóbios de <i>D. incanum</i> .....	23
<b>Tabela 3</b>	Médias seguidas do desvio padrão da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca dos nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e índice de eficiência relativa (IER) em relação aos tratamentos controle dos isolados de <i>D. incanum</i> .....	24
<b>Tabela 4</b>	Médias seguidas do desvio padrão do índice de velocidade de germinação (IVG) e do percentual total de germinação ao final de sete dias em sementes de trigo e arroz.....	25
<b>Tabela 5</b>	Médias seguidas do desvio padrão do comprimento da parte aérea e da raiz de arroz e trigo em tubos de ensaio, inoculados com rizóbios isolados de <i>D. incanum</i> .....	29
<b>Tabela 6</b>	Médias seguidas do desvio padrão da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), índice de eficiência relativa (IER), de plantas de aveia em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de <i>D. incanum</i> .....	30
<b>Tabela 7</b>	Médias seguidas do desvio padrão do teor de clorofila, fósforo total da parte aérea (P total) e nitrogênio total da parte aérea (N total), de plantas de aveia em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de <i>D. incanum</i> .....	32
<b>Tabela 8</b>	Médias seguidas do desvio padrão da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), volume de raiz (Vol. raiz), índice de eficiência relativa (IER), de plantas de milho em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de <i>D. incanum</i> .....	34
<b>Tabela 9</b>	Médias seguidas do desvio padrão do nitrogênio total da parte aérea (N total) e do fósforo total da parte aérea (P total), de plantas de milho em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de <i>D. incanum</i> .....	35

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Médias do índice de solubilização de fosfato (ISF) dos isolados em placa com meio de cultura sólido.....	21
<b>Figura 2</b>	Percentual acumulado de germinação de sementes de arroz inoculadas com o rizóbio Dinc6 de <i>D. incanum</i> , em comparação com o tratamento controle com LM.....	26
<b>Figura 3</b>	Percentual acumulado de germinação de sementes de arroz inoculadas com o rizóbio Dinc7 de <i>D. incanum</i> , em comparação com o tratamento controle com LM.....	27
<b>Figura 4</b>	Percentual acumulado de germinação de sementes de arroz inoculadas com o rizóbio Dinc8 de <i>D. incanum</i> , em comparação com o tratamento controle com LM.....	27
<b>Figura 5</b>	Percentual acumulado de germinação de sementes de arroz inoculadas com o rizóbio Dinc16 de <i>D. incanum</i> , em comparação com o tratamento controle com LM.....	28
<b>Figura 6</b>	Análise de componentes principais referente às variáveis descritas nas tabelas 6 e 7, de plantas de aveia em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios simbiotes em <i>D. incanum</i> .....	33
<b>Figura 7</b>	Análise de componentes principais referente às variáveis descritas nas tabelas 8 e 9, de plantas de milho em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios simbiotes em <i>D. incanum</i> .....	36

## 1 INTRODUÇÃO

Rizóbios são bactérias amplamente utilizadas na agricultura pela sua capacidade de fixar nitrogênio quando estão em simbiose com plantas leguminosas. Culturas de ampla utilização comercial como a soja, dispensam completamente a adubação nitrogenada quando realizada a aplicação de inoculantes. Além da redução nos custos com a fertilização, destaca-se a importância ambiental da utilização de inoculantes, principalmente devido à redução da contaminação por nitrato em corpos d'água e lençol freático.

Nas últimas décadas, uma grande mobilização de pesquisadores tem dado uma maior atenção ao estudo dos campos nativos, que vêm sofrendo uma grande pressão antrópica, geradora da perda da diversidade tanto da flora como da fauna local.

As áreas de pastagens nativas no Rio Grande do Sul apresentam uma grande riqueza de espécies vegetais, entretanto, boa parte ainda está em estudos iniciais, e se tem poucas informações científicas. Uma destas espécies é o *Desmodium incanum*, popularmente conhecida como pega-pega, é uma leguminosa nativa do sul do Brasil, que apresenta boas características como forrageira. Adapta-se a ambientes extremos, como solos pedregosos, com pH ácido e de baixa fertilidade. Além disso, apresenta capacidade de fazer simbiose com rizóbios, que quando há deficiência de nitrogênio no solo fixam nitrogênio atmosférico, tornando-o diretamente disponível para o hospedeiro e indiretamente para a vegetação circunvizinha, através de exsudatos radiculares e ciclagem de resíduos.

Mais recentemente, estudos têm mostrado que além da simbiose em leguminosas, os rizóbios também apresentam a capacidade de interação com não leguminosas. Essa interação, na maioria das vezes, se dá de forma endofítica e nesse caso, o rizóbio não age pela fixação biológica de nitrogênio, mas por múltiplos mecanismos, como pela produção e regulação de fitormônios, que auxiliam no crescimento tanto da raiz como da parte aérea das plantas, pela biodisponibilização de nutrientes essenciais que se encontram de forma insolúvel no solo, e até mesmo de forma indireta pela capacidade de biocontrole de possíveis patógenos, pela produção de sideróforos, antibióticos e outros metabólitos secundários. A entrada do rizóbios na planta se dá por fissuras radiculares, permitindo seu estabelecimento dentro da planta entre as células vegetais. Após a infecção, os rizóbios se distribuem

pela raiz, podendo chegar até a parte aérea.

Atualmente, diversos estudos vêm mostrando a eficiência de rizóbios quando inoculados em gramíneas, como promotores de crescimento vegetal. As principais características observadas quando há interação entre rizóbios e gramíneas são o incremento em matéria seca, tanto em raiz como em parte aérea, uma maior produção em grãos, bem como, o aumento no acúmulo de nutrientes.

A inoculação de rizóbios nativos tende a responder melhor aos cultivos, por estarem adaptados ao tipo de solo, clima e microbiota local. Sendo assim, a hipótese central deste trabalho é que rizóbios nativos simbiotes em *D. incanum* são capazes de interagir e promover o crescimento de gramíneas como arroz (*Oriza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), aveia-branca (*Avena sativa*) e milho (*Zea mayz*).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Isolar e selecionar rizóbios nativos do Rio Grande do Sul, simbiotes em plantas de pega-pega (*Desmodium incanum*), capazes de promover o crescimento de gramíneas como arroz (*Oriza sativa*), trigo, (*Triticum aestivum*), aveia (*Avena sativa*) e milho (*Zea mays*).

### 2.2 Objetivos específicos

Selecionar rizóbios eficientes na fixação simbiótica do nitrogênio em plantas de *Desmodium incanum*.

Caracterizar fenotipicamente os rizóbios estudados, pela capacidade de solubilizar fosfato, pela atividade da enzima tirosinase e pela produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético.

Selecionar rizóbios simbiotes em *Desmodium incanum* promotores de crescimento de plantas.

Avaliar a capacidade dos rizóbios em promover o crescimento de gramíneas como arroz (*Oriza sativa*), trigo, (*Triticum aestivum*), aveia (*Avena sativa*) e milho (*Zea mays*).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Simbiose entre rizóbios e leguminosa

Rizóbios são bactérias do solo, de vida livre ou simbiontes em plantas leguminosas. São Gram-negativas, não formadoras de endósporos, com número de flagelos e tamanho que variam conforme o gênero (0,5-0,9 por 1,2-3,0  $\mu\text{m}$ ). Quando em simbiose, formam estruturas radiculares denominadas de nódulos, onde realizam a fixação biológica de nitrogênio (SOMASEGARAM & HOBEN, 1994; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Quando em vida livre, são móveis, em forma de bastonete, aeróbios e incapazes de fixar nitrogênio atmosférico ( $\text{N}_2$ ) (AZEVEDO, 1998). Já em simbiose com leguminosas, assumem a forma de bacteróides e ocorre um aumento no tamanho de suas células, passando a se nutrir de compostos sintetizados pela planta hospedeira e viver em condições de microaerofilia, pois o oxigênio é tóxico a enzima nitrogenase e passam a fixar o nitrogênio atmosférico (CARDOSO et al., 1992; CANIGIA, 2003; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Atualmente, os microrganismos diazotróficos capazes de induzir a formação de nódulos radiculares através da simbiose e fixar nitrogênio atmosférico estão distribuídos entre as  $\alpha$ -proteobactéria (cujos gêneros mais conhecidos são *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium*) e as  $\beta$ -proteobactéria (onde se destacam os gêneros *Burkholderia* e *Crupiaavidus*) (ZAKHIA & LAJUDIE, 2001; VANDAMME et al., 2002; SAHGAL & JOHRI, 2003; BARRETT & PARKER, 2006).

O processo da simbiose ocorre quando há deficiência de nitrogênio no solo. Durante o processo, a planta libera flavonóides que são reconhecidos pela bactéria. A bactéria então, expressa os fatores *NodD*, localizados na sua membrana citoplasmática, que então ativam o regulador *LysR*. A partir daí, ocorre a produção de lipoquito-oligossacarídeos pela bactéria, que são reconhecidos pelas células radiculares e juntamente com uma série de hormônios que provocam o encurvamento do pelo radicular. Em seguida a nodulina (também chamada de *enod*, gene de expressão de iniciação da nodulação), provoca uma série de alterações na estrutura do pelo radicular, formando um cordão de infecção, permitindo a entrada da bactéria na raiz e o desenvolvimento dos nódulos nas raízes do hospedeiro,



demonstrando uma íntima relação entre uma bactéria do solo e seu hospedeiro, onde o rizóbio, em um ambiente pobre em nitrogênio, promove o crescimento da planta leguminosa ao disponibilizar o nutriente limitante, ilustrando da melhor forma o conceito das rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (LOH & STACEY, 2003; GRAY & SMITH, 2005; VAN LOON, 2007; PEREIRA, 2008).

O processo de fixação biológica de nitrogênio é regulado pelos genes *nif* e *fix*, responsáveis pela síntese e regulação de um sistema enzimático, onde a enzima nitrogenase atua como catalisadora da reação que reduz o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ). Quando em contato com o meio aquoso do citoplasma, a amônia se transforma no íon amônio ( $NH_4^+$ ), que é transportado para dentro da célula do hospedeiro (ARGUDO et al., 2004; KING & PURCELL, 2005).

### **3.2 Mecanismos utilizados por rizóbios para promoção de crescimento de plantas**

Rizóbios quando inoculados em plantas não-leguminosas podem estimular o crescimento dessas plantas pela produção de fitormônios como o ácido indol-acético (BISWAS et al., 2000; CHEN et al., 2005), pela solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999) e por proteger as plantas contra patógenos (MISHRA et al., 2006; DUTTA et al., 2008).

Vários estudos têm mostrado que a rotação de cultura entre plantas leguminosas e não-leguminosas traz efeitos benéficos para as plantas não-leguminosas, além de favorecer o aumento da população microbiana na rizosfera (YANNI et al., 1997; BARRIUSO & SOLANO, 2008; HAHN, 2013).

#### **3.2.1 Solubilização de fosfato**

O fósforo (P) é um nutriente essencial para o metabolismo de plantas e apresenta baixa disponibilidade em muitos solos agrícolas. Hoje, muitos solos agrícolas têm um teor total de P elevado devido à aplicação de fertilizantes durante longos períodos de tempo. Por outro lado, a maior parte deste fósforo se encontra em forma mineral que é lentamente disponibilizada para as plantas (RODRIGUEZ et

al., 2006; RICHARDSON et al., 2009).

As formas insolúveis de P, tais como fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ ), o fosfato de alumínio ( $\text{Al}_3\text{PO}_4$ ), fosfato de ferro ( $\text{Fe}_3\text{PO}_4$ ), podem ser convertidos em P solúvel por organismos solubilizadores que habitam diferentes ecossistemas do solo (SONG et al., 2008; SHARMA et al., 2013). Entre as comunidades bacterianas do solo, estirpes ectorizosféricas como *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp., e simbioses como rizóbios têm sido descritos como solubilizadores de fosfato eficazes (IGUAL et al., 2001).

A capacidade das bactérias da rizosfera de solubilizar fosfatos insolúveis é atribuída a mecanismos primários como a excreção de íons  $\text{H}^+$ , a produção de ácidos orgânicos e a biossíntese de fosfatases ácidas (ARCAND & SCHNEIDER, 2006). Dentre os ácidos orgânicos produzidos pode-se citar acetato, lactato, malato, oxalato, succinato, citrato, gluconato, os quais formam complexos com o ferro ou alumínio presentes nos fosfatos de ferro e alumínio, tornando assim, o fosfato presente no solo disponível para as plantas (GYANESHWAR et al., 2002). Estes microrganismos têm a capacidade de se desenvolver em meios com fosfato tricálcico ou materiais insolúveis semelhantes como a única fonte de fosfato e não só assimilam o elemento, mas também solubilizam quantidades além das suas exigências nutricionais, tornando o excedente disponível para as plantas (CHEN et al., 2006).

Afzal e Bano (2008), inocularam uma estirpe de rizóbio, associada com uma estirpe bacteriana solubilizadora de fosfato, em cultivo de trigo em um solo arenoso deficiente em fósforo, e verificaram uma melhoria de 30 a 40% quando comparado ao tratamento que recebeu somente a aplicação de fertilizantes. Além disso, houve um aumento significativo no peso seco da raiz, na altura das plantas, no comprimento das espigas, no rendimento de grãos e no teor de açúcar e proteína foliar.

### 3.2.2 Produção de fitormônios

A produção de fitormônios por rizobactérias promotoras de crescimento é considerada um dos mecanismos mais importantes na promoção de crescimento das plantas (SPAEPEN et al., 2007). Fitormônios são compostos orgânicos que, em concentrações extremamente baixas influenciam os processos bioquímicos,

fisiológicos e morfológicos em plantas, e a sua síntese é finamente regulada (FUENTES-RAMIREZ & CABALLERO-MELLADO, 2006). Em termos gerais, com base em suas estruturas químicas e seus efeitos sobre as plantas, essas substâncias reguladoras de crescimento têm sido divididas em cinco grupos gerais: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e um grupo chamado de inibidores, que inclui o ácido abscísico (ABA), compostos fenólicos e alcalóides (FRANKENBERGER & ARSHAD, 1995; FERGUSON & LESSENGER, 2006).

A produção de auxinas apresenta um papel muito importante na interação planta/microrganismo, sendo o ácido indol-acético (AIA), o mais importante das auxinas. O AIA é o principal responsável pela divisão e expansão de células, diferenciação de tecidos de plantas e pelo estímulo ao alongamento de raízes. A capacidade de sintetizar AIA tem sido detectada em muitas rizobactérias de vida livre, bactérias simbióticas, bem como em espécies bacterianas patogênicas (COSTACURTA & VANDERLEYDEN, 1995; TSAVKELOVA et al., 2006).

Atualmente, a capacidade de sintetizar auxinas é o mecanismo mais bem estudado em rizobactérias (TSAVKELOVA et al., 2006; SPAEPEN et al., 2007). A grande maioria das rizobactérias, sintetizam AIA a partir do precursor triptofano por vias metabólicas diferentes, porém, o AIA pode também ser sintetizado através de vias independentes do triptofano, embora em quantidades inferiores (SPAEPEN et al., 2007). A síntese de AIA por microrganismos é realizada por uma dessas três vias: a primeira é a via ácido indol-3-pirúvico e aldeído indol-3-acético, que é o que ocorre na maioria das bactérias, como espécies saprófitas do gênero *Agrobacterium* e *Pseudomonas* e algumas estirpes pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, a segunda é a conversão do triptofano em aldeído indol-3-acético, que pode envolver uma via alternativa em que se forma triptamina, que ocorre em *Pseudomonas* e *Azospirillum*, e a terceira é através da biossíntese indol-3-acetamida, que é a rota realizada por bactérias fitopatogênicas (KHAN et al., 2014).

O AIA produzido por rizóbios pode induzir a formação de raízes e, conseqüentemente, um incremento em volume e peso seco e área da superficial de raízes quando inoculados em não-leguminosas (DAZZO & YANNI, 2006). A inoculação com bactérias produtoras de auxina podem também resultar no aumento da formação de raízes adventícias (SOLANO et al., 2010). Estirpes produtoras de AIA são amplamente utilizadas em cultivos agrícolas, como promotoras de

crescimento de plantas. As estirpes *Azospirillum brasilense* Az39 e *Bradyrhizobium japonicum* E109 são capazes de excretar AIA em meio de cultura, a uma concentração suficiente para produzir as alterações morfológicas e fisiológicas em tecidos jovens de sementes de milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max*), sendo responsáveis pelo crescimento precoce das plântulas (CASSAN et al., 2009). Um consórcio utilizando duas estirpes, *Burkholderia* sp. MSSP e *Sinorhizobium meliloti* PP3 conhecidas como produtoras de AIA, quando inoculadas em guandu (*Cajanus cajan*) mostraram um aumento excepcional no crescimento de mudas (PANDEY & MAHESHWARI, 2007).

Assim como as auxinas, as citocininas influenciam na divisão celular e crescimento celular, como também afetam a dormência das sementes, floração, frutificação e senescência da planta (FERGUSON & LESSENGER, 2006). A produção de citocininas por rizobactérias promotoras de crescimento é, no entanto, menos expressiva em comparação com a produção de auxinas (BOIERO et al., 2007). Métodos utilizados para a detecção de citocinina ainda estão em estudo, e, portanto, resultados sobre a síntese de citocinina por rizobactérias em geral, são escassos.

A giberelina é outro regulador de crescimento que afeta a germinação de sementes (MIRANSARI & SMITH, 2009), estimula o crescimento de plantas (GUO et al., 2011) e retarda o envelhecimento de plantas (FERGUSON & LESSENGER, 2006). O papel da giberelina na simbiose de rizóbios com leguminosas pode representar a forma como ocorre a colonização em não leguminosas. Por exemplo, *Azorhizobium caulinodans* coloniza intercelularmente a leguminosa semi-aquática *Sesbania rostrata* através de fissuras nos tecidos, sendo que este processo é mediado por giberelinas. Considerando que a entrada por fissuras é o principal processo de colonização endofítica de não-leguminosas por rizóbios, logo a produção de giberelinas por esses rizóbios pode ter papel fundamental nesse processo (LIEVENS et al., 2005).

### 3.2.3 Produção de sideróforos

Os sideróforos são compostos de baixo peso molecular que são produzidos e utilizados por bactérias e fungos como agentes quelantes de ferro (Fe). Estes

compostos são produzidos por vários tipos de bactérias, em resposta à deficiência de ferro que ocorre normalmente em solos de pH neutro a alcalino, devido à baixa solubilidade do ferro em pH elevado (SHARMA & JOHRI, 2003). Muitos processos celulares são dependentes de ferro, tais como o transporte de elétrons, a redução de oxigênio durante a síntese do ATP, a fotossíntese e a síntese de aminoácidos (RATLEDGE & DOVER, 2000; BENITE et al., 2002).

Uma série de fatores ambientais modulam a síntese de sideróforos, incluindo o pH, o teor e a forma de íons de ferro disponíveis, a presença de outros oligoelementos, e fontes adequadas de carbono, nitrogênio e fósforo (DUFFY & DÉFAGO, 1999). O crescimento bacteriano assim como a produção de sideróforos é estimulada na presença de sulfato de amônio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  e determinados aminoácidos, no entanto, uma maior produção de sideróforos é observada na presença de uréia (SAYYED, et al., 2005).

A produção de sideróforos por rizobactérias promotoras de crescimento pode evitar a proliferação de microorganismos patogênicos na rizosfera, devido a capacidade de sequestrar o ferro na forma  $\text{Fe}^{3+}$ , tornando-o indisponível para esses microrganismos (SIDDIQUI, 2006).

### **3.3 Rizóbios como promotores de crescimento em gramíneas**

Além da simbiose com leguminosas, rizóbios também apresentam a capacidade de interação com outras famílias, como as gramíneas. Diversos estudos já demonstraram o efeito benéfico da interação de rizóbios com gramíneas, como arroz (*Oriza sativa*) (YANNI et al., 2001; MISHRA et al., 2006; OSORIO FILHO et al., 2016), milho (*Zea mays*) (RIGGS et al., 2001; CASSAN et al., 2009; HAHN et al., 2013), aveia (*Avena sativa*) (STAJKOVIC-SRBINOVIC et al., 2014) e trigo (*Triticum aestivum*) (ETESAMI et al., 2009).

Diferente do que ocorre em leguminosas, o processo de infecção por rizóbios em não leguminosas ocorre nas raízes laterais emergentes, sem a formação de um cordão de infecção como é o caso da infecção em plantas leguminosas (SHARMA et al., 2008; HAHN, 2013).

Yanni et al. (1997) foram os primeiros a sugerir que há uma migração ascendente dos rizóbios quando estes infectam o sistema radicular de gramíneas,

em um estudo onde foi possível localizar microscopicamente uma estirpe de *R. leguminosarum* bv. *Trifolii* dentro de folhas e no colmo, quando inoculada em plantas de arroz em condições assépticas. Em um trabalho de Chi et al. (2005), quatro estirpes de rizóbio marcados com a proteína fluorescente *gfp* infectaram e colonizaram tecidos de arroz, iniciando pelas raízes laterais emergentes, colonizando então a extensão das raízes, ascendendo pelo colmo até as folhas, onde desenvolveram populações densas de até  $10^{10}$  rizóbios por  $\text{cm}^3$  de tecido infectado. Além disso, algumas dessas estirpes apresentaram a capacidade de persistir nos tecidos de arroz até as fases reprodutivas.

Yanni et al. (2001), em um experimento de campo, verificaram que estirpes de rizóbios foram capazes de aumentar o volume radicular, a massa seca da parte aérea, a eficiência no uso do nitrogênio e o rendimento em grãos de arroz. Mishra et al. (2006), observaram um aumento na altura de plantas de arroz, bem como o número de panículas, a matéria seca e o rendimento em grãos, quando as plantas foram inoculados com rizóbio. Osorio Filho et al. (2016), verificaram que a inoculação de rizóbios em arroz, aumenta a produção de massa seca e que a magnitude desse efeito aumenta conforme a dose de nitrogênio aplicada, indicando que através da inoculação de rizóbios é possível reduzir a quantidade de adubo nitrogenado aplicado na cultura.

Em plantas de milho, Hahn (2013) observou que a inoculação com a estirpe UFRGS-VP16 (*Burkholderia* sp.), aumentou a massa seca da parte aérea e das raízes, assim como o acúmulo de nitrogênio em diferentes híbridos, tanto em experimento em casa de vegetação, quanto em cultivo a campo, consorciado com trevo-branco (*Trifolium repens*) inoculado com a mesma estirpe. No mesmo trabalho, a estirpe UFRGS-VP16 também foi responsiva à cultura de azevém (*Lolium multiflorum*), consorciada com trevo-branco inoculado, aumentando a massa seca da parte aérea e também o acúmulo de nitrogênio da parte aérea.

### **3.4 *Desmodium incanum* (pega-pega)**

*Desmodium incanum* é uma leguminosa nativa da América do Sul, e pode ser encontrada em todas as regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul (GARCIA & BASEGGIO, 1999). É perene, estival, apresenta boas características bromatológicas

como forrageira, e é bastante usada na alimentação animal (BOLDRINI, 2003).

Pode ser encontrada tanto em locais ensolarados, como sombreados, em matas, capoeiras, cerrado, várzea, margens de estradas, dunas, campos onde se predomina a presença de gramíneas e áreas cultivadas (OLIVEIRA, 1960). Apresenta boa adaptação à vários tipos de solo, inclusive os de baixa fertilidade, além de tolerar uma variação de pH de 4,0 a 8,0 (SKERMAN, et al., 1991).

O pega-pega é capaz de entrar em simbiose com rizóbios, formando nódulos radiculares onde ocorre a fixação biológica de nitrogênio, que é disponibilizado para a leguminosa e, ao mesmo tempo pode beneficiar outras espécies, pela liberação de exudatos radiculares e pela ciclagem dos resíduos da leguminosa (GRANADA, 2010).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Isolamento dos rizóbios

Foram coletadas plantas de *Desmodium incanum*, em diferentes locais da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA – UFRGS), localizada no município de Eldorado do Sul – RS, no final do inverno, em setembro de 2014.

De acordo com a classificação de Köppen, o clima local é subtropical úmido com verão quente, do tipo fundamental Cfa. O solo é classificado como argissolo vermelho distrófico típico (EMBRAPA, 2006). As características químicas do solo (0-20 cm de profundidade) são: pH em água 5,6; 280 g.Kg<sup>-1</sup> de argila; 24 g.Kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica; 12,5 mg.dm<sup>-3</sup> de fósforo; 76 mg.dm<sup>-3</sup> de potássio; 2,6 cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup> de cálcio; 1,1 cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup> de magnésio; 0,5 cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup> de alumínio (HAHN, 2013).

Os nódulos foram retirados das raízes e higienizados com água destilada, esterilizada, e armazenados em recipientes com sílica até o momento do isolamento.

Os nódulos foram previamente reidratados durante uma hora em água destilada esterilizada. Logo em seguida, foram desinfestados pela imersão em álcool 70% por 30 segundos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio (2,0%) por 60 segundos e após, sete lavagens sucessivas em água destilada esterilizada.

Cada nódulo foi macerado com o auxílio de uma pinça esterilizada, em placa contendo meio ágar levedura-manitol (VINCENT, 1970) com adição de corante vermelho congo (LMV) (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994).

As placas foram incubadas no escuro a 28°C e observadas diariamente. Colônias homogêneas e com características morfológicas persistentes foram inoculada pelo método de estriamento em placas contendo meio LMV, de forma sucessiva até que se obtivesse colônias puras e isoladas. Essas colônias foram transferidas para tubos contendo meio ágar LM inclinado e incubados em estufa a 28°C por sete dias e, após, armazenadas sob refrigeração.

Os isolados foram avaliados quanto à morfologia colonial, onde se observou bordo, forma, elevação, brilho da superfície, tamanho, densidade ótica e viscosidade das colônias.

Além disso, se avaliou a produção de compostos alcalinos ou ácidos pelos rizóbios pela inoculação das bactérias em meio ágar LM (VINCENT, 1970)



com adição do corante indicador Azul de Bromotimol (25mg/L). Os rizóbios foram avaliados após sete e dez dias de incubação a 28°C, a mudança da coloração do meio de verde para amarelo indica a acidificação do meio, já a alteração para o azul, indica a alcalinização do mesmo (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994).

## **4.2 Autenticação dos isolados**

Os isolados foram avaliados quanto a capacidade de induzir a formação de nódulos radiculares e fixar nitrogênio em plantas de pega-pega cultivadas em casa de vegetação. Para isto, sementes de pega-pega foram escarificadas manualmente com lixa para madeira número 150, e passaram por desinfestação, conforme metodologia utilizada para desinfestação de nódulos descrita no item 4.1, e então pré-germinadas, no escuro, à 28°C, em placas de petri com papel filtro previamente autoclavadas umedecidas com 3 mL de água destilada estéril.

O experimento foi conduzido em copos descartáveis de 300 mL com substrato areia e vermiculita (1:2) estéril. Foram colocadas três plântulas por copo, e adicionou-se 1 mL de inóculo suspenso em solução salina (0,85%) estéril, com uma concentração média de  $1,9 \cdot 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Para a nutrição das plantas, foi aplicada a cada dois dias 100 ml solução nutritiva (SARRUGE, 1975) sem adição de nitrogênio, diluída a 25%. Cada isolado foi inoculado em quatro repetições distribuídas ao acaso, além de um tratamento testemunha sem inóculo, para avaliar a possibilidade de contaminação. Após 45 dias a contar da inoculação, as plantas foram colhidas e avaliadas visualmente, onde se observou a formação de nódulos e a capacidade de fixar nitrogênio, observada pela coloração avermelhada no interior no nódulo e coloração verde intensa das folhas da planta. Os isolados que não foram capazes de realizar simbiose com o hospedeiro foram descartados.

## **4.3 Solubilização de fosfato**

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada em placas de petri contendo o meio com 10 g.L<sup>-1</sup> glicose, 5 g.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl, 1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 15

g.L<sup>-1</sup> de Agar (VERMA et al., 2001), em pH 6,8, adaptado, onde se substituiu 4 g.L<sup>-1</sup> de fosfato de cálcio (CaHPO<sub>4</sub>) por 1 g.L<sup>-1</sup> de fosfato tricálcico (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), como fonte de fosfato. Para a inoculação das placas, os isolados foram crescidos em frascos contendo 15 mL de meio levedura manitol e mantidos sob agitação constante a 120 rpm, a 28°C durante 5 dias. A inoculação nas placas foi realizada com gotas de 20 µL, com três repetições por isolado. As placas foram mantidas em incubador a 28°C por sete dias.

Após o período de incubação, observou-se a formação de halo transparente em torno da colônia, indicando a capacidade de solubilização do fosfato. Após, foram medidos os diâmetros dos halos e das colônias para a obtenção do índice de solubilização de fosfato (ISF), que é a razão do diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia (BERRAQUERO et al., 1976).

Como controle positivo, foi utilizado o isolado UFRGS-VP16, já testado como solubilizador de fosfato, e como controle negativo o isolado UFRGS-VP5 que não apresenta a capacidade de solubilizar fosfato, ambos da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (ALVES, 2005).

#### **4.4 Teste da atividade da tirosinase**

A atividade da enzima tirosinase, também conhecida como capacidade de produção de melanina, foi avaliada conforme metodologia de Cubo et al. (1988).

Cada isolado foi inoculado em um frasco contendo 15 mL meio triptonalevedura (TY) (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994), os quais mantidos sob agitação constante a 120 rpm, a 28°C, durante 5 dias. Foi realizada a inoculação das culturas em placas de petri contendo o meio TY sólido, suplementado com L-tirosina (600 µg.mL<sup>-1</sup>) e sulfato de cobre (40 µg.mL<sup>-1</sup>), utilizando-se alíquotas de 20 µL do caldo e, após, as placas foram incubadas durante sete dias, a 28°C. Após esse período, as colônias foram tratadas com 50 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% (peso/volume) em tampão TBE (107,81 g.L<sup>-1</sup> de tris, 55 g.L<sup>-1</sup> de ácido bórico e 5,8 g.L<sup>-1</sup> de EDTA) para facilitar a detecção da produção de melanina (pigmento de cor escura). Como controle positivo foi utilizado o isolado UFRGS-LG111, conhecido como produtor de melanina (FONTOURA, 2007) e controle negativo o isolado

UFRGS-Lu14 (MARTINS, 2010), ambos da coleção de cultura do laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS. Para esse ensaio foram realizadas duas repetições por isolado.

#### **4.5 Produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético (AIA)**

Os isolados foram avaliados quanto a capacidade de produzir ácido indol-acético, conforme metodologia descrita por Asghar et al. (2002), adaptada.

Para isso, cada um dos isolados foi crescido em dois frascos de Erlenmeyer: um contendo 20 mL de meio de cultura líquido LM e outro contendo 20 mL de meio de cultura líquido LM com adição de 50 mg.L<sup>-1</sup> de triptofano (precursor do AIA), todos em triplicata. Posteriormente, os frascos foram incubados a 28°C, sob agitação de 120 rpm por 5 dias.

Após o período de incubação, 2 mL do caldo foi transferido para tubos do tipo eppendorf e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos, de onde foi retirada uma alíquota de 1,5 mL do sobrenadante, no qual foi adicionado 1 mL de solução de Salkowski (2 mL de FeCl<sub>3</sub> + 98 ml de HClO<sub>4</sub> 35%) e mantidas por 30 minutos sob ausência de luz, tempo necessário para que ocorra a reação de oxidação. A quantificação foi feita utilizando-se espectrofotômetro, sob um comprimento de onda de 550 nm.

A concentração de AIA das amostras foi calculada comparando-se as leituras das amostras, com uma curva padrão produzida com concentrações conhecidas de AIA sintético. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Scott-Knott, 5%).

#### **4.6 Avaliação da eficiência dos isolados na fixação simbiótica de nitrogênio em pega-pega (*Desmodium incanum*)**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre/RS. Foram utilizados vasos "Leonard" (VINCENT, 1970) contendo uma mistura composta por vermiculita e areia na proporção de 2:1, no compartimento superior e solução

nutritiva (SARRUGE, 1975) sem adição de nitrogênio no compartimento inferior. Os vasos foram previamente esterilizados em autoclave durante duas horas a 120°C. Em cada vaso foram semeadas quatro sementes de pega-pega, escarificadas, desinfestadas e pré-germinadas, conforme descrito no item 4.1.1.

A inoculação com os isolados, foi realizada utilizando-se uma alíquota de 2 mL do inóculo por vaso, em uma concentração média de  $1,77 \cdot 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>. O inóculo constitui-se de uma suspensão contendo o isolado e solução salina (NaCl 0,85%) .

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições por tratamento. Além dos tratamentos inoculados, também foram conduzidos dois tratamentos controles, um sem adição de nitrogênio e outro com adição de nitrogênio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) via solução nutritiva, equivalente à 100 Kg.ha<sup>-1</sup>, conforme recomendação para a cultura (SBCS, 2004). A solução nutritiva foi renovada semanalmente durante todo o experimento.

Na colheita, a parte aérea da planta foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel e secos em estufa a 65°C com ventilação forçada durante três dias. As raízes foram levadas ao laboratório onde os nódulos radiculares foram destacados, contados e colocados em estufa a 65°C durante três dias para secagem. As avaliações realizadas foram: a produção de matéria seca da parte aérea, a massa seca da raiz, o número de nódulos e a massa de nódulos secos. Também foi calculado o índice de eficiência relativa, adaptado de Brockwell et al. (1966), que expressa a capacidade dos isolados em promover o acúmulo de massa seca total, em comparação com os tratamentos controle.

$$\text{IER (\%)} = \frac{(\text{MS inoculado} - \text{MS controle sem N})}{(\text{MS controle com N} - \text{MS controle sem N})} \cdot 100$$

Onde:

IER (%) = índice de eficiência relativa;

MS inoculado = massa seca total do tratamento inoculado;

MS controle sem N = massa seca total do controle sem adição de nitrogênio;

MS controle com N = massa seca total do controle com adição de nitrogênio.

#### **4.7 Efeito da inoculação de rizóbios na germinação de sementes de arroz (*Oriza sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*)**

Para avaliação do efeito da inoculação dos isolados de rizóbio sob a germinação de arroz (*Oriza sativa*) cultivar IRGA-424 e trigo (*Triticum aestivum*) cultivar BRS-parrudo, foram realizados testes de germinação em placas de petri.

O inóculo foi preparado em frascos de vidro, contendo 15 mL meio de cultura LM líquido, incubado por cinco dias em incubador orbital, a 28°C.

As sementes foram desinfestadas e colocadas em placas de petri com papel filtro previamente esterilizados. Foram realizadas quatro repetições com 30 sementes por repetição (considerando cada placa, uma das quatro repetições). Cada placa recebeu 3 mL de água destilada esterilizada, e foi inoculado 1 mL do inóculo, com concentração média de  $8,9 \cdot 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Para avaliação da germinação, foram utilizados como parâmetros a percentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG%), calculado pela soma do número de sementes germinadas a cada dia e dividido pelo respectivo número de dias transcorridos a partir da germinação, conforme Maguire (1962).

Além dos tratamentos com os isolados, foram conduzidos também dois tratamentos controle: um com adição de 1 mL meio de cultura LM não inoculado e outro somente com a adição de água destilada estéril.

#### **4.8 Avaliação da interação dos rizóbios com plântulas de trigo (*Triticum aestivum*) e arroz (*Oriza sativa*) *in vitro***

A interação entre os rizóbios e as plantas foi avaliada pela inoculação dos rizóbios estudados em plântulas de trigo e arroz. Para isto, as sementes foram desinfestadas segundo a metodologia já descrita e pré-germinadas em papel filtro, com água esterilizada em temperatura ambiente. Em seguida, as plântulas foram colocadas em tubos de ensaio de 25 cm de comprimento e 2,4 cm de diâmetro, contendo solução nutritiva (SARRUGE, 1975) e uma tira de papel absorvente para a fixação da planta. Em cada tubo, foi inoculado 1 mL de inóculo contendo  $7,5 \cdot 10^9$  UFC.ml<sup>-1</sup>, que foi produzindo em caldo LM contendo o isolado a ser avaliado,

incubado por cinco dias a 28°C sob agitação de 120 rpm. Foram adicionados a todos os tratamentos o equivalente a 50% da recomendação da dose de nitrogênio para a cultura (sendo a recomendação total de 120 Kg.ha<sup>-1</sup> para as duas culturas), além de dois tratamentos controle sem inoculação, um com 100% e outro com 50% da dose recomendada de nitrogênio para a cultura. Os tubos foram colocados em um lampadário com fotoperíodo de 12 horas a temperatura ambiente. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

O desenvolvimento das plantas foi acompanhado por um período 12 dias. Após, as plântulas foram retiradas dos tubos e foi determinado o comprimento da raiz e da parte aérea.

#### **4.9 Avaliação da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento de milho (*Zea mays*) e aveia (*Avena sativa*) em casa de vegetação**

Foi realizado um experimento em casa de vegetação utilizando vasos plásticos (3,6 L) contendo uma mistura de vermiculita e areia estéril (na proporção 2:1).

As sementes de milho (*Zea mays*, híbrido AG-9025 PRO3) e aveia-branca (*Avena sativa*) foram desinfestadas, pré-germinadas e plantadas nos vasos. As plantas foram inoculadas com 5 mL de inóculo na concentração média de 2,7.10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, produzido em caldo LM, incubado por cinco dias, a 28°C, sob agitação de 120 rpm. Todos os tratamentos receberam 50% da dose de nitrogênio recomendada para cada cultura (recomendação: 120 Kg.ha<sup>-1</sup> para o milho e 150 Kg.ha<sup>-1</sup> para a aveia). Além dos tratamentos inoculados foram utilizados dois tratamentos controles, um com adição de 50% da dose de nitrogênio e outro com adição de 100% da dose, sendo aplicado via solução de nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), divididos em duas doses semanais ao longo do experimento. A fertilização foi realizada via solução nutritiva (SARRUGE, 1975) sem nitrogênio, esterilizada, diluída a 25% sendo aplicada uma vez ao dia.

O experimento foi conduzido por um período de 45 dias em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Antes da colheita, as plantas de aveia passaram por avaliação do teor de clorofila, que foi determinado com o auxílio de um clorofilômetro digital da marca Minolta, modelo SPAD 502, com medições

padronizadas, no terço superior da última folha totalmente formada.

Após a colheita das plantas, a parte aérea das mesmas foi separada do sistema radicular com corte próximo a base do caule. As raízes foram lavadas com água estéril e foi avaliado o volume radicular das plantas de milho pelo método da proveta, onde se acrescentou um volume conhecido de água, foi feita a imersão da raiz, e verificado o deslocamento de água. O comprimento da parte aérea das duas culturas foi determinado e as amostras foram acondicionadas em sacos de papel etiquetados e colocados em estufa para secagem a 60°C até que o peso se tornasse constante.

A massa seca da parte aérea e de raízes foi determinada após secagem em estufa. O teor de nitrogênio total na parte aérea foi determinado pela metodologia semi micro Kjeldhal e teor de fósforo total por colorimetria, ambos descritos por Tedesco et al. (1995).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa estatístico Assistat 7.7 (SILVA, 2015), e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Também foi calculado o índice de eficiência relativa, adaptado de Brockwell et al. (1966), onde se expressa a capacidade dos isolados em promover o acúmulo de massa seca total, em comparação com os tratamentos controle.

$$\text{IER (\%)} = \frac{(\text{MS inoculado} - \text{MS controle sem N})}{(\text{MS controle com N} - \text{MS controle sem N})} \cdot 100$$

Onde:

IER (%) = índice de eficiência relativa;

MS inoculado = massa seca total do tratamento inoculado;

MS controle sem N = massa seca total do controle sem adição de nitrogênio;

MS controle com N = massa seca total do controle com adição de nitrogênio;

Devido ao grande número de variáveis envolvidas, foi realizada uma análise de componentes principais, para melhor visualização do efeito dos tratamentos sobre as variáveis e também a correlação entre elas. Para isso, utilizou-se como ferramenta o programa Past3 (HAMMER et al., 2015).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização morfológica e autenticação

Foram obtidos 26 isolados bacterianos dos nódulos radiculares de *D. incanum*, dos quais, 18 apresentaram capacidade de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em plantas de *D. incanum* e foram caracterizados quanto à morfologia colonial (tabela 1). Todos os rizóbios apresentaram bordo liso, forma circular, elevação convexa e superfície brilhosa, características comuns em colônias microbianas de rizóbios.

**Tabela 1** - Morfologia colonial de rizóbios isolados de nódulos radiculares de plantas de *D. incanum* coletadas na Estação Experimental Agronômica da UFRGS

Rizóbio	Tamanho da colônia (mm)		Densidade ótica	Viscosidade	pH do meio	
	7 dias	10 dias			7 dias	10 dias
Dinc1	1,5	3	Translúcida	Gomosa	neutro	neutro
Dinc2	1	5	Translúcida	Gomosa	alcalino	alcalino
Dinc3	0,5	3	Translúcida	Gomosa	alcalino	alcalino
Dinc4	1	5	Translúcida	Gomosa	ácido	ácido
Dinc5	0,5	3,5	Translúcida	Gomosa	ácido	ácido
Dinc6	2	6	Translúcida	Gomosa	ácido	ácido
Dinc7	0,5	2	Translúcida	Gomosa	alcalino	alcalino
Dinc8	0,5	2	Translúcida	Gomosa	neutro	neutro
Dinc9	1	4	Translúcida	Gomosa	alcalino	alcalino
Dinc10	2	4	Translúcida	Gomosa	neutro	alcalino
Dinc11	1	5	Translúcida	Gomosa	neutro	ácido
Dinc12	1,5	6	Translúcida	Gomosa	neutro	ácido
Dinc13	1	5	Translúcida	Gomosa	neutro	neutro
Dinc14	1	5	Translúcida	Butirosa	alcalino	alcalino
Dinc15	1	3	Opaca	Viscosa	ácido	ácido
Dinc16	0,5	1	Opaca	Viscosa	alcalino	alcalino
Dinc17	1	3	Translúcida	Gomosa	neutro	alcalino
Dinc18	1	4	Opaca	Viscosa	neutro	Neutro

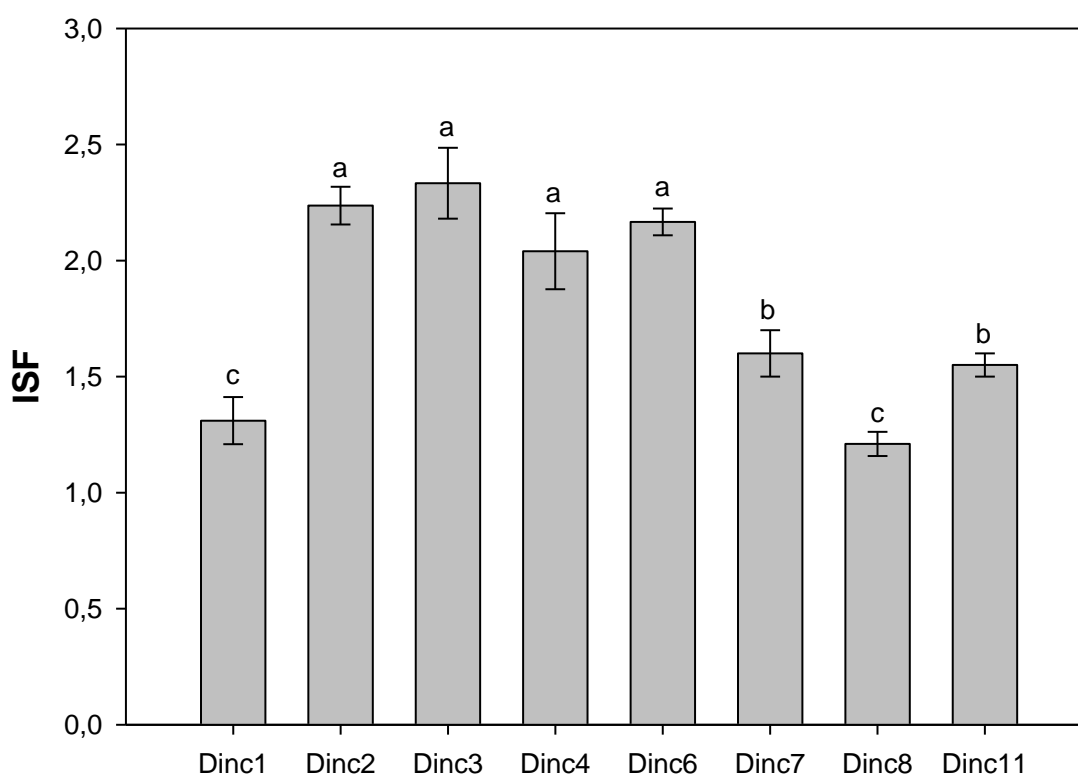
### 5.2 Capacidade de solubilização de fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )

A capacidade para solubilização de fosfato tricálcico foi observada em oito dos dezoito rizóbios (Dinc1, Dinc2, Dinc3, Dinc4, Dinc6, Dinc7, Dinc8 e Dinc11) e



também no isolado UFRGS-VP16 (*Burkholderia* sp.), utilizado como controle por já ter demonstrado possuir esta capacidade no trabalho de Alves (2005). Os valores do índice de solubilização de fosfato variaram de 1,21 a 2,33 (figura 1). Os halos de solubilização apresentaram variação quanto ao tempo de aparecimento, sendo que nos rizóbios Dinc2, Dinc3, Dinc4 e Dinc11, foi possível visualizar os halos no quarto dia, já nos rizóbios Dinc1, Dinc6, Dinc7, Dinc8, os halos apareceram somente após o sétimo dia.

Quanto à eficiência, os rizóbios Dinc2, Dinc3, Dinc4 e Dinc6, se destacaram em relação aos demais, apresentando potencial como promotores de crescimento de plantas pelo mecanismo de solubilização de fosfato.



**Figura 1** – Médias do índice de solubilização de fosfato (ISF) dos isolados em placa com meio de cultura sólido. Médias (3 repetições) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de comparação de médias Scott-Knott, ao nível de 1% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão.

Islam et al. (2007), relacionaram o tamanho do halo de solubilização à quantidade de fosfato solubilizado por rizobactérias isoladas em plantas de arroz, e mostraram que bactérias com índice de solubilização de fosfato entre 1,2 e 2,5, podem solubilizar de 2 a 132  $\mu\text{g/ml}$  de fosfato tricálcico em meio de cultura líquido.

Alguns trabalhos têm mostrado o efeito positivo da inoculação de plantas com bactérias solubilizadoras de fosfato em cultivos agrícolas, como Chabot et al. (1998), que observaram um incremento no rendimento da matéria seca do milho, assim como Mikanova & Kubát (1999) e Piex et al. (2001) verificaram aumento na produtividade de soja, cevada e grão-de-bico, respectivamente, quando inoculados com rizóbios solubilizadores de fosfato de cálcio. Yazdani et al. (2009), em um experimento com milho, utilizando o consórcio de bactérias solubilizadoras de fosfato com outras bactérias promotoras de crescimento, verificou que pode-se reduzir em até 50% a aplicação de adubos fosfatados no milho sem qualquer redução significativa na produção de grãos.

### **5.3 Teste da atividade da tirosinase**

Quanto à atividade da enzima tirosinase (produção de melanina), nenhum dos rizóbios apresentou resultado, além do controle positivo. Giongo (2003) e Martins (2010) também observaram tal característica em isolados de feijão e cornichão, respectivamente.

### **5.4 Produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético (AIA)**

Os rizóbios foram testados quanto à produção de ácido indol-acético em meio de cultura líquido LM com e sem a adição de triptofano ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Em meio de cultura LM sem adição de triptofano, os rizóbios Dinc1, Dinc4, Dinc6, Dinc9, Dinc10, Dinc11, Dinc12, Dinc15, Dinc16 e Dinc18 foram capazes de produzir AIA. Quando testados em meio de cultura com adição de triptofano, além desses rizóbios, os rizóbios Dinc8, Dinc13, Dinc14 e Dinc17 produziram AIA (tabela 2). Somente os rizóbios Dinc2, Dinc3, Dinc5 e Dinc7 não foram capazes de produzir ácido indol-acético tanto da ausência, quanto na presença de triptofano.

Em termos de quantidade, os valores de AIA variaram de  $0,12$  a  $7,67 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$  no meio de cultura sem adição de triptofano e de  $0,90$  a  $62,3 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$  no meio de cultura com adição de triptofano. Segundo Biswas et al. (2000), o AIA pode estimular o crescimento de plantas em uma determinada faixa de concentração, podendo

ocasionar efeito deletério a partir de uma determinada concentração, que pode variar de acordo com a cultura. Schindwein et al. (2008), verificaram que a inoculação de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de acácia-negra que produziam de 1,2 a 3,3  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  em meio de cultura, aumentaram significativamente o vigor em plântulas de alface, enquanto a estirpe *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TV-13, que produziu 171,1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA em meio de cultura, causou efeito negativo na germinação das sementes de alface.

**Tabela 2** – Médias seguidas do desvio padrão da quantificação por colorimetria da produção de ácido indol-acético (AIA) em meio de cultura LM, sem e com adição de triptofano (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) por rizóbios de *D. incanum*

Rizóbios	AIA $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	
	AIA sem Triptofano	AIA com Triptofano
Dinc1	0,12 $\pm$ 0,07 g**	0,92 $\pm$ 0,16 g**
Dinc2	-	-
Dinc3	-	-
Dinc4	0,80 $\pm$ 0,11 e	0,90 $\pm$ 0,06 g
Dinc5	-	-
Dinc6	3,50 $\pm$ 0,38 c	1,06 $\pm$ 0,16 g
Dinc7	-	-
Dinc8	-	46,66 $\pm$ 1,30 b
Dinc9	3,04 $\pm$ 0,34 c	11,72 $\pm$ 0,86 e
Dinc10	2,31 $\pm$ 0,48 d	6,94 $\pm$ 0,67 f
Dinc11	3,09 $\pm$ 0,27 c	6,18 $\pm$ 1,45 f
Dinc12	5,54 $\pm$ 0,52 b	62,30 $\pm$ 0,98 a
Dinc13	-	6,66 $\pm$ 1,39 f
Dinc14	-	5,18 $\pm$ 0,59 f
Dinc15	2,40 $\pm$ 0,15 d	5,08 $\pm$ 0,88 f
Dinc16	0,53 $\pm$ 0,19 f	19,05 $\pm$ 1,69 c
Dinc17	-	6,94 $\pm$ 0,48 f
Dinc18	7,67 $\pm$ 0,38 a	15,73 $\pm$ 1,55 d
CV (%)	6,62	7,33

\*\*= 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

### 5.5 Avaliação da eficiência dos isolados na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de *D. incanum* cultivadas em casa de vegetação

A eficiência simbiótica dos rizóbios estudados foi avaliada em experimento em casa de vegetação com plantas de *D. incanum* cultivadas em condições assépticas

em vasos Leonard, sendo avaliados: a massa seca da parte aérea, a massa seca da raiz, a massa seca dos nódulos, o número de nódulos e o índice de eficiência relativa (tabela 3). O teor de nitrogênio na parte aérea das plantas não foi avaliado, pois não se obteve a massa seca mínima para a realização da análise, sendo que tal característica também foi observada por Granada (2010), com plantas conduzidas por 60 dias em casa de vegetação.

A nodulação média variou de 1,75 a 24 nódulos por planta. Esses valores são semelhantes os observados por Granada (2010), que em um estudo de eficiência simbiótica com *D. incanum*, obteve nodulação média que variou de 4,75 a 30 nódulos por planta.

**Tabela 3** – Médias seguidas do desvio padrão da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca dos nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e índice de eficiência relativa (IER) em relação aos tratamentos controle dos isolados de *D. incanum*

Tratamentos	MSPA	MSR	MSN	NN	IER
		MG			%
<b>Controle+N</b>	44,4 ± 5,7 b**	36,6 ± 8,7 b	-	-	100
<b>Dinc1</b>	59,3 ± 28,6 b	51,6 ± 22,8 b	4,6 ± 3,6 a	17,2 ± 5,7 a	147,5
<b>Dinc2</b>	16,5 ± 1,6 c	14,3 ± 2,8 c	1,9 ± 0,5 b	7,5 ± 2,4 c	19,7
<b>Dinc3</b>	36,2 ± 15,1 c	34,1 ± 12,4 b	3,8 ± 1,0 a	9,5 ± 5,9 b	82,6
<b>Dinc4</b>	113,2 ± 32,8 a	86,8 ± 27,2 a	4,7 ± 1,9 a	10,0 ± 3,4 b	289,6
<b>Dinc5</b>	97,4 ± 15,5 a	64,9 ± 13,7 a	1,7 ± 2,3 c	4,0 ± 6,7 d	229,6
<b>Dinc6</b>	26,9 ± 8,3 c	22,3 ± 11,8 c	2,0 ± 1,1 b	7,0 ± 4,4 c	49,1
<b>Dinc7</b>	4,1 ± 2,6 d	3,9 ± 1,8 d	0,3 ± 0,4 c	1,7 ± 0,9 d	-16,6
<b>Dinc8</b>	30,1 ± 6,7 c	18,0 ± 0,8 c	2,4 ± 0,8 b	5,5 ± 3,3 c	47,4
<b>Dinc9</b>	23,6 ± 10,0 c	15,5 ± 5,3 c	2,7 ± 1,4 b	14,7 ± 10,3 b	32,9
<b>Dinc10</b>	78,6 ± 28,0 a	61,3 ± 17,7 a	5,0 ± 2,8 a	10,7 ± 3,8 b	193,7
<b>Dinc11</b>	10,7 ± 5,2 d	8,7 ± 4,8 d	1,8 ± 1,0 b	5,0 ± 3,8 c	1,6
<b>Dinc12</b>	21,0 ± 11,3 c	16,1 ± 7,8 c	0,5 ± 0,3 c	2,2 ± 1,9 d	29,8
<b>Dinc13</b>	54,9 ± 19,0 b	43,2 ± 14,2 b	4,9 ± 0,7 a	10,2 ± 5,0 b	127,0
<b>Dinc14</b>	56,6 ± 21,5 b	42,6 ± 19,4 b	4,3 ± 1,8 a	8,7 ± 3,9 b	128,9
<b>Dinc15</b>	47,5 ± 15,5 b	39,8 ± 13,6 b	6,8 ± 2,1 a	24,0 ± 7,5 a	109,9
<b>Dinc16</b>	39,0 ± 12,1 b	37,2 ± 8,8 c	2,4 ± 1,4 b	7,7 ± 4,9 c	92,1
<b>Dinc17</b>	17,3 ± 1,3 c	16,1 ± 4,2 c	0,3 ± 0,1 c	1,7 ± 0,9 d	23,9
<b>Dinc18</b>	52,7 ± 18,9 b	41,6 ± 25,9 b	5,8 ± 2,9 a	22,2 ± 9,2 a	121,1
<b>Controle-N</b>	7,3 ± 5,3 d	11,2 ± 4,3 d	-	-	0
<b>CV (%)</b>	18,59	20,25	28,93	29,86	-

\*\* = médias (4 repetições) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (1%), CV= coeficiente de variação

Em relação ao índice de eficiência relativa, que relaciona o acúmulo de massa seca total em relação aos tratamentos controle, 44,4% dos isolados, sendo os

rizóbios Dinc1, Dinc4, Dinc5, Dinc10, Dinc13, Dinc14, Dinc15 e Dinc18, apresentaram valores superiores a 100%, que refere-se ao tratamento controle com adição de nitrogênio, indicando-os como eficientes da fixação simbiótica de nitrogênio. Os demais isolados tiveram desempenho inferior, mas foram superiores ao controle negativo (sem adição de nitrogênio), com exceção do rizóbio Dinc7, que apresentou índice inferior ao controle negativo, o que indica que provavelmente, este rizóbio perdeu a capacidade de fixar nitrogênio.

### 5.6 Efeito sobre a germinação de sementes de arroz e trigo

O efeito da inoculação de isolados de *D. incanum* na germinação de sementes de trigo e arroz após sete dias, não foi significativo quanto ao percentual total de germinação (tabela 4).

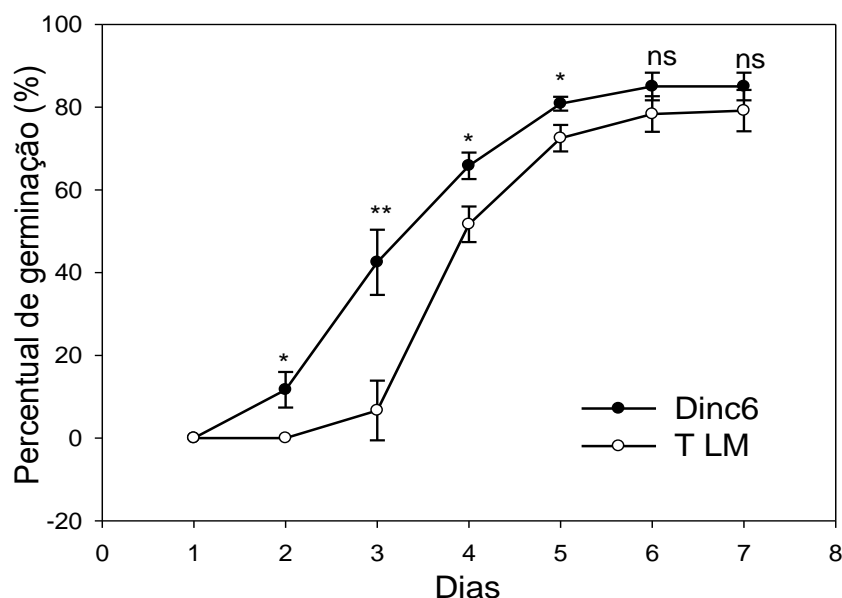
**Tabela 4** – Médias seguidas do desvio padrão do índice de velocidade de germinação (IVG) e do percentual total de germinação ao final de sete dias em sementes de trigo e arroz

Tratamento	Trigo		Arroz	
	IVG	Percentual total (%)	IVG	Percentual total (%)
Dinc1	13,18 ± 0,4 <sup>ns</sup>	96,67 ± 3,2 <sup>ns</sup>	6,05 ± 0,3 b**	85,00 ± 3,3 <sup>ns</sup>
Dinc2	13,80 ± 0,6	98,33 ± 1,9	6,59 ± 0,6 b	89,17 ± 5,7
Dinc3	12,80 ± 0,4	97,50 ± 3,8	6,30 ± 0,5 b	85,00 ± 1,9
Dinc4	12,78 ± 0,9	97,50 ± 3,2	7,21 ± 0,4 a	88,33 ± 1,9
Dinc6	12,91 ± 0,4	95,83 ± 1,7	7,69 ± 0,5 a	85,00 ± 3,3
Dinc7	13,18 ± 0,3	98,33 ± 1,9	7,55 ± 0,5 a	90,83 ± 5,7
Dinc8	12,73 ± 0,6	96,67 ± 4,2	7,73 ± 0,5 a	94,17 ± 3,2
Dinc9	13,60 ± 0,6	99,17 ± 1,9	6,56 ± 0,5 b	83,33 ± 6,1
Dinc10	12,69 ± 0,3	95,83 ± 3,2	5,97 ± 0,5 b	82,50 ± 7,9
Dinc11	12,97 ± 0,4	96,67 ± 2,7	6,34 ± 0,6 b	88,33 ± 7,4
Dinc12	13,32 ± 0,4	97,50 ± 3,2	6,28 ± 0,4 b	87,50 ± 5,7
Dinc13	13,00 ± 0,5	95,83 ± 3,2	6,49 ± 0,5 b	89,17 ± 5,7
Dinc14	13,86 ± 0,4	99,17 ± 1,7	6,33 ± 0,6 b	87,50 ± 7,4
Dinc15	13,24 ± 0,7	96,67 ± 4,7	6,53 ± 1,1 b	80,83 ± 11,0
Dinc16	12,92 ± 0,9	95,00 ± 4,3	8,13 ± 0,4 a	92,50 ± 3,2
Dinc17	13,34 ± 0,8	96,67 ± 2,7	6,18 ± 0,5 b	87,50 ± 6,3
Dinc18	13,03 ± 0,7	95,00 ± 4,3	6,02 ± 0,6 b	83,33 ± 7,9
T água	13,62 ± 0,6	98,33 ± 3,3	5,77 ± 0,5 b	82,50 ± 6,9
T LM	12,98 ± 0,3	98,33 ± 2,7	5,62 ± 0,2 b	79,17 ± 5,0
<b>CV (%)</b>	4,42	3,22	4,02	6,86

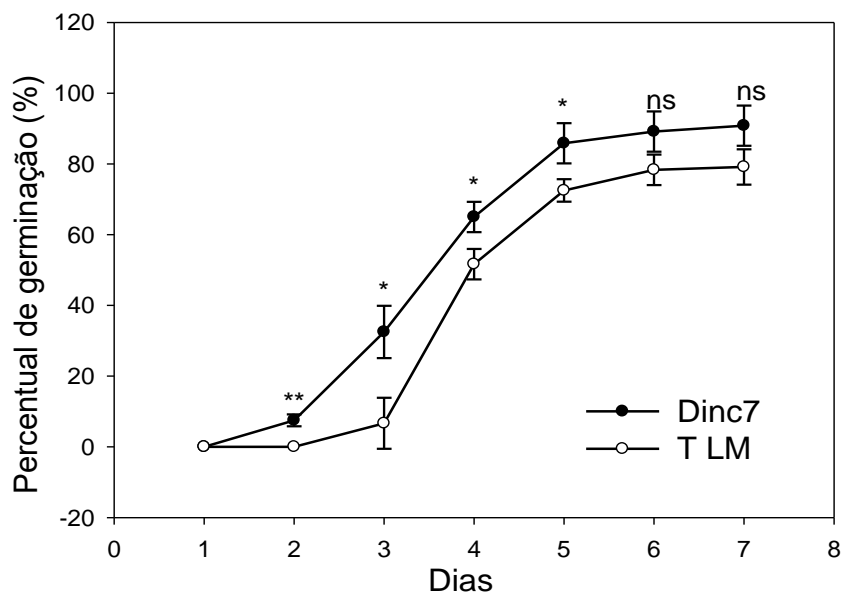
\*\* = médias (4 repetições) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (1%), ns= não significativo pelo teste de Scott-Knott, CV= coeficiente de variação

Quanto ao índice de velocidade de germinação (IVG), o efeito da inoculação foi significativo somente nas sementes de arroz, em que alguns tratamentos apresentaram um aumento no percentual de germinação nos três primeiros dias em relação aos tratamentos controle (água e meio de cultura LM).

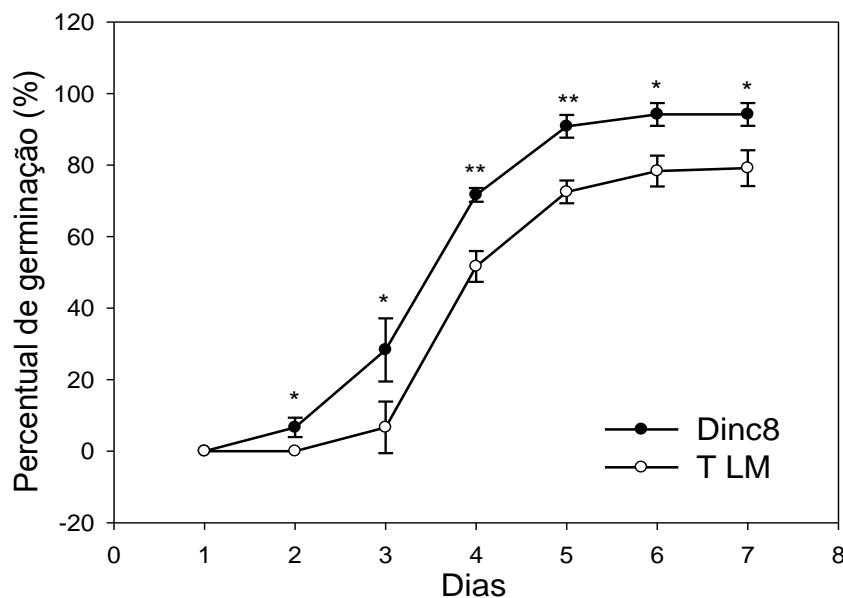
Os tratamentos que apresentaram melhor desempenho nos três primeiros dias quanto a velocidade de germinação de sementes de arroz, foram comparados isoladamente com o tratamento controle LM, a partir do teste t, com o auxílio do programa Past (HAMMER et al., 2015), conforme apresentado na figura 2 (rizóbio Dinc6 x controle LM), na figura 3 (rizóbio Dinc7 x controle LM), na figura 4 (rizóbio Dinc8 x controle LM) e na figura 5 (rizóbio Dinc16 x controle LM). Quando comparados com o tratamento controle LM, os quatro apresentaram efeito significativamente superior, nos cinco primeiros dias, sendo que o rizóbio Dinc6 apresentou um aumento no percentual de germinação oito vezes maior que o tratamento controle LM no terceiro dia de teste (figura 2). Osorio Filho et al., (2014), utilizando rizóbios como promotores de germinação em sementes de arroz do mesmo cultivar (IRGA-424), também observaram um aumento na velocidade de germinação em relação ao tratamento controle não inoculado.



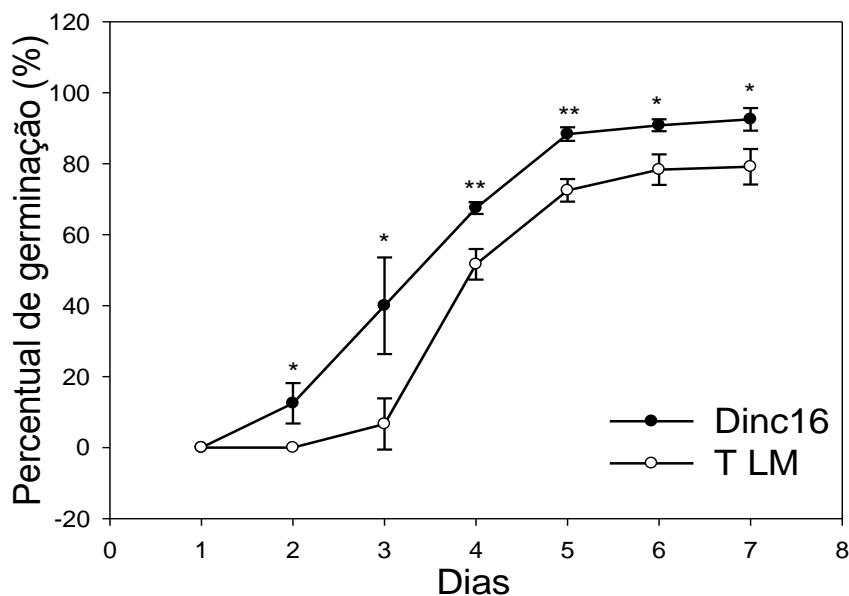
**Figura 2** – Percentual acumulado de germinação de sementes de arroz inoculadas com o rizóbio Dinc6 de *D. incanum*, em comparação com o tratamento controle com LM (caldo levedura-manitol). Teste t, onde \*= significativo a 5%, \*\*= significativo a 1%, ns= não significativo. As barras de erro representam o desvio padrão.



**Figura 3** – Percentual acumulado de germinação de sementes de arroz inoculadas com o rizóbio Dinc7 de *D. incanum*, em comparação com o tratamento controle com LM (caldo levedura-manitol). Teste t, onde \*= significativo a 5%, \*\*= significativo a 1%, ns= não significativo. As barras de erro representam o desvio padrão.



**Figura 4** – Percentual acumulado de germinação de sementes de arroz inoculadas com o rizóbio Dinc8 de *D. incanum*, em comparação com o tratamento controle com LM (caldo levedura-manitol). Teste t, onde \*= significativo a 5%, \*\*= significativo a 1%. As barras de erro representam o desvio padrão.



**Figura 5** – Percentual acumulado de germinação de sementes de arroz inoculadas com o rizóbio Dinc16 de *D. incanum*, em comparação com o tratamento controle com LM (caldo levedura-manitol). Teste t, onde \*= significativo a 5%, \*\*= significativo a 1%. As barras de erro representam o desvio padrão.

### 5.7 Avaliação da interação dos rizóbios com arroz e trigo *in vitro*

No estudo de interação em tubos com arroz e trigo, pode-se observar que no arroz, apenas a parte aérea apresentou uma diferença significativa entre os tratamentos, já no trigo, a interação ocorreu somente na raiz (tabela 5).

No arroz, quando comparados com os tratamentos controle, pode-se observar que os tratamentos Dinc1, Dinc3, Dinc4, Dinc6, Dinc9, Dinc11, Dinc12, Dinc15, Dinc16 apresentaram desenvolvimento estatisticamente igual ao tratamento controle com adição de 100% da dose de nitrogênio no comprimento da parte aérea. Osorio Filho et al., (2014), em experimento em casa de vegetação, observaram um incremento em massa seca de arroz da cultivar IRGA-424, tanto na parte aérea quanto na raiz, em relação ao tratamento sem inoculação, indicando que possivelmente, em testes prolongados os rizóbios do presente estudo podem apresentar efeito no desenvolvimento das raízes.



**Tabela 5** – Médias seguidas do desvio padrão do comprimento da parte aérea e da raiz de arroz e trigo em tubos de ensaio, inoculados com rizóbios isolados de *D. incanum*

Tratamentos	Arroz		Trigo	
	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz
	cm			
<b>Controle + N</b>	20,1 ± 2,3 a*	12,8 ± 5,3 <sup>ns</sup>	18,7 ± 0,9 <sup>ns</sup>	20,2 ± 1,7 a**
<b>Dinc1</b>	19,4 ± 1,1 a	12,9 ± 1,0	19,3 ± 3,1	18,3 ± 3,7 a
<b>Dinc2</b>	15,7 ± 4,4 b	10,1 ± 3,2	20,1 ± 1,7	15,3 ± 1,4 b
<b>Dinc3</b>	19,7 ± 0,3 a	15,0 ± 0,5	19,9 ± 1,9	15,5 ± 1,5 b
<b>Dinc4</b>	23,0 ± 4,9 a	11,4 ± 1,7	17,5 ± 2,6	15,4 ± 0,1 b
<b>Dinc6</b>	21,9 ± 4,3 a	9,8 ± 1,5	19,2 ± 1,6	15,9 ± 1,4 b
<b>Dinc7</b>	15,1 ± 6,5 b	10,0 ± 3,5	18,9 ± 0,9	16,2 ± 0,7 b
<b>Dinc8</b>	14,8 ± 5,8 b	10,4 ± 3,6	16,6 ± 1,8	14,7 ± 2,4 b
<b>Dinc9</b>	19,2 ± 3,8 a	9,5 ± 2,6	17,8 ± 2,3	12,8 ± 2,8 b
<b>Dinc10</b>	17,1 ± 3,4 b	9,1 ± 4,4	19,7 ± 2,4	14,5 ± 2,7 b
<b>Dinc11</b>	18,2 ± 4,4 a	12,9 ± 3,7	19,0 ± 1,1	18,1 ± 1,5 a
<b>Dinc12</b>	17,9 ± 2,9 a	12,0 ± 5,1	20,3 ± 2,5	16,1 ± 1,2 b
<b>Dinc13</b>	13,6 ± 3,0 b	9,8 ± 4,0	18,6 ± 3,8	16,9 ± 3,2 a
<b>Dinc14</b>	15,8 ± 3,1 b	11,1 ± 1,3	20,6 ± 1,6	13,2 ± 1,8 b
<b>Dinc15</b>	18,9 ± 1,1 a	12,6 ± 1,1	17,5 ± 1,5	13,5 ± 0,6 b
<b>Dinc16</b>	18,2 ± 4,2 a	12,2 ± 2,0	19,6 ± 1,7	19,8 ± 1,3 a
<b>Dinc17</b>	15,9 ± 3,7 b	12,1 ± 2,1	19,3 ± 1,5	13,8 ± 0,9 b
<b>Controle N/2</b>	14,7 ± 3,7 b	11,6 ± 1,9	18,0 ± 2,3	16,3 ± 2,8 b
<b>CV (%)</b>	21,5	-	-	12,56

Controle + N equivalente a 120 Kg.ha<sup>-1</sup> de N e controle N/2 equivalente a 60 Kg.ha<sup>-1</sup> de N. \*= médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias Scott-Knott (5%), \*\*= médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias Scott-Knott (1%), ns= não significativo a 5%, CV= coeficiente de variação

Já no trigo, os rizóbios Dinc1, Dinc11, Dinc13 e Dinc16, apresentaram desempenho semelhante ao controle positivo, quando avaliados quanto ao comprimento da raiz.

Etesami et al. (2009) utilizando estirpes de rizóbio em plantas de trigo, observaram um incremento em massa seca da raiz, e um aumento na absorção de macronutrientes (N, P e K), conseqüente do aumento do sistema radicular.

## 5.8 Avaliação da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento de plantas de aveia em casa de vegetação

Os dados de produção de aveia em vasos, em casa de vegetação são apresentados na tabela 6. Os rizóbios Dinc1, Dinc2, Dinc3, Dinc4, Dinc9, Dinc13, Dinc16, Dinc18 apresentaram valores de massa seca da parte aérea, estatisticamente iguais ao tratamento controle com 100% da dose recomendada de nitrogênio, os demais isolados, apesar de apresentarem um incremento em massa menor, foram ainda superiores estatisticamente ao tratamento controle com metade da dose de nitrogênio.

**Tabela 6** – Médias seguidas do desvio padrão da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), índice de eficiência relativa (IER), de plantas de aveia em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de *D. incanum*

Tratamentos	MSPA	MSR	CPA	IER
	MG		cm	%
<b>Controle + N*</b>	495 ± 167 a**	178 ± 41 a**	46,5 ± 9,0 a**	100
<b>Dinc1</b>	389 ± 110 a	129 ± 31 b	45,3 ± 4,2 a	71,97
<b>Dinc2</b>	292 ± 54 a	72 ± 20 c	42,2 ± 6,4 a	44,12
<b>Dinc3</b>	364 ± 167 a	69 ± 25 c	44,6 ± 7,1 a	56,60
<b>Dinc4</b>	288 ± 18 a	73 ± 26 c	38,7 ± 2,7 b	43,58
<b>Dinc6</b>	261 ± 83 b	68 ± 23 c	36,9 ± 7,5 b	37,79
<b>Dinc7</b>	177 ± 21 b	65 ± 12 c	34,7 ± 3,4 b	22,06
<b>Dinc8</b>	177 ± 21 b	67 ± 5 c	36,5 ± 5,1 b	22,42
<b>Dinc9</b>	310 ± 117 <sup>a</sup>	91 ± 27 c	42,4 ± 5,8 a	50,81
<b>Dinc10</b>	209 ± 41 b	38 ± 11 c	33,6 ± 1,2 b	22,97
<b>Dinc11</b>	236 ± 9 b	68 ± 5 c	35,9 ± 3,1 b	33,27
<b>Dinc12</b>	274 ± 138 b	86 ± 31 c	43,7 ± 2,5 a	43,40
<b>Dinc13</b>	338 ± 111 a	78 ± 17 c	45,9 ± 5,3 a	53,53
<b>Dinc14</b>	223 ± 50 b	68 ± 15 c	37,8 ± 4,9 b	30,92
<b>Dinc15</b>	242 ± 45 b	68 ± 20 c	37,6 ± 2,5 b	34,36
<b>Dinc16</b>	280 ± 50 a	88 ± 25 c	42,4 ± 1,1 a	44,85
<b>Dinc17</b>	264 ± 61 b	59 ± 16 c	41,4 ± 3,7 a	36,71
<b>Dinc18</b>	358 ± 81 a	74 ± 23 c	42,4 ± 1,0 a	56,42
<b>Controle N/2*</b>	87 ± 9 c	33 ± 8 c	26,0 ± 3,2 c	0
<b>CV (%)</b>	14,54	28,28	11,91	-

\*= Controle + N equivalente a 150 Kg.ha<sup>-1</sup> de N e controle N/2 equivalente a 75 Kg.ha<sup>-1</sup> de N, \*\*= médias (4 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

Stajkovic-Srbinovic et al. (2014), em um estudo de inoculação com bactérias promotoras de crescimento em plantas de aveia, em casa de vegetação, também observaram que a inoculação com rizóbio foi estatisticamente igual ao tratamento controle positivo, quanto ao acúmulo de massa seca da parte aérea, e superior aos tratamentos inoculados com outras bactérias.

Na massa seca da raiz, nenhum rizóbio apresentou desempenho em incremento de massa seca semelhante ao tratamento com a dose total de N, apenas o rizóbio Dinc1 foi significativamente superior ao tratamento controle com metade da dose de nitrogênio. Isso colaborou para que o índice de eficiência relativa apresentasse valores bastante inferiores, apesar disso, todos os rizóbios apresentaram uma eficiência relativa superior ao tratamento controle N/2.

Quanto ao comprimento da parte aérea, todos foram superiores ao controle N/2, com destaque para os rizóbios Dinc1, Dinc2, Dinc3, Dinc9, Dinc12, Dinc13, Dinc16, Dinc17 e Dinc18 que foram estatisticamente iguais ao tratamento controle com 100% da dose de nitrogênio.

Quando submetido ao teste de Skott-Knott, o teor de clorofila não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (tabela 7).

Quanto ao acúmulo de fósforo na parte aérea, o rizóbio Dinc3 se destacou em relação aos demais, apresentando resultado estatisticamente igual ao tratamento controle +N. Este mesmo isolado foi o que apresentou o maior índice de solubilização de fosfato em meio de cultura sólido (figura 1). Os rizóbios Dinc1, Dinc2, Dinc4, Dinc9, Dinc13, Dinc18, foram significativamente superiores ao tratamento controle N/2. Considerando que todos os tratamentos receberam a mesma quantidade de fosfato, via solução nutritiva, pode-se observar que a inoculação de rizóbios de *D. incanum*, promoveu uma maior absorção de fósforo nas plantas de aveia.

Em relação ao acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas de aveia, os rizóbios Dinc1, Dinc2, Dinc3, Dinc4, Dinc6, Dinc9, Dinc12, Dinc13, Dinc16, Dinc17 e Dinc18 apresentaram desempenho superior ao tratamento controle N/2, que recebeu a mesma dose de nitrogênio que os tratamentos inoculados, com acúmulo que variou de três a cinco vezes mais nitrogênio, indicando que os rizóbios auxiliam na absorção de nutrientes, apesar de não ser via fixação biológica de nitrogênio.

Stajkovic-Srbinovic et al. (2014), observaram que a inoculação de rizóbios em plantas de aveia teve efeito positivo na nutrição das mesmas, pois acúmulo de nitrogênio do tratamento inoculado com rizóbio, foi igual ao tratamento controle fertilizado e superior comparado com outras bactérias diazotróficas. Quando comparado o acúmulo de fósforo dos tratamentos, o inoculado com rizóbio foi o que apresentou uma concentração superior a todos os tratamentos, inclusive o controle positivo.

Além das variáveis obtidas em casa de vegetação, foram adicionadas também a análise de componentes principais, a produção de ácido indol-acético em caldo de cultura LM com e sem triptofano e a capacidade de solubilização de fosfato tricálcico em meio de cultura sólido (figura 6).

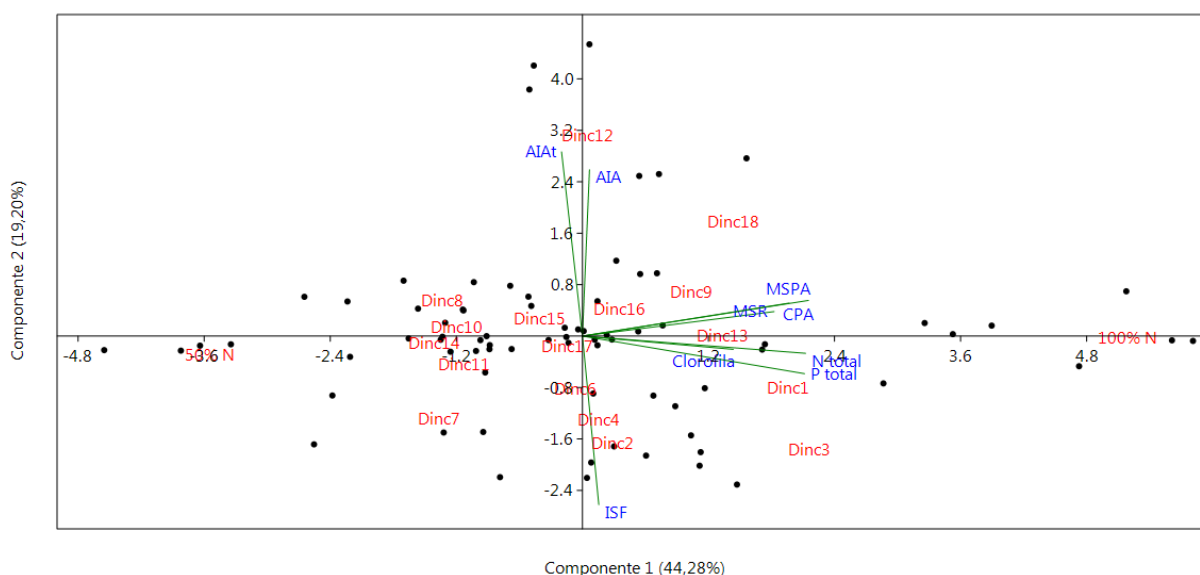
**Tabela 7** – Médias seguidas do desvio padrão do teor de clorofila, fósforo total da parte aérea (P total) e nitrogênio total da parte aérea (N total), de plantas de aveia em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de *D. incanum*

Tratamentos	Clorofila	P total		N total
		mg		
<b>Controle + N*</b>	45,92 ± 4,3 <sup>ns</sup>	0,963 ± 0,255 a**	12,2 ± 3,8 a**	
<b>Dinc1</b>	34,57 ± 4,6	0,623 ± 0,150 b	7,1 ± 1,6 b	
<b>Dinc2</b>	41,07 ± 3,6	0,524 ± 0,061 b	5,6 ± 0,8 b	
<b>Dinc3</b>	43,22 ± 7,0	0,830 ± 0,343 a	7,4 ± 2,9 b	
<b>Dinc4</b>	40,70 ± 2,7	0,612 ± 0,057 b	5,7 ± 0,2 b	
<b>Dinc6</b>	39,70 ± 3,2	0,450 ± 0,119 c	5,0 ± 1,5 b	
<b>Dinc7</b>	39,75 ± 4,1	0,230 ± 0,017 d	3,1 ± 0,2 c	
<b>Dinc8</b>	37,17 ± 5,9	0,301 ± 0,019 c	3,3 ± 0,2 c	
<b>Dinc9</b>	41,02 ± 6,1	0,534 ± 0,087 b	6,1 ± 2,1 b	
<b>Dinc10</b>	40,70 ± 4,3	0,385 ± 0,041 c	3,3 ± 0,5 c	
<b>Dinc11</b>	40,50 ± 2,5	0,348 ± 0,038 c	3,7 ± 0,1 c	
<b>Dinc12</b>	36,45 ± 4,3	0,340 ± 0,151 c	5,1 ± 2,4 b	
<b>Dinc13</b>	40,30 ± 2,9	0,567 ± 0,195 b	6,7 ± 1,9 b	
<b>Dinc14</b>	37,67 ± 3,6	0,325 ± 0,057 c	3,8 ± 0,6 c	
<b>Dinc15</b>	41,07 ± 3,2	0,350 ± 0,029 c	4,1 ± 0,6 c	
<b>Dinc16</b>	37,97 ± 4,6	0,468 ± 0,026 c	4,7 ± 0,7 b	
<b>Dinc17</b>	38,12 ± 4,3	0,411 ± 0,052 c	4,8 ± 0,9 b	
<b>Dinc18</b>	42,27 ± 3,8	0,614 ± 0,073 b	6,7 ± 1,3 b	
<b>Controle N/2*</b>	31,75 ± 4,0	0,129 ± 0,007 d	1,5 ± 0,1 c	
<b>CV (%)</b>	-	11,76	29,68	

\*= Controle + N equivalente a 150 Kg.ha<sup>-1</sup> de N e controle N/2 equivalente a 75 Kg.ha<sup>-1</sup> de N, \*\*= médias (4 repetições) seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias Scott-Knott (1%), ns= não significativo, CV= coeficiente de variação

A partir da análise de componentes principais, foi possível observar que o tratamento com dose completa de N, foi superior a todos os outros e que os tratamentos Dinc1, Dinc3, Dinc9, Dinc13 e Dinc18 foram os que apresentaram uma maior influência quanto às variáveis de casa de vegetação (massa seca de parte aérea e de raiz, comprimento de parte aérea, teor de clorofila e nitrogênio e fósforo total).

Também se observou que as variáveis produção de ácido indol-acético com e sem adição de triptofano e solubilização de fosfato não influenciaram nos resultados em plantas de aveia em casa de vegetação, indicando que os mecanismos de ação como promotores de crescimento dos rizóbios testados são outros que não os estudados no presente trabalho.



**Figura 6** - Análise de componentes principais referente às variáveis descritas nas tabelas 6 e 7, de plantas de aveia em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios simbiotes em *D. incanum*. AIA = produção de ácido indol-acético, AIAI = produção de ácido indol-acético com adição de triptofano, MSPA = massa seca da parte aérea, MSR = massa seca da raiz, CPA = comprimento da parte aérea, N total = acúmulo total de nitrogênio na planta, P total = acúmulo total de fósforo na planta, ISF = índice de solubilização de fosfato.

## 5.9 Avaliação da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento de plantas de milho em casa de vegetação

Os resultados da inoculação de rizóbios de *D. incanum* em milho mostram que a interação foi menor comparando-se aos resultados da inoculação em plantas de aveia. Quando comparados os dados de massa seca da parte aérea, pode-se observar que apesar do tratamento controle + N ser superior a todos os inoculados, os tratamentos inoculados com Dinc3 e Dinc8 tiveram um incremento em massa em relação ao tratamento controle N/2 de mais de 40%. Já os rizóbios Dinc9, Dinc10 e Din11, não apresentaram incremento na massa seca da parte aérea, o que pode indicar que não apresentam interação no híbrido AG-9025 PRO3 de milho.

Quanto à massa seca da raiz, os rizóbios Dinc1, Dinc3, Dinc12, Dinc13, Dinc14 e Dinc18 apresentaram um bom incremento quando comparados com tratamento controle N/2, que variaram de 7,8% (Dinc14) a 19,4% (Dinc18). Os demais não apresentaram incremento em massa suficiente.

**Tabela 8** – Médias seguidas do desvio padrão da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), volume de raiz (Vol. raiz), índice de eficiência relativa (IER), de plantas de milho em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de *D. incanum*

Tratamentos	MSPA	MSR	CPA	Vol. Raiz	IER
	G	G	cm	cm <sup>3</sup>	%
<b>Controle + N*</b>	2,286 ± 0,11 a**	2,483 ± 0,8 a**	78,9 ± 2,6 a**	34,7 ± 2,1 a**	100
<b>Dinc1</b>	1,106 ± 0,10 d	1,652 ± 0,12 b	54,1 ± 3,2 d	20,5 ± 1,0 c	19,33
<b>Dinc2</b>	0,883 ± 0,08 d	1,308 ± 0,07 c	52,5 ± 1,8 d	17,7 ± 1,5 d	-3,41
<b>Dinc3</b>	1,540 ± 0,10 b	1,590 ± 0,15 b	70,0 ± 3,2 b	23,2 ± 2,7 b	34,26
<b>Dinc4</b>	0,999 ± 0,10 e	1,270 ± 0,09 c	50,1 ± 2,7 e	17,2 ± 2,1 d	-0,28
<b>Dinc6</b>	1,006 ± 0,03 e	1,248 ± 0,15 c	47,9 ± 3,6 e	17,2 ± 2,1 d	-0,88
<b>Dinc7</b>	0,970 ± 0,07 e	1,351 ± 0,12 c	49,6 ± 1,5 e	15,5 ± 1,0 e	1,81
<b>Dinc8</b>	1,422 ± 0,05 c	1,092 ± 0,16 d	58,7 ± 4,7 c	15,0 ± 1,6 e	9,55
<b>Dinc9</b>	0,898 ± 0,05 f	1,269 ± 0,06 c	50,2 ± 2,9 e	16,2 ± 1,0 d	-4,37
<b>Dinc10</b>	0,629 ± 0,03 g	1,252 ± 0,14 c	46,4 ± 2,5 e	13,7 ± 1,0 e	-15,84
<b>Dinc11</b>	1,125 ± 0,10 d	1,119 ± 0,13 d	52,1 ± 2,2 d	15,0 ± 1,6 e	-1,28
<b>Dinc12</b>	1,113 ± 0,01 d	1,664 ± 0,16 b	51,0 ± 2,5 e	23,2 ± 2,4 b	20,10
<b>Dinc13</b>	1,015 ± 0,06 e	1,663 ± 0,16 b	52,1 ± 2,5 d	19,0 ± 2,4 d	16,13
<b>Dinc14</b>	1,009 ± 0,03 e	1,474 ± 0,17 b	48,7 ± 2,0 e	17,2 ± 2,1 d	8,30
<b>Dinc15</b>	0,863 ± 0,04 f	1,394 ± 0,01 c	49,0 ± 1,5 e	16,2 ± 1,0 d	-0,76
<b>Dinc16</b>	1,020 ± 0,03 e	1,354 ± 0,09 c	49,4 ± 2,2 e	17,5 ± 0,6 d	3,93
<b>Dinc18</b>	1,143 ± 0,07 d	1,687 ± 0,14 b	53,2 ± 2,1 d	17,2 ± 2,1 d	22,22
<b>Controle N/2*</b>	0,917 ± 0,04 f	1,359 ± 0,10 c	48,1 ± 3,7 e	14,5 ± 1,9 e	0
<b>CV (%)</b>	6,31	8,48	5,03	9,48	-

\*= Controle + N equivalente a 120 Kg.ha<sup>-1</sup> de N e controle N/2 equivalente a 60 Kg.ha<sup>-1</sup> de N, \*\*= médias (4 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

O índice de eficiência relativa dos tratamentos inoculados foi baixo, isso ocorreu porque o índice é calculado com base na massa seca total e incremento em massa seca da parte aérea foi bastante inferior quando comparado com o incremento em massa seca da raiz.

A planta inoculada com o rizóbio Dinc3 foi a que apresentou o comprimento da parte aérea mais próximo ao tratamento controle 100% N. Já no volume de raiz, além do Dinc3, o rizóbio Dinc12 também apresentou resultado aproximado ao controle + N.

Quando avaliado o acúmulo de nitrogênio da parte aérea nas plantas de milho, pode-se observar que alguns rizóbios apresentaram desempenho superior ao tratamento controle N/2, que recebeu a mesma dose de nitrogênio via solução nutritiva, destacando-se os rizóbios Dinc3 e Dinc8 que dobraram o acúmulo de N nas plantas de milho. Em acúmulo de fósforo, novamente o rizóbio Dinc3, foi o que se destacou em relação aos demais, seguido do rizóbio Dinc 14 (tabela 9).

**Tabela 9** – Médias seguidas do desvio padrão do nitrogênio total da parte aérea (N total) e do fósforo total da parte aérea (P total), de plantas de milho em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de *D. incanum*

Tratamentos	N total	P total
	mg	
<b>Controle + N*</b>	33,0 ± 1,0 a**	2,005 ± 0,048 a**
<b>Dinc1</b>	9,6 ± 0,9 d	0,982 ± 0,046 d
<b>Dinc2</b>	9,0 ± 0,7 e	0,726 ± 0,058 e
<b>Dinc3</b>	17,0 ± 1,4 b	1,653 ± 0,276 b
<b>Dinc4</b>	10,6 ± 0,5 c	0,866 ± 0,146 e
<b>Dinc6</b>	11,4 ± 0,7 c	0,763 ± 1,165 e
<b>Dinc7</b>	9,8 ± 0,4 d	0,895 ± 0,074 d
<b>Dinc8</b>	16,2 ± 1,8 b	1,010 ± 0,299 d
<b>Dinc9</b>	8,6 ± 0,9 e	0,813 ± 0,068 e
<b>Dinc10</b>	6,0 ± 0,4 f	0,605 ± 0,068 e
<b>Dinc11</b>	10,5 ± 0,9 c	0,842 ± 0,125 e
<b>Dinc12</b>	11,6 ± 1,0 c	0,959 ± 0,164 d
<b>Dinc13</b>	9,8 ± 0,4 d	0,746 ± 0,025 e
<b>Dinc14</b>	9,8 ± 0,3 d	1,210 ± 0,149 c
<b>Dinc15</b>	8,5 ± 0,4 e	1,003 ± 0,101 d
<b>Dinc16</b>	9,8 ± 0,7 d	0,785 ± 0,126 e
<b>Dinc18</b>	11,0 ± 0,3 c	0,959 ± 0,106 d
<b>Controle N/2*</b>	8,5 ± 0,3 e	0,667 ± 0,104 e
<b>CV (%)</b>	7,15	14,37

\*= Controle + N equivalente a 120 Kg.ha<sup>-1</sup> de N e controle N/2 equivalente a 60 Kg.ha<sup>-1</sup> de N, \*\*= médias (4 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

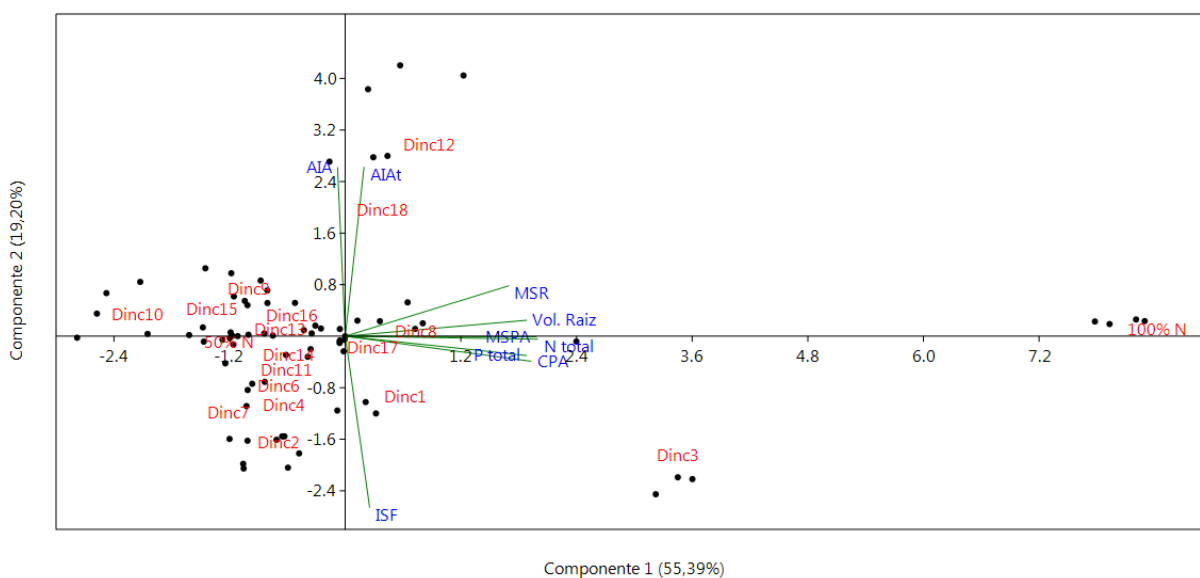
Têm se obtido inúmeros resultados positivos pela inoculação de bactérias promotoras de crescimento em milho, apesar disso, há uma grande variação nas interações entre diferentes híbridos e bactérias, sugerindo que essa interação é dependente do genótipo da planta e do microrganismo envolvido (GARCÍA DE SALAMONE et al., 1996; RIGGS et al., 2001; MONTAÑEZ et al., 2009; WALKER et al., 2011, HAHN et al., 2013).

Riggs et al., (2001) avaliaram a capacidade de diversas estipes bacterianas em promover o crescimento em 10 híbridos diferentes de milho em casa de vegetação. Dentre as estipes testadas, duas eram rizóbios, sendo que a estirpe *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* E11 apresentou incremento significativo em apenas um dos híbridos (34,3% de incremento em matéria seca da parte aérea em relação ao tratamento sem inoculação) e a estirpe *Sinorhizobium* sp. ANU280 apresentou incremento significativo em dois dos híbridos (incremento de 35,4 e 43,3% em relação ao tratamento não inoculado).

Quando submetidos os dados à análise de componentes principais, observou-se que os rizóbios Dinc1, Dinc3 e Dinc8 foram os que mais apresentaram efeitos positivos em relação às variáveis de casa de vegetação (massa seca da parte aérea e da raiz, comprimento da parte aérea, volume de raiz e nitrogênio e fósforo total) (figura 7).

Assim como nas plantas de aveia, as variáveis produção de ácido indolacético com e sem adição de triptofano e solubilização de fosfato não influenciaram diretamente nas variáveis de casa de vegetação em plantas de milho.





**Figura 7** - Análise de componentes principais referente às variáveis descritas nas tabelas 8 e 9, de plantas de milho em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios simbiotes em *D. incanum*. AIA = produção de ácido indol-acético, AIAt = produção de ácido indol-acético com adição de triptofano, MSPA = massa seca da parte aérea, MSR = massa seca da raiz, CPA = comprimento da parte aérea, Vol. Raiz = volume da raiz, N total = acúmulo total de nitrogênio na planta, P total = acúmulo total de fósforo na planta, ISF = índice de solubilização de fosfato.

## 6 CONCLUSÕES

Rizóbios isolados de *D. incanum* são capazes de solubilizar fosfato tricálcico em meio de cultura.

Nenhum dos rizóbios estudados é capaz de produzir melanina em meio de cultura.

Os rizóbios produzem ácido indol-acético em meio de cultura sem adição de triptofano e com adição de triptofano.

Os rizóbios estudados apresentam uma alta eficiência simbiótica em plantas de pega-pega, apresentando maior acúmulo de massa seca que o controle com adição de nitrogênio.

Os rizóbios estudados não alteram o percentual de germinação final em sementes de trigo e arroz, entretanto, aceleram a germinação em sementes de arroz.

Rizóbios de *D. incanum* são capazes de aumentar o comprimento da parte aérea de plantas de arroz, e o comprimento da raiz de plantas de trigo *in vitro*.

Em plantas de aveia, os rizóbios aumentam a massa seca da parte aérea e o comprimento da parte aérea e a massa seca da raiz.

Todos os rizóbios aumentam o acúmulo de fósforo e de nitrogênio na parte aérea de plantas de aveia.

Os rizóbios Dinc1, Dinc3, Dinc9, Dinc13 e Dinc18 apresentam uma maior influência em plantas de aveia em casa de vegetação.

Em plantas de milho, os rizóbios promovem um aumento em massa seca da parte aérea, aumentam a massa seca da raiz, promovem um aumento do comprimento da parte aérea e aumentam o volume das raízes.

Quanto ao acúmulo de nutrientes em plantas de milho, os rizóbios promovem um maior acúmulo de nitrogênio e um maior acúmulo de fósforo.

Os rizóbios Dinc1, Dinc3 e Dinc8 apresentam uma maior influência no crescimento de plantas de milho em casa de vegetação.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZAL, A.; BANO, A. *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). **International Journal of Agricultural Biology**, v. 10, n. 1, 85-88. 2008.

ALVES, J. B. **Seleção de rizóbios para trevo branco**. 2005. 78f. Dissertação (mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ARCAND, M. M.; SCHNEIDER, K. D. Plant and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78 n. 4, 791–807, 2006.

ARGUDO, M.; LITTLE, I.; SHEARER, R.; JOHNSON, N.; DIXON, R. The *NifL-NifA* system: a multi domain transcriptional regulatory complex that integrate environmental signals. **Journal Bacteriology**, v.186, p.601–610, 2004.

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

AZEVEDO, J. L. Microorganismos Endofíticos. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. (Eds.) **Ecologia Microbiana**, Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. 488 p.

BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. – **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1198–1206, 2006.

BARRIUSO, J.; SOLANO, B. R. Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). **Journal of Plant nutrition**, p. 1-17, 2008.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: uma resposta

dos microrganismos. **Química Nova**, n. 25, p. 1155-1164, 2002.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v. 17, p. 399-406, 1976.

BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B.; YANNI, I. G.; ROLFE, B. G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, v. 92, n. 5, p. 880-886, 2000.

BOIERO, L.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSA'NA, F.; LUNA, V. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 874–880, 2007.

BOLDRINI, I. I. **Dinâmica da Vegetação de uma Pastagem Natural sob Diferentes Níveis de Oferta de Forragem e Tipos de Solos**. 1993. 262f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

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

CANIGIA, M. V. F. Manual de Nodulación, 2003. Disponível em: <http://www.nitragin.com.ar/Manual%20de%20nodulacion-Sept03.pdf>

CARDOSO, E. J. N. B; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Campinas, 1992. 360 p.

CASSAN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E 109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L) and soybean (*Glycine max* L). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p.

28–35, 2009.

CHABOT, R.; BEAUCHAMP, C. J.; KLOEPPER, J. W.; AUTON, H. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 30, 1615-1618, 1998.

CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T.; LAI, W-A.; YOUNG, C. C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 33–41, 2006.

CHEN, X.; FENG, J.; HOU, B.; LI, F.; LI, Q.; HONG, G. Modulating DNA bending affects *NodD*-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 8, p. 2540-2548, 2005.

CHI, F.; SHEN, S.; CHENG, H.; JING, Y.; YANNI, Y.; DAZZO, F. Ascending Migration of Endophytic Rhizobia, from Roots to Leaves, inside Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, v. 11, p. 7271-7278, 2005.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, p. 1–18, 1995.

CUBO, M. T.; BUENDIA-CLAVERIA, A. M.; BERINGER, J. E.; RUIZ-SAINZ, J. E. Melanin production by *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1812-1817, 1988.

CUBO, M. T.; ROMERO, F.; VINARDELL J. M.; RUIZ-SAINZ, J. E. Expression of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli melA* gene in other rhizobia does not require the presence of the *nifA* gene. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 24, 195-203, 1997.

DAZZO, F. B.; YANNI, Y. G. The natural rhizobium-cereal crop association as an example of plant-bacterial interaction. In: UPHOFF, N.; BALL, A. S.; FERNANDES,

E.; HERREN, H.; HUSSON, O.; LAING, M.; PALM, C.; PRETTY, J.; SANCHEZ, P.; SANGINGA, N.; THIES, J. (eds) **Biological approaches to sustainable soil systems**. CRC, Boca Raton, FL, p. 109–127, 2006.

DUFFY, B. K.; DÉFAGO, G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2429-2438, 1999.

DUTTA, S.; MISHRA, A. K.; KUMAR, B. S. D. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 452-461, 2008.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2 ed. Rio de Janeiro, 2006. 306 p.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A.; JADIDI, M.; ALIAKBARI, A. Effect of superior IAA producing rhizobia on N, P, K uptake by wheat grown under greenhouse condition. **World Journal of Applied Sciences**, v. 6, n. 12, 1629-1633. 2009.

FERGUSON, L.; LESSENGER, J. E. Plant growth regulators. In: LESSENGER, J. E. (ed) **Agricultural medicine**. Springer, New York, p. 156–166, 2006.

FONTOURA, R. A. **Seleção de rizóbios nativos, de solos do Rio grande do Sul, para *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus***. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

FRANKENBERGER, W. T. JR.; ARSHAD, M. **Phytohormones in soil: microbial production and function**. Dekker, New York, 1995, 503 p.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J. Bacterial biofertilizers. In: SIDDIQUI, Z. A. (ed). **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**. Springer, Netherlands, p. 143–172, 2006.

GARCIA, E. N.; BASEGGIO, J. Poder germinativo de sementes de *Desmodium incanum* DC. (leguminosae) - Revista Brasileira de Agrociência, v. 5, n. 3, p. 199-202, 1999.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p. 249-256, 1996.

GIONGO, A. **Diversidade de rizóbios nativos que nodulam feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) isolados de áreas de campo nativo sob diferentes adubações**. 2003 83f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GRANADA, C. E. **Seleção de rizóbios e estudo da compatibilidade simbiótica em *Desmodium incanum* e *Lotus* spp.**. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

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.

GUO, J.; MA, C.; KADMIEL, M.; GAI, Y.; STRAUSS, S. Tissue-specific expression of *Populus* C19 GA 2-oxidases differentially regulate above- and below- ground biomass growth through control of bioactive GA concentrations. **New Phytologist**, v. 192, p. 626–639, 2011.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, N. J.; PAREKA, L. J.; PODLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, n. 1, 83–93, 2002.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. **PAST** – Palaeontological Statistics,

versão 3.10, 2015.

HAHN, L. **Promoção de crescimento de plantas gramíneas e leguminosas inoculadas com rizóbios e bactérias associativas**. 2013. 171f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

HAHN, L.; SÁ, E. L. S.; SILVA, W. R.; MACHADO, R. G.; DAMASCENO, R. G. Promoção de crescimento de híbridos de milho inoculados com rizóbios e bactérias diazotróficas associativas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 19. N. 1/2, p. 33-40, 2013.

IGUAL, J. M.; VALVERDE, A.; CERVANTS, E.; VELAZQUEZ, E. Phosphate solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use updated molecular techniques in their study. **Agronomie**, v. 21, p. 561–568, 2001.

ISLAM, M. T.; DEORAA, A.; HASHIDOKOA, Y.; RAHMANA, A.; ITOA, T.; TAHARAA, S. Isolation and Identification of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizoplane of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, 103-110, 2007.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMAD, E. Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms. In: KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (Eds.) **Phosphate Solubilizing Microorganisms**, Springer International Publishing Switzerland, 2014. 296 p.

KING, C. A.; PURCELL, B. Inhibition of N<sub>2</sub> fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. **Plant Physiology**, v.137, p.1389-1396, 2005.

LIEVENS, S.; GOORMACHTIG, S.; DEN HERDER, J.; CAPOEN, W.; MATHIS, R.; HEDDEN, P.; HOLSTERS, M. Gibberellins are involved in nodulation of *Sesbania rostrata*. **Plant Physiology**, v. 139, p. 1366–1379, 2005.

LOH, J.; STACEY, G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a



unique integration of global regulatory circuits. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 10-17, 2003.

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

MARTINS, A. F. **Rizóbios, para *Lotus* spp., resistentes à acidez e salinidade do solo**. 2010. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MIKANOVA, O.; KÚBAT, J. Practical use of P-solubilization a activity of *Rhizobium* species strains. **Rostlinná Vyroba**, v. 45, n. 9, 407-409, 1999.

MIRANSARI, M.; SMITH, D. Rhizobial lipo-chitooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. **Biotechnology**, v. 8, p. 270–275, 2009.

MISHRA, R. P. N.; SINGH, R. K.; JAISWAL, H. K.; KUMAR, V.; MAURYA, S. *Rhizobium*-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 383-389, 2006.

MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by 15N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, p. 253–263, 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

OSORIO FILHO, B. D.; GANO, K. A.; BINZ, A.; LIMA, R. F.; AGUILAR, L. M.; RAMIREZ, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; SÁ, E. L. S; GIONGO, A. 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.

OSORIO FILHO, B. D.; BINZ, A.; LIMA, R. F.; GIONGO, A.; SÁ, E. L. S. Promoção de crescimento de arroz por rizóbios em diferentes níveis de adubação nitrogenada. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 478-485, 2016.

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D. K. Two-species microbial consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. **Current Science**, v. 92, n. 8, p. 25, 2007.

PEREIRA, P. **Taxonomia e diversidade genética de rizóbios microssimbiontes de distintas leguminosas com base na análise polifásica (BOX-PCR e 16S RNAr) e na metodologia de MLSA**. 2008, 100f. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Estadual de Londrina, 2008.

PIEX, A.; RIVAS-BOYERO, A. A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, n. 1, 103-110, 2001.

RATLEDGE, C.; DOVER, D. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, n. 54, p. 881-941, 2000.

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

RIGGS, P. J.; CHELIUS, A.; INIGUEZ, A. L.; KAEPLER, S. M.; TRIPLETT, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 829-836, 2001.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZÁLEZ, T.; BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Plant and Soil**, v. 287, p. 15–21, 2006.

SAHGAL, M.; JOHRI, B. N. The changing face of rhizobial systematics. **Current Science**, v. 84, n.1, p.43-48, 2003.

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

SAYYED, R. Z.; BADGUZAR, M. D.; SONAWANE, H. M.; MHASKE, M. M.; CHINCHOLKAR, S. B. Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent *Pseudomonas*. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, p.484-490, 2005.

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; AZAMBUJA, A. C.; GRANADA, C. E.; GABIATTI, N. C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influence of rhizobial inoculation on seedling vigor and germination of lettuce. **Ciência Rural**, v. 38, p. 658–664, 2008.

SHARMA, A.; JOHRI, B. N. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. **Microbiological Research**, v. 158, p. 243–248, 2003.

SHARMA, S.; SHARMA, S.; SINGH, R. K.; VAISHAMPAYAN, A. Colonization behavior of bacterium *Burkholderia cepacia* inside the *Oryza sativa* roots visualized using green fluorescent protein reporter. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1169-1175, 2008.

SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springerplus**, v. 2, p. 587, 2013.

SIDDIQUI, Z. A. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: SIDDIQUI, Z. A. (ed). **PGPR: Biocontrol and Biocontrol**. Springer, Netherlands, p. 112–142, 2006.

SILVA, F. A. S. **Assistat versão 7.7 beta**. Universidade Federal de Campina Grande, Brasil, 2015.

SKERMAN, P. J.; CAMERON, D. G.; RIVEROS, F. **Leguminosas forrajeras tropicales**. Roma: FAO, 1991, 707 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO – NÚCLEO REGIONAL SUL/COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE. **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 1ª ed. Porto Alegre: SBCS – Núcleo Regional Sul. 2004. 400 p.

SOLANO, R. B.; GARCÍA, J. A. L.; GARCIA-VILLARACO, A. ALGAR, E.; GARCIA-CRISTOBAL, J.; MAÑERO, F. J. G. Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. **Plant and Soil**, v. 334, p. 189–197, 2010.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, J. H. **Handbook for rhizobia: methods in legume - *Rhizobium* technology**. New York: Springer-Verlag, 1994. 450p.

SONG, O. R.; LEE, S. J.; LEE, Y. S.; LEE, S. C.; KIM, K. K.; CHOI, Y. L. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 151–156, 2008.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p. 425–448, 2007.

STAJKOVIC-SRBINOVIC, O.; DELIC, D.; KUZMANOVIC, D.; PROTIC, N.; RASULIC, N.; KNEZEVIC-VUKCEVIC, 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. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174p. (Boletim técnico, 5)

TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. Y.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 117–126, 2006.

VAN LOON, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 243-254, 2007.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 507-512, 2002.

VERMA, S. C.; JAGDISH, K. L.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

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

WALKER, V.; BERTRAND, C.; BELLVERT, F.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; BALLY, R.; COMTE, G. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. **New Phytologist**, v. 189, p. 494-506, 2011.

YANNI, Y. G.; RIZK, R. Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGWORTH, S.; ORGAMBIDE, G. DE; BRUIJN, F.; STOLZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T. M.; MATEOS, P. F.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B. 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 n. 1-2, p. 99–114. 1997.

YANNI, Y. G.; RIZK, R. Y.; ABDEL-FATTAH, F. K.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJN, D.; REDEMAKER, J.; MAYA-FLORES, J.; OSTROM,

P.; VEGA-HERNANDEZ, M.; HOLLINGSWORTH, R. I.; MARTINEZ-MOLINA, E.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; MATEOS, P. F.; VELASQUEZ, E.; TRIPLETT, E.; UMALI-GARCIA, M.; ANARNA, J. A.; ROLFE, B. G.; LADHA, J. K.; HILL, J.; MUJOO, R.; NG, P. K.; DAZZO, F. B. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* with rice roots. **Australian Journal Plant of Physiology**, v. 28, n. 9, p. 845-870, 2001.

YAZDANI, M.; BAHMANYAR, M. A.; PIRDASHTI, H.; ESMAILI, M. A. Effect of Phosphate Solubilization Microorganisms (PSM) and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of Corn (*Zea mays* L). **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v, 49, p. 90-92. 2009.

ZAKHIA, F.; LAJUDIE, P. Taxonomy of Rhizobia. **Agronomie**, v. 21. n. 6, p. 569-576, 2001.