

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

Carolina Leal de Castilho

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE AVEIA PRETA (*Avena strigosa* Schreb),
AVEIA BRANCA (*A. sativa* L.) E AZEVÉM (*Lolium multiflorum*) POR ESTIRPES
DE *Bradyrhizobium* SIMBIONTES DE SOJA**

Porto Alegre
2019

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

Carolina Leal de Castilho

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE AVEIA PRETA (*Avena strigosa* Schreb),
AVEIA BRANCA (*Avena sativa* L.) E AZEVÉM (*Lolium multiflorum*) POR
ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* SIMBIONTES DE SOJA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

Porto Alegre

2019

“Fôlego: para lembrar que ondas e lágrimas são feitas de água salgada
Fôlego: para transformar tristeza em mar;
E se o caminho for longo – fôlego, para remar na volta.
O mar ensina, mas é preciso remar”

Reverb poesia, o mar ensina

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao PPGMAA.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais Neiva e Fernando, por incentivarem de todas as formas possíveis a minha permanência na Universidade para que eu pudesse concluir mais essa etapa. Em segundo lugar, quero agradecer imensamente três pessoas que foram fundamentais para concluir o mestrado: meu orientador Professor Enilson de Sá por ter me aceitado para participar da sua equipe, a pesquisadora Anelise Beneduzi que me auxilia muito e acredita no meu trabalho desde a graduação e a Professora Luciane Passaglia que mesmo sem me conhecer abriu as portas do laboratório de genética para que eu pudesse realizar etapas importantes e me fazendo sentir parte da sua equipe também.

À todos os técnicos, pesquisadores e bolsistas de iniciação científica do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária – DDPA, principalmente ao Bruno Lisboa, Luciano Kayser, Gilson Schlindwein, Jamilla Sampaio, Letícia Longoni, André Hernandez Simone Lange, Luana Carvalho, Júlia Franco, pelo companheirismo, troca de conhecimento e auxílio na bancada.

Um agradecimento mais que especial para a Adriana Ambrosini e Camila Gazolla, sem elas nunca teria compreendido muitas etapas do trabalho, obrigada de coração. Aos demais colegas do laboratório de genética, especial à Fernanda Lazaroto, pelo auxílio com a microscopia, a Júlia Heinzmann e ao Gabriel Estrella pelo apoio no laboratório de genética.

Aos meus queridíssimos colegas de laboratório da microbiologia do solo, Franciane Lemes, Franquiéle Bonilha, Fernanda Araújo, Juan Cubillos e Victor Bassani muito obrigada pelo convívio, pelo apoio, pelos infinitos cafés, um agradecimento muito especial ao Lucas Zulpo, Cícero Ortigara e Tiago Stumpf pela ajuda com o experimento de casa de vegetação e pela amizade e parceria. E aos demais amigos que a faculdade de agronomia me proporcionou, principalmente a todos do manejo do solo, especialmente ao Murilo Veloso pelo auxílio com as análises estatísticas e normalidade dos dados, ao Vítor Ambrosini e a Andressa Bender.

Aos amigos que contribuem sempre nos auxílios psicológicos com muito amor e compreensão: Guilherme Taboada, Anelise Passos, Lílian Caesar, Júlia Finger, Felipe Benites, Guilherme Cauduro e Pedro Tedesco, muito obrigada à todos.

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE AVEIA PRETA (*Avena strigosa* Schreb), AVEIA BRANCA (*Avena sativa* L.) E AZEVÉM (*Lolium multiflorum*) POR ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* SIMBIONTES DE SOJA

Autor: Carolina Leal de Castilho

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

RESUMO

Rizóbios são um grupo de bactérias do solo conhecido por fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com leguminosas. A inoculação dos rizóbios em leguminosas como a soja (*Glycine max* L.), é uma prática comum que ajuda a melhorar o rendimento com um baixo custo financeiro. Além disso, estirpes de rizóbios também podem estabelecer interações positivas com gramíneas (Poaceae). O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de quatro linhagens recomendadas para inoculação de soja, SEMIA 587 e 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*), SEMIA 5079 (*B. japonicum*) e SEMIA 5080 (*B. diazoefficiens*), visando promover o crescimento das gramíneas aveia preta (*Avena strigosa* Schreb), aveia branca (*A. sativa* L.) e azevém (*Lolium multiflorum*). As plantas com inoculação de rizóbios também foram comparadas com plantas inoculadas com *Azospirillum* sp. e tratamentos não inoculados serviram como controle. As plantas foram cultivadas em laboratório e em casa de vegetação e avaliadas quanto à massa seca da parte aérea e da raiz e absorção de nitrogênio. Para avaliar o potencial de colonização da raiz, as gramíneas também foram inoculadas com as quatro estirpes de rizóbios geneticamente transformadas para conter o plasmídeo pHRGFPGUS, expressando o sistema repórter GUS e a proteína verde fluorescente (GFP). As plantas cultivadas em condições laboratoriais e inoculadas com as estirpes SEMIA 587, 5080 e 5079 estatisticamente apresentaram um maior comprimento, volume e área de raiz quando comparadas ao controle não inoculado. Em condições de casa de vegetação, a SEMIA 587 foi capaz de aumentar a massa seca de aveia preta. Os resultados mostraram que as bactérias estudadas promoveram o crescimento de aveia preta e branca, e a capacidade de colonizar as raízes dessas gramíneas ainda não foi confirmada pela quantificação dos sinais GFP por microscopia de fluorescência.

¹Dissertação 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. (58p.) abril, 2019.

Plant growth promotion of *Avena strigosa* Schreb, *Avena sativa* L. and *Lolium multiflorum* by *Bradyrhizobium* strains

Author: Carolina Leal de Castilho

Advisor: Prof. Dr. Enilson Luiz Sacool de Sá

ABSTRACT

Rhizobia is a group of soil bacteria known to fix atmospheric nitrogen in symbiosis with leguminous plants. Rhizobial inoculation of leguminous crops such as soybean (*Glycine max* L.) is a common practice that helps to improve yield with low financial risk. Moreover, rhizobial strains could also establish positive interactions with plants belonging to *Gramineae* (or *Poaceae*) family. The aim of this study was to evaluate the potential of four rhizobial strains recommended for soybean inoculation, SEMIA 587 and 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*), SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*) and SEMIA 5080 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*), in order to promote growth in the grasses *Avena strigosa* Schreb (black oats), *Avena sativa* L. (white oats) and *Lolium multiflorum* (ryegrass). The plants with rhizobial inoculation were also compared to plant inoculated with a non-rhizobial bacterium (*Azospirillum* sp. inoculation). Uninoculated plants served as controls. The plants were cultivated in laboratory and in greenhouse conditions, and evaluated for shoot and root dry masses and nitrogen absorbing. In order to evaluate the root colonization potential, the grasses were also inoculated with the four-rhizobial strains genetically engendered to contain pHRGFPGUS plasmid expressing GUS reporter system and green fluorescent protein (GFP). Plants cultivated in laboratorial conditions and inoculated with SEMIA 587, 5080 and 5079 strains presented a statistically higher length, volume and area of roots compared to the uninoculated control. Under greenhouse conditions, SEMIA 587 was able to increase the dry mass of black oat. The results showed that the studied bacteria promoted the growth of black and white oats, as the ability to colonize the roots of these grasses was not yet confirmed by quantification of GFP signals by fluorescent microscopy.

¹Master 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. (58 p.) april, 2019.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3.	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1	Promoção de crescimento de plantas	17
3.2	Importância das aveias branca e preta	20
3.3	Importância do azevém	21
3.4	<i>Azospirillum</i> e a co-inoculação com rizóbios	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Avaliação do efeito da inoculação das estirpes SEMIA 587,5019, 5079 e 5080 sobre a germinação de sementes de aveia branca (<i>A. sativa</i>), aveia preta (<i>A. strigosa</i>) e azevém (<i>L. multiflorum</i>).	23
4.2	Avaliação da promoção de crescimento em plântulas de aveia branca, aveia preta e azevém inoculadas com as estirpes de <i>Bradyrhizobium</i>	24
4.3	Avaliação da capacidade de promoção de crescimento em plantas de aveia branca (<i>A. sativa</i>), aveia preta (<i>A. strigosa</i>) e azevém (<i>L. multiflorum</i>) inoculadas e cultivadas em vasos em casa de vegetação	25
4.4	Transformação das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> através da inserção do plasmídeo <i>pHRGFPGUS</i>	26
4.5	Avaliação da capacidade de colonização das plantas de aveia preta (<i>A. strigosa</i>) pelas estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> transformadas	27
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Avaliação do efeito da inoculação das estirpes SEMIA 587,5019, 5079 e 5080 sobre a germinação de sementes de aveia branca (<i>A. sativa</i>), aveia preta (<i>A. strigosa</i>) e azevém (<i>L. multiflorum</i>).	28
5.2	Avaliação da promoção de crescimento em plântulas de aveia branca, aveia preta e azevém inoculadas com as estirpes de <i>Bradyrhizobium</i>	31
5.3	Avaliação da capacidade de promoção de crescimento em plantas de aveia branca (<i>A. sativa</i>), aveia preta (<i>A. strigosa</i>) e azevém (<i>L. multiflorum</i>) inoculadas e cultivadas em vasos em casa de vegetação	35

5.4	Avaliação das plantas de aveia preta (<i>A. strigosa</i>) inoculadas com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> cultivadas em casa de vegetação	36
5.5	Avaliação das plantas de azevém (<i>L. multiflorum</i>) inoculadas com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> cultivadas em casa de vegetação	38
5.6	Avaliação da transformação das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> a partir da inserção do plasmídeo <i>pHRGFPGUS</i>	40
6.	CONCLUSÕES	48
7.	REFERÊNCIAS	49

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Índice de velocidade de germinação (IVG%) e do tempo médio de germinação (TMG dias) de sementes de aveia branca (AB), aveia preta (AP) e azevém (AZ) inoculadas com as estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> SEMIA 587 e 5019 (<i>B. elkanii</i>), 5079 (<i>B. japonicum</i>) e 5080 (<i>B. diazoefficiens</i>)	29
Tabela 2. Comprimento, volume, área superficial e massa seca das raízes de aveia branca e aveia preta inoculadas com estirpes de <i>B. elkanii</i> (SEMIA 587, 5019), <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079) e <i>B. diazoefficiens</i> (SEMIA 5080) após sete dias de crescimento.....	35
Tabela 3. Produção de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR), nitrogênio acumulado (N) de parte aérea e volume de raiz das plantas de aveia branca (<i>A. sativa</i>) inoculadas com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i>	36
Tabela 4. Produção de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR), nitrogênio acumulado (N) de parte aérea e volume de raiz das plantas de aveia preta (<i>A. strigosa</i>) inoculadas com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i>	39
Tabela 5: Produção de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) e nitrogênio acumulado (N) de parte aérea das plantas de azevém (<i>L. multiflorum</i>) inoculadas com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i>	40
Tabela 6: Volume de raiz avaliados após a inoculação das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> SEMIA 587 e 5019 (<i>B. elkanii</i>), 5079 (<i>B. japonicum</i>) e 5080 (<i>B. diazoefficiens</i>) nas plantas de aveia e azevém cultivadas em casa de vegetação.	41

Tabela 7: Resistência e suscetibilidade aos antibióticos das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> SEMIA 587, 5019, 5079, 5080 e dos plasmídeos inseridos nas <i>E. coli</i> DH5α	44
--	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tempo médio de germinação de sementes de aveia branca, aveia preta e azevém inoculadas com as estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> SEMIA 587 e 5019 (<i>B. elkanii</i>), 5079 (<i>B. japonicum</i>) e 5080 (<i>B. diazoefficiens</i>).	29
Figura 2. Índice de velocidade de germinação (IVG%) de sementes de aveia branca, aveia preta e azevém inoculadas com as estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> SEMIA 587 e 5019 (<i>B. elkanii</i>), 5079 (<i>B. japonicum</i>) e 5080 (<i>B. diazoefficiens</i>)	30
Figura 3. Raízes de plântulas de aveia branca com sete dias de crescimento inoculadas com rizóbios A) SEMIA 587; B) SEMIA 5019; C) SEMIA 5079; D) SEMIA 5080 E) CONTROLE (sem inoculação).....	32
Figura 4. Raízes de plântulas de aveia preta com sete dias de crescimento inoculadas com rizóbios A) SEMIA 587; B) SEMIA 5019; C) SEMIA 5079; D) SEMIA 5080 E) CONTROLE (sem inoculação)	33
Figura 5. Colônias transformadas da estirpe SEMIA 5080. Pequenas colônias azuis indicam que a transformação foi positiva.....	41
Figura 6. Expressão do <i>gfp</i> medido em fluorímetro com o comprimento de onda de 510nm. Barras cinzas representam a média das repetições com as bactérias transformadas; barras pretas representam o controle com as mesmas bactérias não transformadas.....	42

Figura 7. Plantas de aveia preta inoculadas com as estirpes: A) SEMIA 587 B) SEMIA 5019 C) SEMIA 5079 D) SEMIA 5080 E) CONTROLE (sem inoculação) marcadas com o gene <i>gfp</i> . Setas vermelhas apontam as células bacterianas.....	44
Figura 8. Plantas de aveia preta inoculadas com as estirpes: A) SEMIA 587 B) SEMIA 5019 C) SEMIA 5079 D) SEMIA 5080 marcadas com o gene <i>gus</i> . Setas vermelhas representam manchas azuladas.....	45
Figura 9. Planta de soja (<i>Glycine max</i>) inoculada com a estirpe SEMIA 5080 apresentando nódulos radiculares, colhida aos 15 dias após a inoculação.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Aveia Branca
AP	Aveia Preta
AZ	Azevém
RPCP	Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
PGPR	<i>Plant growth promoting rizobacteria</i>
TMG	Tempo médio de germinação
IVG	Índice de velocidade de germinação
<i>Gfp</i>	<i>Green fluorescent protein</i>
N	Nitrogênio
LM	meio levedura manitol
LB	meio Luria Bertani

1. INTRODUÇÃO

A atividade socioeconômica mais importante do Brasil no setor primário é a agricultura. Nos últimos anos, o país se consolidou como um dos maiores produtores e exportadores mundiais de alimentos, com uma área plantada de mais de 62 milhões de hectares, sendo que desses, 35,3 milhões estão na Região Sul (CONAB, 2019). O estado do Rio Grande do Sul (RS) se destaca pela combinação de fatores climáticos, investimento em tecnologia e extensão territorial cultivável, pois é o terceiro maior produtor nacional de grãos, com aproximadamente 16%. A produtividade das lavouras do RS, entretanto é afetada pelas características nutricionais desfavoráveis do solo, especialmente as limitações nos teores de nitrogênio. A reposição desse nutriente para a planta pode ser fornecido de duas formas principais, a primeira e mais usada é a reposição mediante ao uso de adubos nitrogenados, contudo, isso interfere de forma negativa nos custos de produção. A outra, é uma alternativa sustentável que é a utilização de bactérias conhecidas por terem a habilidade de transformar o nitrogênio do ar atmosférico em formas assimiláveis às plantas (Fixação Biológica de Nitrogênio – FBN) e, por isso, são também consideradas bactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) e as mais reconhecidas e estudadas são os rizóbios. Os efeitos positivos desses organismos podem ocorrer por influência direta, por meio da própria FBN, pelo aumento da solubilização de nutrientes, pela modificação na forma que as plantas absorvem o nitrogênio e pela produção de reguladores de crescimento vegetal; ou por influência indireta, através da supressão de patógenos ou pela produção de antibióticos.

Alguns microrganismos que tem a capacidade de promover crescimento de plantas e realizar a FBN fornecendo à planta o nitrogênio assimilável, são encontrados em inoculantes comerciais para soja e para gramíneas. Basicamente os inoculantes são suspensões bacterianas de estirpes previamente selecionadas que são acrescentadas a um suporte estéril que pode ser turfa ou uma mistura de diferentes polímeros. A utilização dos rizóbios na agricultura na forma de produtos inoculantes em culturas não-leguminosas ainda é pouco explorada, justamente por eles não terem a capacidade de fixar

nitrogênio atmosférico nessas plantas, pois não ocorre a simbiose e nem a nodulação das raízes. Em gramíneas, embora não se tenha verificado a existência do fenômeno da simbiose, a interação com rizóbios tem recentemente despertado mais interesse. Existem estudos que encontraram que elas podem estimular o crescimento vegetal por outros mecanismos, tais como, aumento do fornecimento de fósforo e ferro, produção de substâncias fitorreguladoras, e a supressão de fitopatógenos, aumentando o comprimento de raízes, portanto mudando a forma na absorção dos nutrientes.

A utilização de leguminosas em sistemas de consorciação ou rotação de culturas com gramíneas apresenta um importante benefício pela FBN oriunda dos rizóbios e conseqüentemente o acúmulo de nitrogênio no solo, o que beneficia as gramíneas. Diversos estudos demonstraram o efeito benéfico da interação de rizóbios com gramíneas, como o arroz (*Oriza sativa*), o milho (*Zea mays*), a aveia branca (*Avena sativa*) e o trigo (*Triticum aestivum*). Entretanto, muito pouco se sabe sobre as possíveis interações entre os rizóbios simbiotes de soja e a aveia preta (*A. strigosa* Schreb), a aveia branca (*A. sativa*) e o azevém (*Lolium multiflorum*). Portanto, avaliar a capacidade de estirpes de *Bradyrhizobium*, já amplamente estudadas e recomendadas para a cultura da soja, promoverem o crescimento destas gramíneas, torna-se importante para o melhor entendimento desta associação e a produtividade das lavouras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial para a promoção de crescimento em aveia preta (*Avena strigosa* Schreb), aveia branca (*Avena sativa* L.) e azevém (*Lolium multiflorum*), das estirpes de rizóbios SEMIA 587 e 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*), 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*) e 5080 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) recomendadas para produção de inoculantes para soja no Brasil.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar a promoção de crescimento em laboratório das plântulas de aveia preta (*Avena strigosa*), aveia branca (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium multiflorum*) inoculadas com as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 587 e 5019 (*B. elkanii*), 5079 (*B. japonicum*) e 5080 (*B. diazoefficiens*);

2.2.2 Avaliar a promoção de crescimento vegetal em casa de vegetação de aveia preta (*Avena strigosa*), aveia branca (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium multiflorum*) inoculadas com as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 587 e 5019 (*B. elkanii*), 5079 (*B. japonicum*) e 5080 (*B. diazoefficiens*);

2.2.3 Avaliar a capacidade de colonização das plantas de aveia preta pelas estirpes de *Bradyrhizobium* transformadas para conter o plasmídeo pHRGFPGUS, expressando o sistema repórter GUS e a proteína verde fluorescente (GFP).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Promoção de crescimento de plantas

O nitrogênio (N) compõe cerca de 80% da atmosfera na forma gasosa de dinitrogênio (N_2), no entanto, esta forma de N não pode ser assimilada pelas plantas. Determinadas bactérias conhecidas como diazotróficas podem utilizar o N_2 para o seu próprio metabolismo realizando a redução do N_2 , por meio da enzima nitrogenase, em amônia (NH_3) que é prontamente assimilável pelas plantas e tal processo é denominado Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (NEWTON, 2000). O fato de o nitrogênio, embora abundante na natureza, não ser absorvido em sua forma gasosa pelas plantas pode torná-lo um fator limitante na agricultura (LALANDE et al, 1989), visto que é um dos macronutrientes mais importantes para a produção agrícola. Devido a isso, as formas de reposição de nitrogênio no solo são a utilização de fertilizantes nitrogenados ou a própria FBN (NEVES e RUMJANEK, 1998). Os fertilizantes nitrogenados utilizados em gramíneas como o trigo, por exemplo, constituem um dos mais altos custos da agricultura (GRAHAM e VANCE, 2000). A eficiência da FBN pode ser comprovada pela produção de soja no Brasil, que resultou no desenvolvimento de inoculantes com linhagens de bactérias denominadas rizóbios, a partir de programas para incremento da FBN (ALVES et al., 2005) e programas de seleção e recomendação de estirpes realizados nas décadas de 60 e 70 (Freire, 1977). Em 1992, quatro estirpes da bactéria *Bradyrhizobium* (SEMIA 587, 5019, 5079 e 5080) foram recomendadas para a cultura da soja e são usadas até hoje (Freire e Verneti, 1997).

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) (ou *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* -PGPR), termo proposto por Kloepper e Schroth (1978), em simbiose com plantas ou de vida livre vem sendo aplicadas em práticas agrícolas para aumentar o crescimento e a produtividade de culturas leguminosas (AHEMAD E KIBRET 2014; KHAITOV et al. 2016) e não leguminosas (ANTOUN et al. 1998; GARCÍA-FRAILE et al. 2012; ZIAF et al. 2016). Dependendo da sua capacidade de colonizar e de influenciar o crescimento vegetal, as comunidades microbianas de forma direta podem estimular a FBN, solubilizar nutrientes (principalmente ferro, enxofre e fosfatos

inorgânicos), produzir fito hormônios como as auxinas (ácido indol acético -AIA), as giberelinas e as citocininas e produzir exopolissacarídeos (CATTELAN, 1999; DOBBELAERE et al., 2003; HARA e OLIVEIRA, 2004; HAN et al., 2005; BANERJEE et al., 2006; MARRA et al., 2011; AHEMAD e KIBRET, 2014; BONILHA DA SILVA, 2016). As RPCPs também podem estimular as plantas de forma indireta: reduzindo os danos causados por fitopatógenos por mecanismos tais como produção de sideróforos, quitinases, glucanases e antibióticos (RENWICK et al., 1991). As RPCPs podem usar mais do que um destes mecanismos simultaneamente, e assim aumentar o crescimento e a produtividade vegetal (HAHN, 2013). Algumas RPCPs também colonizam, penetram e se estabelecem dentro dos tecidos vegetais, atuando como bactérias endofíticas (VESSEY 2003), sendo capazes de colonizar e sobreviver na rizosfera das raízes em condições competitivas (KLOEPPER 2003). A importância da interação que ocorre entre as RPCPs e as plantas é devido em grande parte às rizobactérias que, por um lado, desempenham papel de promotor do crescimento vegetal e, por outro lado, pelas plantas que podem exercer controle sobre a diversidade e a composição bacteriana que as cerca. A colonização da raiz pode ser vista como um dos primeiros passos durante pela qual as RPCPs expressam atividade de promoção de crescimento vegetal (KLOEPPER e BEAUCHAMP 1992).

Alguns microrganismos diazotróficos capazes de induzir a formação de nódulos radiculares através de simbiose com plantas leguminosas e fixar nitrogênio atmosférico estão distribuídos entre as α -proteobactéria, cujos gêneros mais conhecidos são *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium* e as β -proteobactéria onde se destacam os gêneros *Burkholderia* e *Crupriavidus* (ZAKHIA e LAJUDIE, 2001; VANDAMME et al., 2002; SAHGAL e JOHRI, 2003; BARRETT e PARKER, 2006). Os rizóbios são bactérias rizosféricas que podem sobreviver adequadamente no solo por mais tempo, mesmo na ausência das leguminosas hospedeiras (BATISTA et al. 2007). Como exemplo, a população de *Bradyrhizobium* com maior diversidade e capaz de nodular a soja sobreviveu em campo mantido em pousio por mais de 30 anos, mesmo sem reinoculação e na ausência das plantas hospedeiras (DOMIT et al. 1990). A capacidade dos rizóbios sobreviverem e se multiplicarem

na rizosfera tem sido explorada como uma forma alternativa de aumentar a população desejável de rizóbios no solo, inoculando sementes de cereais de inverno, antes da semeadura da soja (Domit et al. 1990). No entanto, mais do que apenas aumentar sua população no solo, a inoculação de não-leguminosas pode resultar em intensa colonização de raízes por rizóbios (SCHLOTTER et al. 1997).

Além da simbiose com leguminosas, os rizóbios também apresentam a capacidade de interação com outros tipos de plantas, como as gramíneas. O efeito benéfico da interação destas bactérias com gramíneas, já foi observado em alguns trabalhos tais como, o arroz (*Oriza sativa*) (YANNI et al, 1997; MISHRA et al., 2006; OSORIO FILHO et al., 2014), o milho (*Zea mays*) (CASSAN et al., 2009; HAHN et al., 2013; Santos, 2018), a aveia branca (*Avena sativa*) (STAJKOVIC-SRBINOVIC et al., 2014), o trigo (*Triticum aestivum*) (Santos, 2018) e o azevém (HAHN, 2013). Nas gramíneas os rizóbios podem estimular o crescimento vegetal através da produção de fito hormônios como o ácido indolacético (BISWAS et al., 2000; CHEN et al., 2005), pela solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999) e proteger as plantas contra patógenos (MISHRA et al., 2006; DUTTA et al., 2008). Os rizóbios após a penetração no sistema radicular das gramíneas realizam uma migração ascendente (YANNI et al., 1997). Células de rizóbios já foram observadas no interior de plantas não leguminosas: quatro estirpes de rizóbios, marcados com a proteína fluorescente *gfp*, infectaram os tecidos de arroz iniciando pelas raízes laterais emergentes, colonizando a extensão das raízes e ascendendo pelo colmo até as folhas (Chi et al., 2005). Também células de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, marcadas com o gene *gus*, já foram observadas dentro de folhas e no colmo de plantas de arroz inoculadas em condições assépticas (OSORIO FILHO et al., 2014).

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

seca e o teor de nitrogênio da parte aérea das plantas de azevém no tratamento consorciado ao trevo-branco quando comparada ao tratamento com cultivo exclusivo de azevém em campo.

Alguns estudos tem mostrado que a consorciação de culturas entre plantas leguminosas e não-leguminosas traz efeitos benéficos para ambas culturas, além de favorecer o aumento da população microbiana na rizosfera (YANNI et al., 1997; BARRIUSO e SOLANO, 2008; HAHN, 2013). As leguminosas forrageiras podem contribuir para aumentar a qualidade da forragem ingerida pelos animais de forma direta, quando consumidas, e indireta através do nitrogênio disponibilizado às gramíneas associadas e da conseqüente melhoria da fertilidade do solo, que promove a eficiência na ciclagem de nutrientes, já que a decomposição de resíduos vegetal é controlada principalmente pela disponibilidade de nitrogênio (N) (PENGELLY e CONWAY, 2000; LASCANO, 2002). Devido aos benefícios no crescimento e desenvolvimento de gramíneas e leguminosas por meio de diversos mecanismos (ANTOUN et al, 1998; PRITHIVIRAJ et al., 2003; PERRINE WALKER, 2007), os rizóbios tem sido estudados como uma potencial alternativa para o manejo destas plantas cultivadas em sucessão e/ou consorciação (YANNI et al., 1997, 2001; BISWAS et al., 2000; OSORIO FILHO, 2009).

3.2 Importância das aveias branca e preta

A aveia branca (*Avena sativa* L.) e a aveia preta (*A. strigosa* Schreb) são espécies de grande importância nos sistemas agrícolas, principalmente, devido ao seu forte potencial de exploração, pois são utilizadas tanto para produção de grãos quanto para pastagem (HARTWIG et al, 2006). As vantagens da aveia também se estendem à cultura posterior, reduzindo a infestação de plantas espontâneas indesejáveis devido ao efeito supressor alelopático, diminuindo assim, os custos com as capinas manual ou química (Barros, 2013). No Rio Grande do Sul (RS) a aveia é um dos principais cultivos de inverno, ocupando mais de 2 milhões de hectares, tanto de área cultivada quanto de interação lavoura-pecuária (EMBRAPA, 2018), sendo consorciada com a cultura da soja no estado do RS.

A aveia branca é um cereal que apresenta múltiplas finalidades, podendo ser utilizada na alimentação humana (por possuir um alto teor de proteínas de qualidade e fibras solúveis) e na alimentação animal (utilizada na forragem verde, feno, silagem e na composição de ração). Entretanto, a aveia branca é menos rústica que a aveia preta, por ser mais exigente em fertilidade do solo, ser menos resistente à seca, possuir alta suscetibilidade à ferrugem da folha e apresentar um ciclo mais tardio (BARROS, 2013). Enquanto que a aveia preta tem crescimento vigoroso e tolerância à acidez do solo, mas não apresenta qualidade industrial, pois a coloração de suas sementes é escura e a produção de grãos é muito reduzida. A aveia preta possui potencial para a produção de forragem, na forma de pastagem hibernal ou mesmo, como forragem conservada na forma de ensilagem e feno (FONTANELLI e PIOVEZAN, 1991), pois apresenta uma alta produção de massa seca. O cultivo da aveia preta é uma alternativa no período de outono/inverno, épocas nas quais as pastagens nativas são, muitas vezes, a principal fonte de alimentação animal. Neste período do ano, estas pastagens apresentam um crescimento reduzido, além de ficarem envelhecidas e queimadas pelas geadas. A característica mais importante em uma aveia forrageira, além de possuir boa qualidade, é a possibilidade de maior número de cortes (ou o maior número de vezes que os animais podem pastar), principalmente nas épocas de escassez. Outras características das espécies de aveia branca e preta são a rapidez de formação de cobertura e a menor suscetibilidade às moléstias (Barros, 2013). Bonilha da Silva (2016), avaliando isolados de rizóbios simbiotes de pega-pega (*Desmodium* sp.) inoculados em aveia branca (*A. sativa*) encontrou uma produção de massa seca de parte aérea estatisticamente igual ao tratamento controle com 100% da dose de N para essa planta. Stajkovic-Srbinovic et al. (2014), também estudando o efeito de algumas RPCPs como *Enterobacter*, *Bacillus* e *Pseudomonas* inoculadas em plantas de aveia branca encontrou um incremento de massa seca de parte aérea e uma maior absorção de nutrientes nos tratamentos inoculados com estas bactérias.

3.3 Importância do azevém

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma gramínea anual de inverno, de hábito de crescimento cespitoso, que pode atingir até 1,20 m de altura

(DERPSCH e CALEGARI, 1992). Provavelmente é originário do norte da Itália (SPEDDING e DIEKMAHNS, 1972) e foi trazido ao Brasil por colonizadores italianos que chegaram ao RS (ARAÚJO, 1978). Por ter raízes superficiais, o azevém é sensível à seca e ao encharcamento, preferindo solos de textura média (FONTANELI et al., 2012). O desenvolvimento mais vigoroso ocorre nos climas temperados no final do inverno e início da primavera, podendo ser cultivado em todo o RS (Fontaneli, 1984). Quanto ao rendimento, é uma excelente forrageira, produzindo até 25 toneladas de massa verde por hectare, de boa palatabilidade e bom valor nutritivo (KISSMANN, 1997). Os estudos que analisam o efeito dos rizóbios em plantas de azevém são escassos. Porém, Machado (2011) analisando rizóbios do banco de estirpes da UFGRS inoculados em plantas de azevém não encontrou diferenças estatisticamente significativas nem na massa seca de parte aérea, nem no número de perfilhos nem no acúmulo de nitrogênio de parte aérea quando comparadas ao tratamento controle apenas com N.

3.4 *Azospirillum* e a co-inoculação com rizóbios

A interação *Azospirillum*-planta proporciona benefício para o desenvolvimento vegetal, que é atribuído à produção de fito hormônios (auxinas, giberelinas e citocininas) os quais proporcionam maior crescimento radicular (Okon & Vanderleyden, 1997). Ocorre aumento da superfície de absorção das raízes da planta e aumento do volume da área do solo explorado, e por consequência maior absorção de água e nutrientes (Correa et al., 2008) resultando em plantas mais vigorosas e produtivas (Bashan et al., 2004; Hungria, 2011). A colonização ocorre na superfície e/ou do interior das raízes e parte aérea das plantas. Assim, a contribuição da FBN por espécies associativas, como o *Azospirillum*, na nutrição vegetal não é tão significativa como ocorre na simbiose entre rizóbios e leguminosas, visto que, bactérias associativas excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta, suprimindo apenas parcialmente as necessidades das plantas (Hungria et al., 2010).

A inoculação é a técnica agrícola de manipulação de RPCPs e o produto contendo as estirpes bacterianas é denominado inoculante. Uma alternativa recentemente explorada no Brasil é a mistura de inoculantes contendo RPCPs,

uma técnica definida como co-inoculação (Hungria et al., 2013). Essa metodologia já é uma recomendação oficial proposta pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) desde o ano 2016, para espécies leguminosas. Os inoculantes utilizados na agricultura a base de *Azospirillum* são amplamente estudados em culturas de arroz (Pedraza et al., 2009; Reichemback et al., 2011, Hahn, 2013), milho (Quadros, 2009; Hungria et al., 2010; Marini et al., 2015; Muller et al., 2016), e trigo (Hungria, 2011), e recentemente foi avaliado o efeito da co-inoculação entre rizóbios e essas mesmas culturas (Santos, 2018). Entretanto, não se conhece ainda o efeito da inoculação de *Azospirillum* em plantas de aveia e azevém nem mesmo o efeito que a co-inoculação com *Bradyrhizobium* sp. pode causar nessas plantas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As estirpes bacterianas de *Bradyrhizobium* estudadas foram fornecidas pela Coleção SEMIA de Rizóbios do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande do Sul: SEMIA 587 e 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*) SEMIA 5079 (*B. japonicum*) e SEMIA 5080 (*B. diazoefficiens*). As estirpes de *Azospirillum* sp. Ab-v5 e Ab-v6 foram obtidas a partir de inoculante comercial líquido (Simbiose) lote 2018. Todas as estirpes bacterianas foram mantidas no Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As sementes de aveia preta da variedade Embrapa 139, foram obtidas na agropecuária Querência. As sementes de aveia branca (URS Altiva) e Azevém (LE-284) foram fornecidas pelo Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS.

4.1 Avaliação do efeito da inoculação das estirpes SEMIA 587,5019, 5079 e 5080 sobre a germinação de sementes de aveia branca (*A. sativa*), aveia preta (*A. strigosa*) e azevém (*L. multiflorum*).

O experimento para a avaliação da germinação de sementes de aveia preta, aveia branca e azevém inoculadas com as estirpes bacterianas foi

composto por cinco tratamentos: plantas inoculadas com a SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079, SEMIA 5080 e o tratamento controle sem inoculação. As sementes foram previamente lavadas e desinfestadas com álcool 70% durante trinta segundos, seguido de hipoclorito 1% durante trinta segundos e 10 lavagens com água destilada esterilizada. As estirpes de *Bradyrhizobium* foram multiplicadas em caldo Levedura Manitol (LM) sob agitação (120 rpm) a 28°C durante sete dias. Trinta sementes de cada planta (aveia preta, branca e azevém) foram inoculadas com uma densidade celular de $1,1 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹, distribuídas em rolos de papel filtro 28 x 38cm. Estas permaneceram durante sete dias em câmaras de crescimento vegetal (MANGELSDORF–MODELO 290L) com temperatura mantida a 20°C, fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e umidade relativa de 90%. As avaliações da germinação foram diárias para a determinação do índice de velocidade de germinação (%IVG), o qual é 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). O tempo médio de germinação (TMG) também foi avaliado, sendo calculado pela soma da multiplicação da emergência das sementes a cada dia dividido pela emergência absoluta das sementes. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições de cada tratamento. Os índices foram avaliados estatisticamente pelo teste de *Scott-knott* $p < 0,05$.

4.2 Avaliação da promoção de crescimento em plântulas de aveia branca, aveia preta e azevém inoculadas com as estirpes de *Bradyrhizobium*

Para a avaliação do crescimento das raízes de plântulas de aveia branca, aveia preta e azevém, as sementes foram previamente desinfestadas como descrito no item 4.1 e pré-germinadas em papel filtro. Posteriormente a germinação, as plântulas foram retiradas do papel filtro, e transferidas para tubos contendo solução nutritiva estéril (SARRUGE, 1975) e ágar 2,5%. Apenas uma semente pré-germinada foi colocada por tubo, totalizando 120 repetições dos tratamentos inoculados com as estirpes SEMIA 587, 5019, 5079, 5080 e

tratamento controle sem inoculação. As plântulas permaneceram incubadas a 20°C em lampadário com fotoperíodo 12h claro 12h escuro. Na avaliação do experimento, as raízes foram coradas com azul de metileno a 1% e escaneadas em impressora (HP 1610 *all in one*) conforme metodologia adaptada de Moraes (2017). A adaptação na metodologia foi a utilização de azul de metileno para dar contraste as raízes, pois como as raízes analisadas por Moraes (2017), foram coletadas do solo, apresentavam coloração, enquanto as analisadas nesse experimento eram translúcidas. A partir das imagens geradas, as plântulas foram analisadas no programa Safira 2.0 (JORGE e SILVA, 2010) quanto ao comprimento, volume e área das raízes. Posteriormente, as plântulas foram secas em estufa a 60°C até a obtenção da massa constante para o cálculo da massa seca. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) e todos os dados foram avaliados pelo teste de *Scott-Knott* a nível de 95% de significância.

4.3 Avaliação da capacidade de promoção de crescimento em plantas de aveia branca (*A. sativa*), aveia preta (*A. strigosa*) e azevém (*L. multiflorum*) inoculadas e cultivadas em vasos em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Solos da UFRGS, em Porto Alegre/RS. Foram utilizados vasos plásticos de 3kg que foram previamente lavados e desinfestados. Utilizou-se substrato composto por mistura de vermiculita e areia na proporção de 2:1 e esterilizado por autoclavagem. O experimento foi analisado separadamente para cada uma das plantas. Os tratamentos das diferentes gramíneas foram inoculados com a SEMIA 587, a SEMIA 5019, a SEMIA 5079, a SEMIA 5080 e *Azospirillum* sp. estirpes Ab-v5 e Ab-v6 via inoculante comercial (Simbiose, Lote 2018) e um tratamento controle sem inoculação. Para cada planta, foram semeadas cinco sementes desinfestadas e pré-germinadas, conforme descrito no item 4.1. As plantas foram irrigadas com solução nutritiva estéril (SARRUGE, 1975) sem adição de nitrogênio, pois a solução com nitrogênio foi feita separadamente. Todos os tratamentos receberam a mesma dose de nitrogênio (NH_4NO_3) equivalente à $40 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. No total foram catorze aplicações separadas de solução nutritiva e de nitrogênio durante o período de 50 dias. A inoculação dos

tratamentos foi a partir de uma alíquota de 1 mL do inóculo bacteriano de $1,1 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ previamente multiplicado em laboratório nas mesmas condições do item 4.1, e foi adicionado a cada vaso uma única vez.

Na colheita, a parte aérea das plantas foi separada do sistema radicular, as raízes foram lavadas e o volume total das raízes foi verificado pelo método de proveta (SIENKO e PLANE, 1972) utilizando um volume conhecido e inserindo a raiz ainda fresca e para a medição do deslocamento de água. Bem como pelo método utilizando o programa Safira 2.0 conforme descrito no item 4.2. Posteriormente, a parte aérea e as raízes foram colocadas em sacos de papel e seco em estufa a 60°C com ventilação forçada até a obtenção constante de massa seca e posteriormente à secagem a parte aérea foi moída. O teor de nitrogênio total na parte aérea foi determinado pela metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). Para o cálculo das quantidades de nitrogênio absorvidas pelas plantas, multiplicou-se os valores de matéria seca pelo teor deste elemento no tecido vegetal. O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado (DIC) e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância analisados por *Scott-knott* ($p < 0,05$).

4.4 Transformação das estirpes de *Bradyrhizobium* através da inserção do plasmídeo *pHRGFPGUS*

A transformação das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 587 e 5019 (*B. elkani*), 5079 (*B. japonicum*) e 5080 (*B. diazoefficiens*) ocorreu através da conjugação triparental com uma linhagem de *E. coli* DH5 α com dois plasmídeos distintos: o *pHRGFPGUS* (RAMOS, 2002) e o *pRK2013* (DITTA et al, 1980). O *pHRGFPGUS* possui dois marcadores: o *gfp* (*green fluorescent protein*) obtido da alga *Aequorea victoria* (PRASHER et al, 1992) expressa a cor verde e o gene *gusA* que codifica a β -glucuronidase (GUS) expressa a cor azul. Enquanto o outro plasmídeo *pRK2013* (DITTA et al, 1980) possui genes envolvidos no auxílio (*helper*) da transferência dos genes (*gfp* e *gusA*), bem como a resistência à canamicina. A conjugação ocorreu segundo a metodologia de HOWIESON e DILWORTH (2016) e a seleção das colônias transformadas foi realizada em meio Luria Bertani (LB) acrescido de X-gluc 40 μ g ml⁻¹ e adicionado de ampicilina

(150µg ml⁻¹). Para selecionar as estirpes SEMIA 587, 5019 e 5079 foi necessário adicionar ácido nalidíxico (50µl ml⁻¹) ao meio com ampicilina. Enquanto que para a estirpe SEMIA 5080, o antibiótico usado para a seleção dos mutantes foi a vancomicina (50 µl ml⁻¹). Para a quantificação da expressão do *gfp* nas estirpes de *Bradyrhizobium* transformadas foi realizada a leitura em fluorímetro com o comprimento de onda de 510nm, juntamente com um controle que eram as bactérias não transformadas no mesmo meio de cultura.

4.5 Avaliação da capacidade de colonização das plantas de aveia preta (*A. strigosa*) pelas estirpes de *Bradyrhizobium* transformadas

Para a avaliação da capacidade de colonização das plantas de aveia preta (*A. strigosa*) pelas estirpes de *Bradyrhizobium* transformadas, foi realizada a desinfestação das sementes e estas foram pré-germinadas nas mesmas condições descritas no item 4.1 e após foram colocadas em tubos de ensaio de 25cm de comprimento e 2,4 cm de diâmetro contendo solução nutritiva estéril (SARRUGE, 1975), com uma tira dupla dobrada de papel absorvente para apoiar a semente. O experimento contou com 4 repetições dos tratamentos inoculados com SEMIA 587, 5019, 5079, 5080, controle sem inoculação, controle com inoculação das SEMIA 587, 5019, 5079 e 5080 sem transformação. Bem como o controle “positivo” inoculando cada SEMIA em soja (*Glycine max*). Os tratamentos inoculados continham um inóculo de 1,3x10⁹ UFC.ml⁻¹ crescido inicialmente em meio LB líquido contendo os antibióticos específicos e incubados durante 7 dias a 28°C. Para a inoculação, 2ml foram centrifugados a 120rpm por 3 minutos para formar um precipitado que foi lavado duas vezes com solução salina 0,85% para a retirada dos antibióticos. As plantas foram mantidas a 23°C em câmara de crescimento vegetal com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro durante 15 dias. Aos 15 dias foram realizadas avaliações em microscópio de fluorescência (ZEISS, Imager. D2) com câmera acoplada (ZEISS, AxioCam MRc) para a visualização do *gfp* e em microscópio de contraste de fase para a visualização do *gus*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do efeito da inoculação das estirpes SEMIA 587, 5019, 5079 e 5080 sobre a germinação de sementes de aveia branca (*A. sativa*), aveia preta (*A. strigosa*) e azevém (*L. multiflorum*).

O número de sementes germinadas foi registrado durante o período de incubação para a determinação do índice de velocidade de germinação (IVG) e do tempo médio de germinação (TMG), mostrados na Tabela 1 e Figuras 1 e 2. As raízes das plantas de azevém não puderam ser avaliadas, pois foram perdidas na colheita devido ao fato de serem muito frágeis, ocorrendo a adesão ao papel filtro e a consequente ruptura. Os resultados mostraram que as sementes de aveia branca inoculadas com a estirpe SEMIA 587, apresentaram um IVG maior que os demais tratamentos, diferindo das sementes do controle sem inoculação. Em relação ao TMG as sementes de aveia branca inoculadas não diferiram do controle sem inoculação (Tabela 1).

Tabela 1. Índice de velocidade de germinação (IVG%) e tempo médio de germinação (TMG dias) de sementes de aveia branca (AB), aveia preta (AP) e azevém (AZ), inoculadas com as estirpes SEMIA 587 e 5019 (*B. elkanii*), 5079 (*B. japonicum*) e 5080 (*B. diazoefficiens*).

Tratamentos inoculados	Aveia Branca		Aveia Preta		Azevém	
	IVG (%)**	TMG (dias) ns	IVG (%)**	TMG (dias) ns	IVG (%)*	TMG (dias) ns
SEMIA 587	32,09 a ±3,59	3,08 ±0,86	40,38 a ±1,6	2,02 ± 0,24	24,63 a ± 4,84	4,49 ±1,6
SEMIA 5019	21,29 c ± 5,75	5,38 ± 0,69	37,85 a ± 3,3	1,96 ± 0,23	19,16 b ± 2,8	5,96 ±3,5
SEMIA 5079	27,79 b ± 3,23	2,45 ± 0,9	31,08 c ± 0,83	2,07 ± 0,69	27,59 a ± 7,7	2,96 ±0,7
SEMIA 5080	29,49 b ± 5,53	4,84 ±1,87	36,15 b ±3,5	1,97 ± 0,44	26,20 a ± 4,14	3,29 ±0,96
Controle	23,64 b ± 1,51	3,52 ± 0,63	36,40 b ± 5,13	2,19 ± 0,67	18,24 b ± 3,51	4,8 ±1,13

CV 5,18 11,96 8,97 21,95 18,77 36,89

Médias (120 repetições) agrupadas pela mesma letra na coluna não diferem entre si para o teste de *Scott-knott* ($p < 0,10$) * significativo para $p < 0,1$ **Significativo para $p < 0,05$; ns=valores não foram significativos.

CV = coeficiente de variação

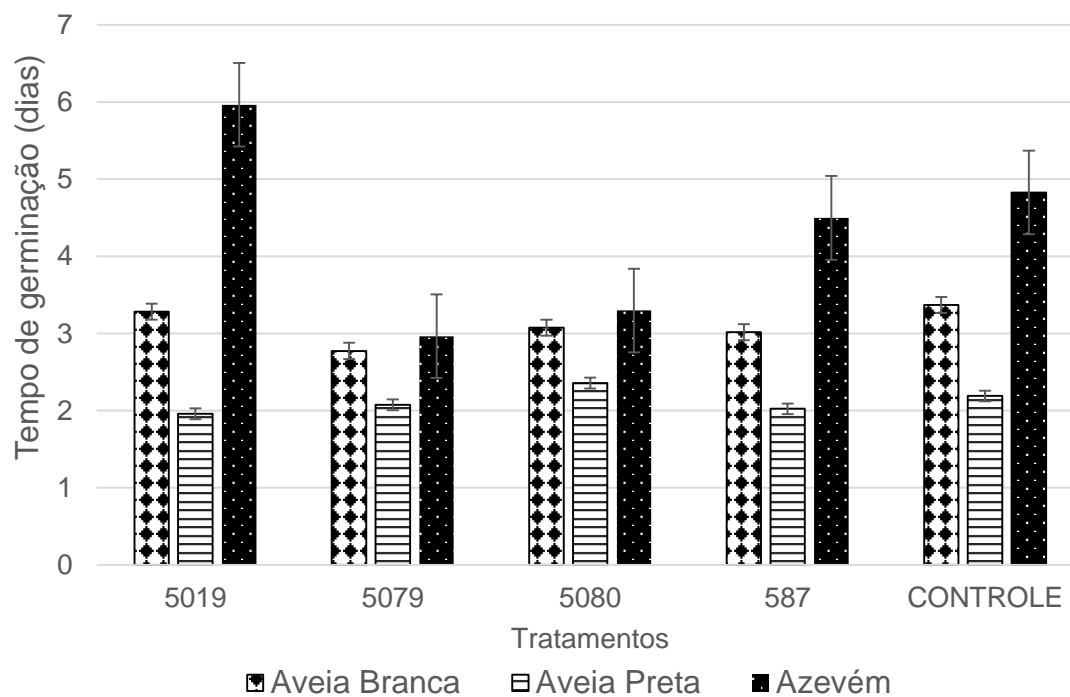


Figura 1: Tempo médio de germinação de sementes de aveia branca, aveia preta e azevém inoculadas com as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 587 e 5019 (*B. elkani*), 5079 (*B. japonicum*) e 5080 (*B. diazoefficiens*).

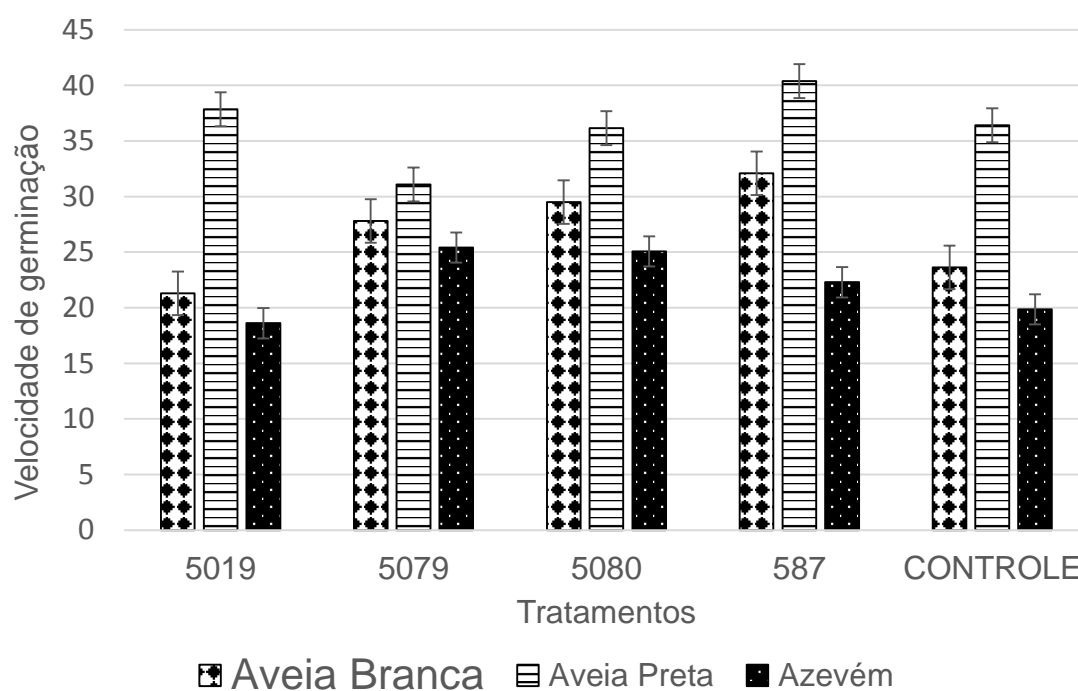


Figura 2. Índice de velocidade de germinação (IVG%) de sementes de aveia branca, aveia preta e azevém inoculadas com as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 587 e 5019 (*B. elkanii*), 5079 (*B. japonicum*) e 5080 (*B. diazoefficiens*).

Para as sementes de aveia preta, aquelas inoculadas com as estirpes SEMIA 587 e 5019 apresentaram uma maior velocidade de germinação (%IVG), no entanto, não se verificou diferenças em relação ao TMG (Tabela 1, Figura 1). No caso das sementes de azevém, os tratamentos inoculados com as estirpes SEMIA 5080, 5079 e 587 apresentaram um maior IVG, diferindo do obtido no tratamento controle (Tabela 1, Figura 2). Os resultados mostraram que existe efeito da inoculação com rizóbios sobre a germinação dessas sementes. Resultados semelhantes foram obtidos por Osório Filho (2009) que demonstrou resultados positivos em plantas de arroz inoculadas com rizóbios. Bonilha da Silva (2016) estudando o efeito da germinação de rizóbios nativos isolados de nódulos de *Desmodium* sp. em plantas de arroz e trigo, verificou que o efeito da inoculação foi significativo também em plantas de arroz. O efeito de algumas estirpes de *Rhizobium* foram observados desde a germinação até a produção

de grãos em lavouras de arroz (Chi et al., 2005). Estas bactérias foram capazes de estimular o comprimento da radícula além de ampliar a área foliar, a matéria seca da parte aérea e a absorção de nitrogênio (BISWAS et al., 2000). Machado (2011), avaliando a germinação em plantas de azevém observou que todos os tratamentos inoculados com rizóbios SEMIA 816, UFRGS L-524 e UFRGS Lc-111 aceleraram a germinação a partir do segundo dia após a inoculação, quando comparadas ao grupo controle.

5.2 Avaliação da promoção de crescimento em plântulas de aveia branca, aveia preta e azevém inoculadas com as estirpes de *Bradyrhizobium*

As plântulas estudadas neste experimento foram obtidas a partir de sementes inoculadas e cultivadas em tubos de ensaio em lampadário. Das 120 repetições de cada tratamento, 80 foram avaliadas, número mínimo igual para todos os tratamentos quanto aos parâmetros radiculares: volume, área e comprimento de raiz. Avaliou-se a eficiência da promoção de crescimento em plântulas de aveia branca e aveia preta inoculadas com as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 587 e 5019 (*B. elkanii*), 5079 (*B. japonicum*) e 5080 (*B. diazoefficiens*) observada a partir das análises das raízes (Figuras 3 e 4).

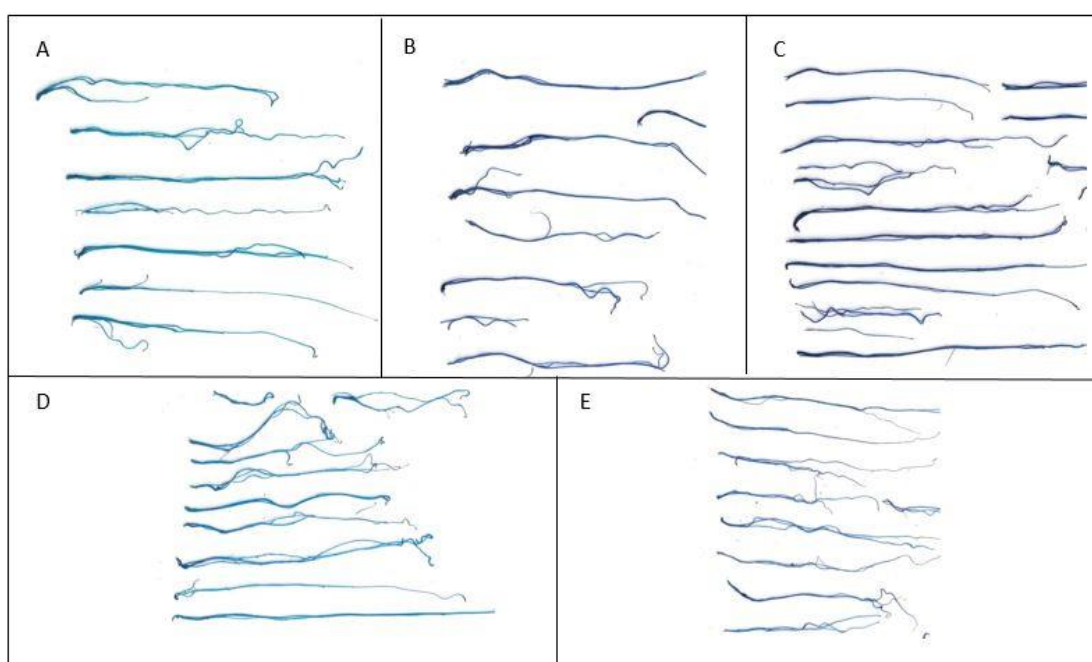


Figura 3. Raízes de plântulas de aveia branca com sete dias de crescimento inoculadas com rizóbios A) SEMIA 587; B) SEMIA 5019; C) SEMIA 5079; D) SEMIA 5080 E) CONTROLE (sem inoculação).

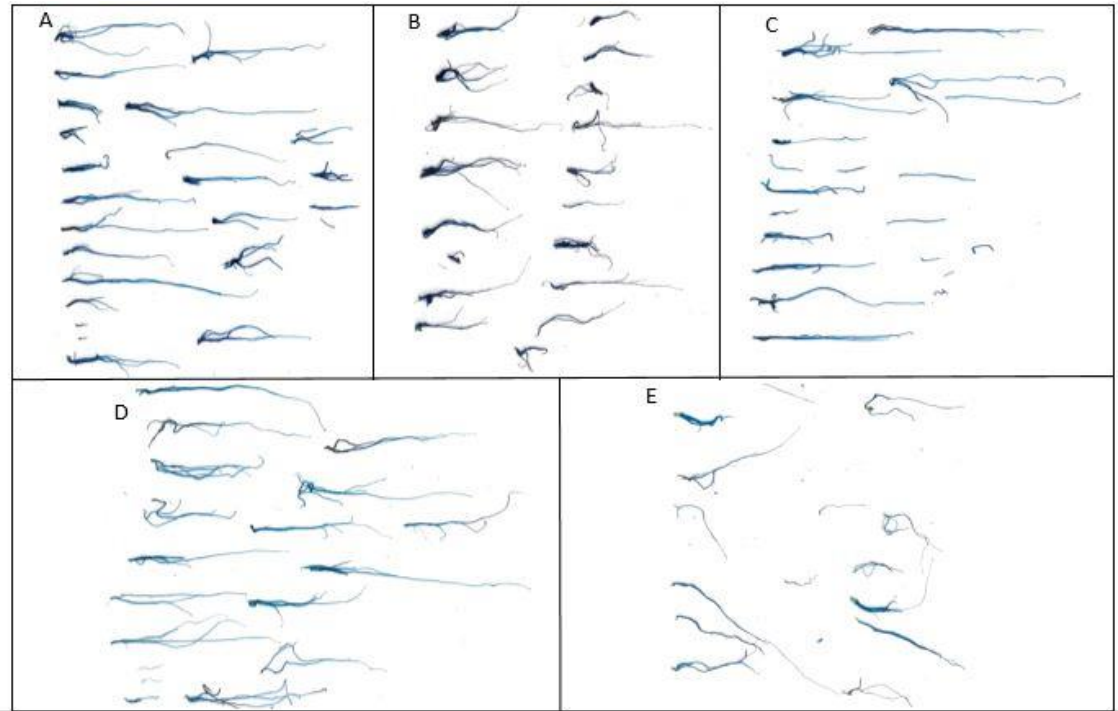


Figura 4. Raízes de plântulas de aveia preta com sete dias de crescimento inoculadas com rizóbios A) SEMIA 587; B) SEMIA 5019; C) SEMIA 5079; D) SEMIA 5080 E) CONTROLE (sem inoculação)

Os parâmetros radiculares mostraram que as plantas de aveia branca inoculadas com as estirpes SEMIA 587 e 5080 proporcionaram um comprimento (mm) e uma área (mm²) estatisticamente superior ao tratamentos inoculados com as demais estirpes, entretanto estatisticamente iguais ao controle pelo teste estatístico de *Scott-Knott* (Tabela 2). As estirpes que influenciaram no volume (mm³) de raiz, foram as SEMIA 5079 e 5080, estatisticamente distintas do controle e das demais estirpes. Para as plantas de aveia preta as sementes inoculadas com as estirpes SEMIA 5079 e 5080 aumentaram o crescimento de raiz quando comparadas ao controle, sendo estatisticamente distintas. As sementes inoculadas com as estirpes SEMIA 587, 5079 e 5080 aumentaram o volume e a área de raiz quando comparadas ao controle (Tabela 2). As plantas de azevém não tiveram suas raízes analisadas, pois penetraram no papel filtro e houve o rompimento no momento da retirada. Outros estudos que avaliaram a interação entre gramíneas e rizóbios e que obtiveram resultados positivos no crescimento radicular, também encontraram resultados semelhantes (MACHADO, 2011; BONILHA DA SILVA, 2016).

Tabela 2. Comprimento, volume, área superficial e massa seca das raízes de aveia branca e aveia preta inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587, 5019), *B. japonicum* (SEMIA 5079) e *B. diazoefficiens* (SEMIA 5080) após sete dias de crescimento.

Tratamentos inoculados	Aveia Branca				Aveia Preta			
	Comprimento (mm)*	Volume (mm ³)*	Área (mm ²)*	MSR (mg) ns	Comprimento (mm)*	Volume (mm ³)*	Área (mm ²)*	MSR (mg)*
SEMIA 587	137,08 a ± 26,29	33,84 b ± 3,01	203,14 a ± 8,99	59,60 ± 6,05	73,90 b ± 3,96	21,82 a ± 4,31	115,51 a ± 15,30	39,30 a ± 16,64
SEMIA 5019	86,24 b ± 1,56	31,06 b ± 11,53	157,21 b ± 34,28	39,60 ± 4,60	29,30 c ± 10,17	9,62 b ± 3,00	45,92 b ± 13,98	17,10 b ± 4,92
SEMIA 5079	101,30 b ± 49,05	38,14 a ± 18,70	192,21 b ± 94,69	53,17 ± 1,79	91,61 a ± 37,79	24,04 a ± 8,00	140,62 a ± 54,18	16,87 b ± 0,67
SEMIA 5080	130,58 a ± 36,47	40,59 a ± 16,33	223,56 a ± 74,42	52,23 ± 15,53	78,14 a ± 7,59	22,29 a ± 1,49	122,87 a ± 7,49	27,53 b ± 2,28
Controle	116,46 a ± 12,65	31,72 b ± 6,12	186,59 b ± 26,58	52,13 ± 8,79	58,43 b ± 25,14	12,91 b ± 4,43	80,32 b ± 32,48	20,67 b 7,84
CV	9,47	15,6	15,3	17,42	10,65	19,18	12,27	34,85

*Médias (80 repetições), valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si para o teste de Scott-Knott ($p < 0,01$);

ns = não significativo

CV = coeficiente de variação

5.3 Avaliação da capacidade de promoção de crescimento em plantas de aveia branca (*A. sativa*), aveia preta (*A. strigosa*) e azevém (*L. multiflorum*) inoculadas e cultivadas em vasos em casa de vegetação

A eficiência de inoculação com rizóbios estudados foi avaliada em experimento em casa de vegetação nas plantas de aveia branca (*A. sativa*) cultivadas em condições assépticas em vasos de 3kg, sendo avaliados: a massa seca da parte aérea (MSPA), a massa seca da raiz (MSR) e o teor de nitrogênio de parte aérea e o volume de raiz. Para os dados de MSPA, MSR e N foi possível observar que os valores médios do tratamento inoculado com *Azospirillum* sp. para as plantas de aveia branca foram maiores, sendo estatisticamente significativos os dados de massa seca (Tabela 3).

Tabela 3. Produção de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR), nitrogênio acumulado (N) de parte aérea e o volume de raiz das plantas de aveia branca (*A. sativa*) inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium*.

Tratamentos	Aveia Branca		
	MSPA* (g)	MSR** (g)	N total (mg) ns
SEMIA 587	4,01 b ± 0,72	2,52 b ± 0,29	69,62 ± 8,08
SEMIA 5019	3,85 b ± 0,44	2,50 b ± 0,37	67,43 ± 12,44
SEMIA 5079	4,04 b ± 0,53	2,61 b ± 0,53	70,16 ± 11,4
SEMIA 5080	3,68 b ± 0,36	2,30 b ± 0,20	67,2 ± 12,0
<i>Azospirillum</i> sp.	4,54 a ± 0,57	3,31 a ± 0,39	79,4 ± 10,8
Controle	3,88 b ± 0,59	2,59 b ± 0,24	69,6 ± 11,8
CV %	10,03	13,23	15,31

* médias significativas para $p < 0,10$; ** médias significativas para $p < 0,05$; ns= não significativos no teste de *Scott-Knott*.

Os resultados obtidos mostraram que as plantas de aveia branca são influenciadas pelo fato de *Azospirillum* sp. ser conhecido como promotor de crescimento vegetal em gramíneas, principalmente pela sua capacidade de fixar nitrogênio e de produzir fito hormônios (BALDANI e BALDANI, 2005; PERRIG et al., 2007). Estudos envolvendo a inoculação de *Azospirillum* tem apresentado efeitos significativos no crescimento, desenvolvimento e produtividade de importantes culturas agrícolas (DARTORA, 2016). Santos (2018) trabalhando com plantas de milho observou em que a inoculação dos rizóbios ou a co-inoculação como *Azospirillum* não altera o número de espigas, produção de grãos por espiga e peso de 100 grãos de plantas de milho inoculadas. E ainda que, a inoculação com os rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348, isolada ou combinada com *Azospirillum* mantém a produção de grãos de milho com 50% da dose nitrogenada recomendada. Esse benefício para a planta é atribuído à produção de auxinas, giberelinas e citocininas as quais proporcionam um aumento no crescimento radicular (OKON e VANDERLEYDEN, 1997). Gupta (2017), na Índia, avaliaram o efeito da inoculação de isolados da rizosfera de plantas de trigo e milho (não identificados no estudo), em plantas de aveia branca (*A. sativa*). Os resultados obtidos foram que os isolados tinham características de promoção de crescimento como a produção de auxina e sideróforo, solubilizaram fósforo e aceleraram a germinação da aveia branca, bem como estimularam o crescimento das raízes quando comparados com o controle sem inoculação.

5.4 Avaliação das plantas de aveia preta (*A. strigosa*) inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* cultivadas em casa de vegetação

Os resultados obtidos em casa de vegetação para as plantas de aveia preta foram significativamente distintos para as plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 587 para o parâmetro de MSPA (Tabela 4). Isso demonstra um incremento na parte aérea ocasionado por uma estirpe de rizóbio simbiote de soja. A estirpe de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 foi isolada de soja da região de Santa Rosa/RS em 1968 e pela sua alta eficiência simbiótica e alta competitividade foi recomendada como inoculante para soja (FREIRE, 1977). Um estudo mais recente aponta para a capacidade dessa estirpe em produzir sideróforos, que são metabólitos secundários altamente eletronegativos e de alta afinidade por Fe^{3+} ,

sendo produzidos por diversos microrganismos sob condições de indisponibilidade de ferro no ambiente (AMBROSINI, 2009). STAJKOVIC-SRBINOVIC et al, (2014), trabalhando com RPCP dos gêneros *Enterococcus*, *Bacillus* e *Pseudomonas* em aveia branca em casa de vegetação verificou incremento de parte aérea no tratamento controle de metade da dose de nitrogênio recomendada. Bonilha da Silva (2016), também em casa de vegetação observou que os tratamentos inoculados com rizóbios isolados de *Desmodium* sp., aumentaram a massa seca de parte aérea nas plantas de aveia branca juntamente ao tratamento controle com 100% da dose de N recomendada. Em contra partida, Machado (2011), em plantas de aveia preta cultivadas em casa de vegetação, avaliou rizóbios do banco de estirpes da UFRGS inoculados isoladamente, sendo uma delas identificada como *Bradyrhizobium* sp. (UFRGS Lc 394) e inoculados juntamente com estirpes de *Trichoderma* e encontrou que a MSPA foi maior nos tratamentos inoculados com rizóbios e co-inoculados com o fungo que nos tratamentos controle sem inoculação e com o dobro da dose de nitrogênio. Essa característica de aumento de biomassa de parte aérea já foi encontrada em outros estudos com gramíneas inoculadas com rizóbios. Osório Filho (2009), em plantas de arroz observou que o isolado UFRGS-VP16 se destacou por estimular crescimento de parte aérea em 21% sem aplicação de nitrogênio. Bonilha da Silva (2016) encontrou um incremento de parte aérea nos tratamentos inoculados com rizóbios nas plantas de arroz. Machado (2011), em plantas de capim pensacola (*Paspalum sauriae*) inoculadas com rizóbios do banco de estirpes UFRGS Lc134, Lc336 e Lc394 encontrou massa seca superior ao tratamento controle com 50% da dose de N, entretanto se igualaram ao tratamento com 100% de N e o mesmo ocorreu para as plantas de capim Tanzânia no mesmo estudo.

Tabela 4. Produção de massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), nitrogênio acumulado (N) de parte aérea e volume de raiz das plantas de aveia preta (*A. strigosa*) inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium*.

Tratamentos	Aveia Preta		
	MSPA* (g)	MSR (g) ns	N total (mg) ns

SEMIA 587	5,01 a	2,38	94,0
	± 0,19	± 0,43	± 17,6
SEMIA 5019	4,77 b	3,10	84,4
	± 0,49	± 0,46	±11,4
SEMIA 5079	4,59 b	2,61	75,7
	± 0,66	± 0,4	±8,4
SEMIA 5080	4,52 b	2,16	88,8
	± 0,45	± 0,55	±12,8
<i>Azospirillum</i> sp.	4,64 b	2,80	88,9
	± 1,08	± 0,44	±23,4
Controle	4,49 b	2,24	83,0
	± 0,57	± 0,52	±3,9
CV %	7,96	23,39	23,63

* médias significativas para $p < 0,10$ ns= Médias não significativas no teste de *Scott-Knott* para $p < 0,05$.

5.5 Avaliação das plantas de azevém (*L. multiflorum*) inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* cultivadas em casa de vegetação

A eficiência da inoculação dos rizóbios estudados foi avaliada em experimento em casa de vegetação com plantas de azevém (*L. multiflorum*) cultivadas em condições assépticas em vasos de 3kg, sendo avaliados: a massa seca da parte aérea (MSPA), a massa seca da raiz (MSR), o teor de nitrogênio de parte aérea (Tabela 5) e o volume de raiz (Tabela 6). Para os dados de MSPA, foi possível observar que os valores médios do tratamento inoculado com *Azospirillum* sp. foram estatisticamente maiores. Enquanto que para os parâmetros de MSR, não houve diferença estatística. Para o nitrogênio acumulado na parte aérea, houve diferença estatística para as plantas inoculadas com *Azospirillum* sp. Não houve diferenças para volume de raiz entre os tratamentos inoculados e não inoculados.

Machado (2011) estudando plantas de azevém inoculadas com rizóbios do banco de estirpes da UFRGS, obteve resultados de experimento em casa de vegetação onde não houve aumento de massa seca de parte aérea quando comparadas ao tratamento utilizando a mesma dose de nitrogênio utilizada nesse trabalho. No entanto, no tratamento inoculado com o isolado UFRGS Lc323

observou-se um maior volume radicular em comparação ao tratamento controle com a mesma dose de nitrogênio utilizada nesse estudo, porém este incremento no volume radicular das plantas não ocasionou um maior acúmulo de N total da parte aérea.

Tabela 5. Produção de massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), nitrogênio acumulado (N) de parte aérea das plantas e volume de raiz de azevém (*L. multiflorum*) inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium*.

Tratamentos	Azevém		
	MSPA* (g)	MSR (g) ns	N total ** (mg)
SEMIA 587	3,52 b ± 0,39	3,68 ± 0,32	75,4 b ± 7,6
SEMIA 5019	3,47 b ± 0,68	2,19 ± 0,57	66,1 b ± 27,9
SEMIA 5079	3,88 b ± 1,18	3,58 ± 0,88	71,1 b ± 11,4
SEMIA 5080	3,61 b ± 0,26	3,13 ± 0,3	78,0 b ± 8,2
<i>Azospirillum</i> sp.	4,50 a ± 0,38	2,85 ± 0,58	97,4 a ± 8,8
Controle	3,57 b ± 0,27	3,46 ± 0,27	80,0 b ± 9,4
CV %	10,02	41,31	15,77

* médias significativas para $p < 0,10$; **médias significativas para $p < 0,05$; ns= Médias não significativas no teste de *Scott-knott* para $p < 0,05$.

Tabela 6: Volume de raiz avaliados após a inoculação das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 587 e 5019 (*B. elkanii*), 5079 (*B. japonicum*) e 5080 (*B.*

Tratamentos	Aveia Branca ns		Aveia Preta ns		Azevém	
	Volume (cm ³)	Proveta (cm ³)	Volume (cm ³)	Proveta (cm ³)	Volume (cm ³)*	Proveta (cm ³)
SEMIA 587	46,5 ±25,1	20,4 ± 3,5	36,49 ±11,99	14,6 ± 3,04	83,86 a ±27,87	16,8 ± 4,6
SEMIA 5019	61,3 ± 34,7	20,2 ± 3,9	51,26 ±9,92	17,6 ± 2,7	55,87 b ±49,97	18,8 ± 5,5
SEMIA 5079	72,5 ±45,9	20,4 ± 3,5	48,72 ±15,34	16,4 ± 2,07	58,95 b ±16,01	19,6 ± 5,07
SEMIA 5080	57,8 ±22,4	20,4 ± 2,4	52,36 ±24,00	16,8 ± 2,75	43,52 b ±9,07	19,4 ± 9,07
<i>Azospirillum</i>	54,8 ±25,8	21,6 ± 2,7	30,88 ±17,08	15,6 ± 1,34	58,01 b ±24,27	16,6 ± 5,02
Controle	44,2 ±24,8	18,6 ± 2,4	40,71 ±24,28	14 ± 1,5	72,58 b ±27,92	16,8 ± 4,6
CV %	54,9	15,56	45,68	15,34	37,09	17,82

diazoefficiens) nas plantas de aveia e azevém cultivadas em casa de vegetação.

* médias significativas; ns= Médias não significativas no teste de *Scott-knott* para $p < 0,05$.

5.6 Avaliação da transformação das estirpes de *Bradyrhizobium* a partir da inserção do plasmídeo *pHRGFPGUS*

O resultado dos testes de resistência e suscetibilidade das estirpes bacterianas juntamente com as estirpes de *E. coli* DH5 α *pHRGFPGUS* e *E. coli* DH5 α *pRK2013* mostraram que as linhagens de *Bradyrhizobium* SEMIA 587, 5019 (*B. elkanii*) e 5079 (*B. japonicum*) são resistentes aos antibióticos rifampicina, tetraciclina, canamicina, eritromicina, carbenicilina até 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e ácido nalidíxico até 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, sendo suscetíveis à ampicilina a partir de 150 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Enquanto que a SEMIA 5080 (*B. diazoefficiens*) apresentou resistência aos mesmos antibióticos das demais SEMIAs com exceção do ácido nalidíxico, na qual foi suscetível. Em contrapartida, a SEMIA 5080 foi resistente à vancomicina até 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Tabela 7). Para as linhagens de *E. coli* DH5 α , estas apresentaram resistência à rifampicina, tetraciclina, canamicina, neomicina até 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e suscetibilidade aos antibióticos ácido nalidíxico, cloranfenicol, estreptomicina e

vancomicina a $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Tabela 7). Para a seleção das colônias resistentes, foi necessário encontrar uma combinação de antibióticos em que todas as bactérias fossem suscetíveis, para que apenas quem carregasse o plasmídeo com a resistência aos antibióticos sobrevivesse (Tabela 7). Dessa forma, os antibióticos usados para selecionar as estirpes SEMIA 587 e 5019 (*B. elkanii*), 5079 (*B. japonicum*) foram a ampicilina ($150 \mu\text{g ml}^{-1}$) e o ácido nalidíxico ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) e para a SEMIA 5080 (*B. diazoefficiens*) foram a ampicilina ($150 \mu\text{g ml}^{-1}$) e a vancomicina ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$). As bactérias foram transformadas quando o produto da conjugação entre a *E. coli* DH5 α e as linhagens de *Bradyrhizobium* foram repicadas em placas de LM com x-gluc e com os respectivos antibióticos para a seleção, e as colônias transformadas expressavam a coloração azul (Figura 5).

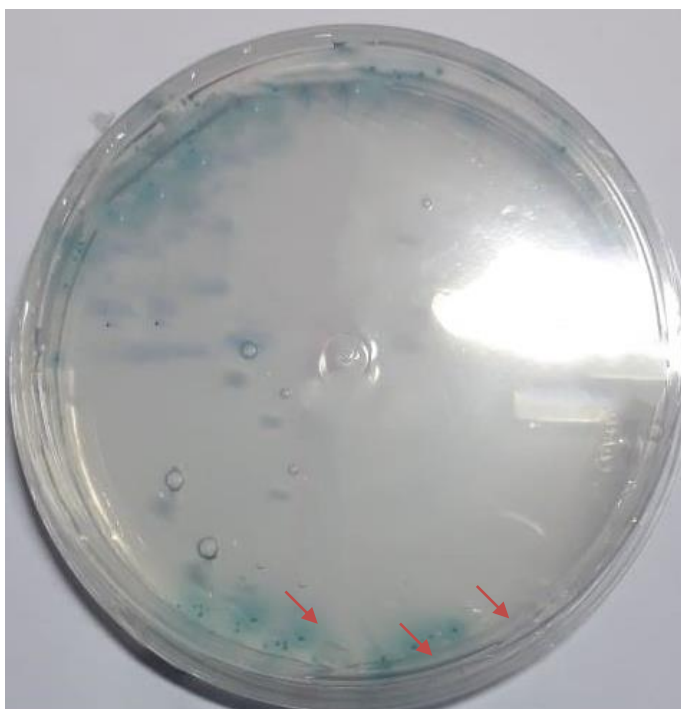


Figura 5. Colônias transformadas da estirpe SEMIA 5080. Pequenas colônias azuis indicam que a transformação foi positiva.

Posteriormente, foi quantificada a expressão do *gfp* em fluorímetro e todas estirpes SEMIA 587, 5019, 5079 e 5080 apresentaram valores superiores quando comparadas ao controle (mesmas estirpes não transformadas), portanto o gene estava sendo expresso (Figura 6).

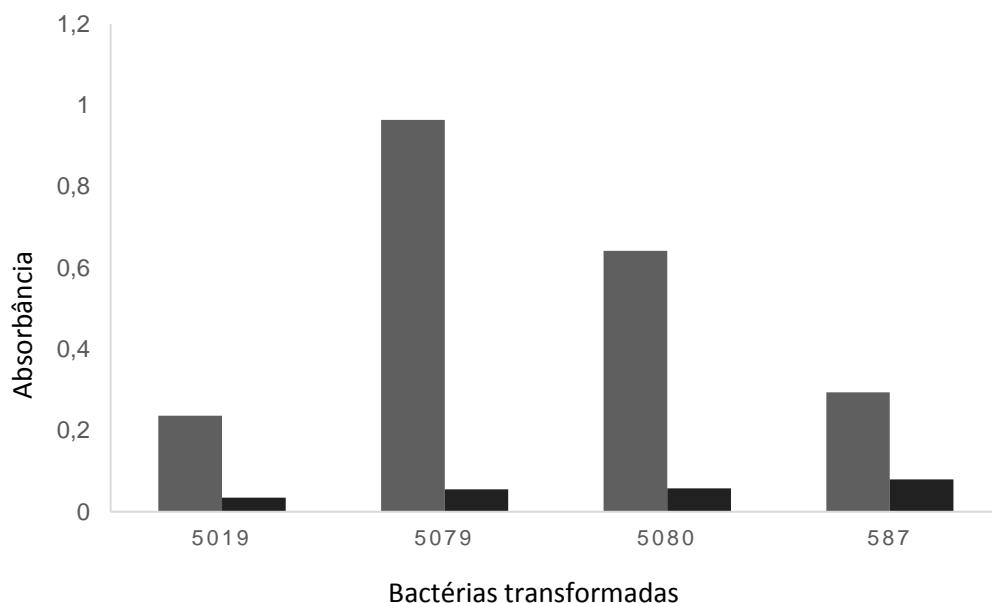


Figura 6. Expressão do *gfp* medido em fluorímetro com o comprimento de onda de 510nm. Barras cinzas representam a média das repetições com as bactérias transformadas; barras pretas representam o controle com as mesmas bactérias não transformadas.

Devido aos resultados obtidos nos testes em laboratório e em casa de vegetação, a planta que mostrou ser influenciada de forma significativa na aceleração da germinação e incremento de MSPA foi a aveia preta inoculada com a estirpe SEMIA 587. Dessa forma, as plantas de aveia preta foram selecionadas para a inoculação das bactérias transformadas a fim de verificar se a colonização ocorria. Algumas células de bactérias transformadas, expressando a cor verde puderam ser observadas (Figura 7a-e), assim como foi possível visualizar manchas azuladas (Figura 8). As bactérias transformadas não perderam a capacidade de nodular as plantas de soja (Figura 9).

Tabela 7. Resistência e suscetibilidade aos antibióticos das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 587, 5019, 5079, 5080 e dos plasmídeos inseridos nas *E. coli* DH5α.

Concentrações	30ug/ml						50ug/ml						150ug/ml						235ug/ml						300ug/ml					
	587	5019	5079	5080	pHR	pRK	587	5019	5079	5080	pHR	pRK	587	5019	5079	5080	pHR	pRK	587	5019	5079	5080	pHR	pRK	587	5019	5079	5080	pHR	pRK
Antibióticos																														
Rifampicina	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Tetraciclina	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Canamicina	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ampicilina	++	++	--	--	++	+	++	++	--	--	++	+	--	--	--	--	++	+	--	--	--	--	++	+	--	--	--	--	++	+
Eritromicina	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	--	++	++	++	++	++	--
Penicilina	++	++	--	--	++	--	++	++	--	--	++	--	--	--	--	--	++	--	--	--	--	--	++	--	--	--	--	--	++	--
Ácido Nalidíxico	++	++	++	--	--	--	++	++	++	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Neomicina	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	--	--	--	--	++	++	--	--	--	--	++	++	--	--	--	--	++	++
Carbenicilina	++	++	++	++	++	--	++	++	++	++	++	--	++	++	--	++	++	--	++	++	--	++	++	--	++	++	--	++	++	--
Cloranfenicol	++	--	++	++	--	--	++	--	++	++	--	--	++	--	++	++	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Estreptomicina	++	--	--	--	--	--	++	--	--	--	--	--	++	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Vancomicina	++	++	--	++	--	--	++	++	--	++	--	--	++	++	--	++	--	--	++	++	--	++	--	--	++	++	--	++	--	--

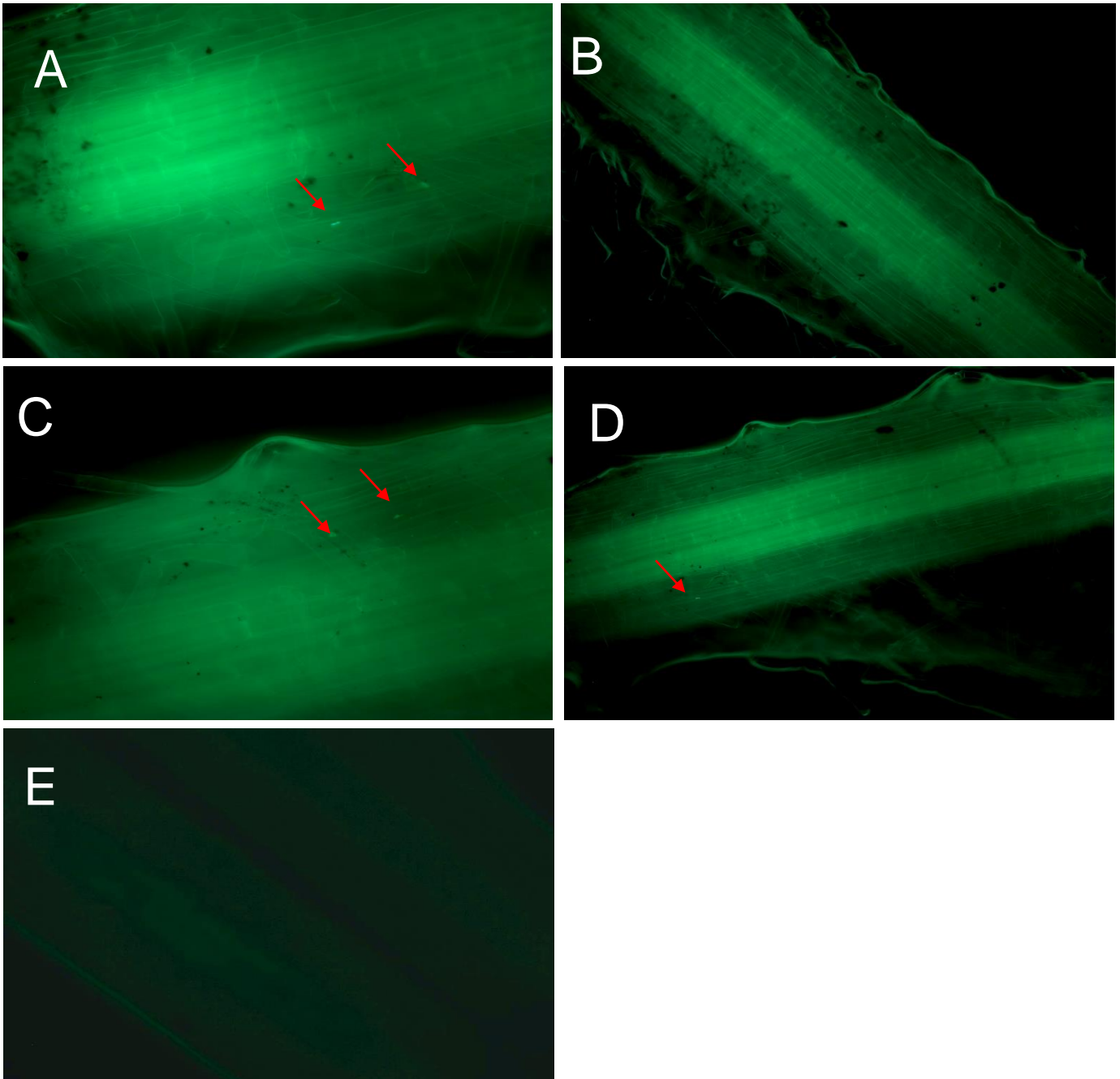


Figura 7. Plantas de aveia preta inoculadas com as estirpes: A) SEMIA 587 B) SEMIA 5019 C) SEMIA 5079 D) SEMIA 5080 E) CONTROLE (sem inoculação) marcadas com o gene *gfp*. Setas vermelhas apontam as células bacterianas.

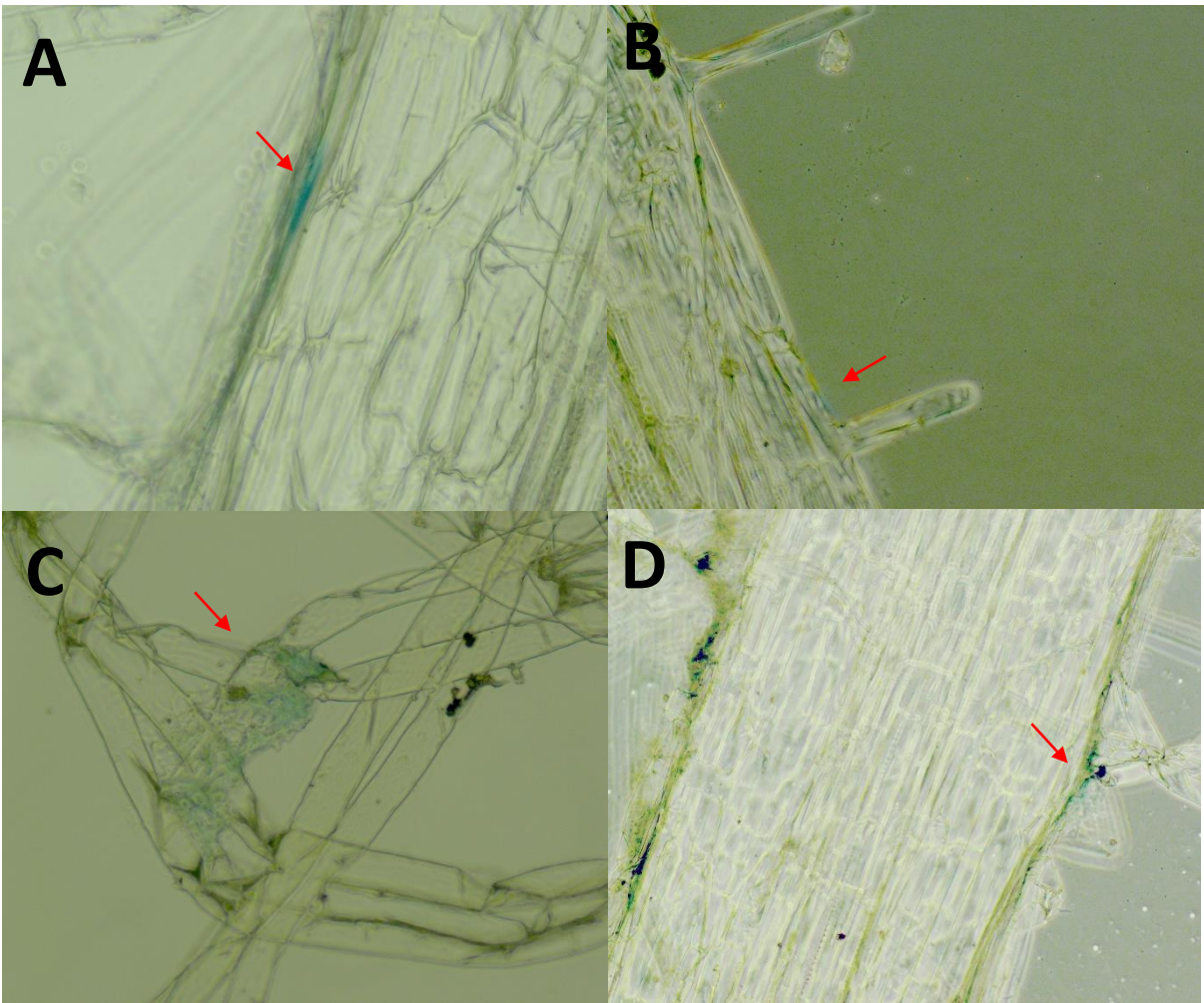


Figura 8. Plantas de aveia preta inoculadas com as estirpes: A) SEMIA 587 B) SEMIA 5019 C) SEMIA 5079 D) SEMIA 5080 marcadas com o gene *gus*. Setas vermelhas representam manchas azuladas.



Figura 9. Planta de soja (*Glycine max*) inoculada com a estirpe SEMIA 5080 apresentando nódulos radiculares, colhida aos 15 dias após a inoculação.

A interação das estirpes de *Bradyrhizobium* com as plantas de aveia preta visualmente não foi conclusiva em nenhuma das imagens geradas. Um estudo que transformou outras linhagens de *Bradyrhizobium* simbiotes de lentilha na Índia, com *gfp* a partir de conjugação biparental com *E. coli* S17-1 carregando o plasmídeo EDS 15, verificou a eficácia da transformação dos rizóbios a partir da inoculação dos mutantes na planta hospedeira e a quantificação da expressão gênica via espectrofotômetro. Foram realizadas a contagem, o peso úmido e o peso seco dos nódulos após 45 dias de inoculação, com o respectivo reisolamento das bactérias dos nódulos, sendo que estas cresceram em meio com tetraciclina $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Entretanto, esse estudo não há imagens de como os *Bradyrhizobium* colonizam e se comportam dentro do nódulo (BHATIA e SHARMA, 2002). Ledermann et al. (2015), analisaram a estabilidade da fluorescência da transformação com *gfp* em uma linhagem de *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 e perceberam que quando o *gfp* é inserido nessa linhagem a fluorescência emitida é fraca. Baseado na intensidade de fluorescência, na suscetibilidade na degradação do plasmídeo e na autofluorescência dos tecidos de plantas, foi contruído um gene sintético que tem a expressão do gene *mCherry* (*mChe-1*); (*mChe-4*), encontrados em plasmídeos que expressam autofluorescência vermelha oriundas de águas vivas. Dessa forma, foi possível

observar a fluorescência nas raízes de soja logo no quarto dia após a inoculação das linhagens transformadas (Ledermann et al., 2015).

6. CONCLUSÕES

A inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal amplamente conhecidas por serem fixadoras de nitrogênio em soja promoveram crescimento das plantas de aveia branca, aveia preta e azevém. Principalmente por acelerarem o processo de germinação das sementes, por aumentarem o comprimento e o volume radicular, bem como o aumento da massa seca das raízes das plantas cultivadas em casa de vegetação. Portanto, é possível afirmar que as bactérias SEMIA 587 (*B. elkanii*), SEMIA 5079 (*B. japonicum*) e SEMIA 5080 (*B. diazoefficiens*) são capazes de promover crescimento das plantas de aveia branca (*A. sativa*), aveia preta (*A. strigosa*) e azevém (*L. multiflorum*). Com os experimentos realizados nesse trabalho, as estirpes Abv-5 e Abv-6 de *Azospirillum* também foram capazes de aumentar a massa seca de parte aérea, bem como o nitrogênio total quando inoculadas em plantas de azevém. Visto que, as bactérias do gênero *Azospirillum* são conhecidas por serem fixadoras de nitrogênio em gramíneas, e influenciaram na absorção de nitrogênio de azevém, estudos que avaliem o efeito da co-inoculação dessas bactérias com as plantas desse estudo ainda são necessários para se conhecer mais dessa interação, consequentemente reduzindo o custo de produção e os impactos causados pelo uso de fertilizantes. Com a capacidade de transformar as estirpes de *Bradyrhizobium* a partir da inserção do plasmídeo pHR *gfp-gus* pode-se verificar que há uma interação entre as plantas e as bactérias e as mesmas não perderam a sua capacidade de nodular a planta hospedeira, comprovando o êxito da transformação. Ainda são necessários mais estudos que avaliem em outras condições, utilizando métodos distintos para verificar melhor essa interação.

7. REFERÊNCIAS

- AHEMAD, M., KIBRET, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science*, v.26, p.1–20.
- ALVES J B. (2005). Seleção de rizóbios para trevo branco. 78f. Dissertação (mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- ANTOUN H, BEAUCHAMP CJ, GOUSSARD N, CHABOT R, LALANDE R (1998) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.) *Plant Soil* 204:57–67
- ARAÚJO, A.A. (1978) Forrageiras para ceifa capineiras, fenação e ensilagem. Porto Alegre: Sulina. 169p.
- BALDANI, I. J.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, v. 384, p. 413-431, 2014.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SAMPAIOMJ, A. M.; DÖBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 56, n. 265, 1984.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. R. S.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul: **EDUCS**, p. 433p. 2002.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. (2005) History on the biological nitrogen fixation

research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, Rio de Janeiro, v. 77, p.549-579.

- BANERJEE, M.R.; YESMIN, L.; VESSEY, J. K. (2006). Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. In. RAI, M.K. *Handbook of Microbial Biofertilizers*. Nova York : Food Products Press, p.137-181.
- BARROS, VLNP (2013). Aveia preta - alternativa de cultivo no outono/inverno. *Pesquisa e Tecnologia. Informações Tecnológicas. Apta Regional*. vol. 10, n. 2, Jul-Dez.
- BARROSO, C. B.; NAHAS, E (2008) Solubilization of hardly soluble iron phosphate in culture médium. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 4, p. 529-535.
- BASTOS, R. S. A.; MENDONÇA, E. DE S.; ALVAREZ, V. V. H.; CORRÊA, M. M.; COSTA, L. M. (2005) Soil aggregate formation and stabilization as influenced by wetting drying cycles and organic compounds with different hydrophobic characteristics. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 29, p. 21-31.
- BENEDUZI, A.; PERES, D.; BESCHOREN DA COSTA, P.; ZANETTINI, M. H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (2008). Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Research in Microbiology*, v. 159, p. 244-250.
- BENT, E.; CHANWAY, C. P. Potential for misidentification of a spore-forming *Paenibacillus polymyxa* isolate as an endophyte by using culture-based methods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 9, p. 4650-4652, 2002.
- BHATIA R, DOGRA RC and SHARMA P.K.(2002) Construction of green fluorescent protein (GFP)-marked strains of Bradyrhizobium for ecological studies Department of Microbiology, CCS Haryana Agricultural University, Hisar, India 2001/389: received 14 December 2001, revised 26 July 2002 and accepted 16 August.
- BISWAS, J.C. et al. (2000). Rhizobial inoculation influences seedling vigor and

- yield of rice. *Agronomy Journal*, Madison, v. 92, p.880–886.
- BONILHA DA SILVA, F. (2016) **Seleção de rizóbios nativos simbiotes de *desmodium incanum* e avaliação da promoção de crescimento de gramíneas.** Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente -UFRGS.
- CATTELAN, A.J. (1999) Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal. Londrina: Embrapa Soja. 36 p.
- CHEN, X. et al. (2005). Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 33, p. 2540-2548.
- CHI, F.; SHEN, S.H.; CHENG, H.P.; JING, Y.X.; YANNI, Y.G.; DAZZO, F.B. (2005) 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, n.11, p.7271-7278.
- DARTORA, J. et al. Co-inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in maize. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 20, p.545-550, 2016.
- DERPSCH, R. & CALEGARI, (1992) A. Plantas para adubação verde de inverno. 19 Londrina: IAPAR. 80 p. (IAPAR. Circular, 73).
- DITTA, G., STANFIELD, S., CORBIN, D. AND HELINSKI, D.R.: (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 7347-7351.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. (2003) Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 22, n. 2, p. 107-149.
- DOMIT L, COSTA J, VIDOR C, PEREIRA J (1990) Inoculation of cereal seeds with *Bradyrhizobium japonicum* and its effect on soybeans grown in succession. *R Bras Ci Solo* 14:313–319.
- DUTTA, S.; MISHRA, A.K.; DILEEP KUMAR, B.K. (2007) Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant

growth promoting rhizobacteria and rhizobia. *Soil Biology and Biochemistry*. doi:10.1016/j.soilbio.2007.09.009.

EDWARDS, A. P.; BREMNER, J. M. (1967) Microaggregates in soils. *Journal of Soil Science*, v. 18, p. 64-73.

EDWARDS, U.; ROGALL T.; BLOCKERL H.; EMDE, M.; BOTTGER, E. C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16s ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, v. 17, n. 19, p. 7843-7853.

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

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

FONTANELLI, R.S.; PIOVEZAN, A.J. (1991) Efeitos de cortes no rendimento de forragem e grãos de aveia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 26(5): p.691-697, maio.

FRECKLETON, R. P.; SILVA MATOS, D. M.; BOVI, M. L. A.; WATKINSON, A. R. (2003) Predicting the impacts of harvesting using structured population models: the importance of density-dependence and timing of harvest for a tropical palm tree. *Journal of Applied Ecology*, v. 40, p. 846-858.

FREIRE, J.R.J. (1977). Inoculation of soybeans. In: *EXPLOITING THE LEGUM E/RHIZOB IUM TECHNOLOGY SYMBIOSIS IN TROPICAL AGRICULTURE*, 1976, Hawaii. Proceedings. Honolulu: University of Hawaii, p.335-379. (NifTAL Project, 145)

FREIRE, JR e VERNETTI J F DE J (1997) A pesquisa com soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculantes no Brasil, Artigo de revisão.

GARCÍA-FRAILE P, CARRO L, ROBLEDO M, RAMÍREZ-BAHENA MH, FLORES-FÉLIX JD, FERNÁNDEZ MT, MATEOS PF, RIVAS R, IGUAL JM, MARTÍNEZ-MOLINA E, PEIX A, VELÁZQUEZ E (2012) *Rhizobium*

promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. PLoS One 7:38122

GRAY, e. J.; SMITH, D. L. (2005) Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 37 p. 395-412.

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

HAHN, L.; SÁ, E. L. S.; SILVA, W. R.; MACHADO, R. G.; DAMASCENO, R. G. (2013) 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.

HAN, J. et al. (2005) Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various pathogens. *Systematic and Applied Microbiology*, v.28, p.66-76.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. (2004) Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 34, p.343-357.

HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. (2016) (Ed.). *Working with rhizobia*. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research. p. 109-124.

JORGE, L. A. C.; SILVA, D. J. C. B. (2010). *Safira: Manual de utilização*. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária.

KHAI TOV B, KURBONOV A, ABDIEV A, ADILOV M (2016) Effect of chickpea in association with *Rhizobium* to crop productivity and soil fertility. *Eurasian J Soil Sci* 5:105–112.

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

KLOEPPER JA (2003) Review of mechanisms for plant growth promotion by

- PGPR. In: Sixth international PGPR workshop, pp 5–10.
- KLOEPPER JW, Beauchamp CJ (1992) A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can J Microbiol* 38:1219–1232
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA, Angers, France. v.2, p. 879–882.
- KUSS A. V. (2006) **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, RS.
- LASCANO, C. E. (2002) Caracterización de las pasturas para maximizar producción animal. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, Mayaguez, v. 10, p. 126-132.
- LEDERMANN, R., BARTSCH, I., REMUS-EMSERMANN, M. N., VORHOLT, J. A., & FISCHER, H.-M. (2015). Stable Fluorescent and Enzymatic Tagging of *Bradyrhizobium diazoefficiens* to Analyze Host-Plant Infection and Colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(9), 959–967. doi:10.1094/mpmi-03-15-0054-ta
- LEDERMANN, R., BARTSCH, I., REMUS-EMSERMANN, M. N., VORHOLT, J. A., & FISCHER, H.-M. (2015). Stable Fluorescent and Enzymatic Tagging of *Bradyrhizobium diazoefficiens* to Analyze Host-Plant Infection and Colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(9), 959–967. doi:10.1094/mpmi-03-15-0054-ta
- MACHADO, R. (2011) **Promoção de crescimento em gramíneas forrageiras por rizóbios isolados de *Lotus corniculatus***. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo - UFRGS.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination – and in selection for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MARRA, L.M. et al. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 68, p.603-609, 2011.

- MISHRA, R. P. N.; SINGH, R. K.; JAISWAL, H. K.; KUMAR, V.; MAURYA, S. (2006) *Rhizobium* mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). *Current Microbiology*, v. 52, n.5, p.383–389.
- MORAES, M T (2017). **Modelagem do crescimento radicular de milho e soja sujeito a estresses hídrico e mecânico em latossolo**. Tese de Doutorado, Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo – UFRGS, Porto Alegre.
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. (1997) Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *Applied and Environment Microbiology*, Washington, v.6, p.366-370.
- OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. (2006) Yield of micropropagated sugarcane varieties in diferente soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, p. 23–32.
- OSORIO FILHO, B. D. (2009) **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. 2009.p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- OSÓRIO FILHO, B. D., GANO, K. A., BINZ, A., LIMA, R. F., AGUILAR, L. M., RAMIREZ, A., GIONGO, A. (2014). Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. *American and Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science*, 14(8), 707-718.
- OSORIO FILHO, B. D.; BINZ, A.; LIMA, R. F.; GIONGO, A.; SÁ, E. L. S. (2016). Promoção de crescimento de arroz por rizóbios em diferentes níveis de adubação nitrogenada. *Ciência Rural*, v. 46, n. 3, p. 478-485.
- 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. (2014) Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. *American and Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science*, v.14. n.8, p.707-718.

- PENG, S.; BISWAS, J. C.; LADHA, J. K. (2002) Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. *Agronomy Journal*, n. 94, p. 925-929.
- PENGELLY, B. C.; CONWAY, M. J. (2000) Pastures on cropping soils: which tropical pasture legume to use? *Tropical Grasslands*, Brisbane, v. 34, p. 162-168.
- PERRIG, D. et al. (2007) Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.75, p.1143–1150,
- PRASHER, D. C., ECKENRODE, V. K., WARD, W. W., PRENDERGAST, F. G., & CORMIER, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229-233.
- PRITHIVIRAJ, B. et al. (2003) A host-specific bacteria-to-plant signal molecule (Nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants. *Planta*, Berlin, v. 21, p. 437-445.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 319-339.
- RODRIGUEZ-CÁCERES, E. A. (1982) Improved medium for isolation of *Azospirillum spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, v. 44, p. 990-991.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANTOS, F. L. D. (2018). **Inoculação e coinoculação de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas de arroz, milho e trigo**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SARRUGE, J.R. (1975) Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.1, p.231-233.
- SARWAR, M.; KREMER, R. J. (1992) Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology*, v. 20, p. 282-

285.

- SCHLOTTER, M. et al. (1997) Root colonization of different plants by plant growth promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 63, p. 2038-2046.
- SCHUH, C.A. (2005) Biopolímeros como suporte para inoculantes. (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, 81p.
- SIENKO, M.J.; PLANE, R.A., (1972) "Experimental Chemistry", 4th. edition, McGraw-Hill, New York, pp.31-35.
- SOUCHIE, E. L.; ABBOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. (2007) Solubilizadores de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. Bioscience Journal, v. 23, n. 2, p. 53-60.
- SPEEDING, C.R.W. & DIEKMAHNS, F.L. (1972) Grasses and legumes in British agriculture. Diekmahns Farnham Royal, Bucks: Commonwealth Agricultural Bureaux. 511 p.
- STAJKOVIC-SRBINOVIC, O.; DELIC, D.; KUZMANOVIC, D.; PROTIC, N.; RASULIC, N.; KNEZEVIC-VUKCEVIC, (2014) J. Growth and nutrient uptake in oat and barley plants as affected by rhizobacteria. Romanian Biotechnological Letters, v. 19, n. 3, p. 9429-9436.
- TEDESCO, M. J. et al. (1995) **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS. (Boletim técnico, 5) 174p.
- VESSEY JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255:571–586
- VINCENT, J. M. (1970) **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 164p.
- YANNI, Y. G.; RIZK, R. Y.; ABDEL-FATTAH, F. K.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJIN, 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. (2001) 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.
- 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. (1997) 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.
- ZIAF K, LATIF U, AMJAD M, SHABIR MZ, ASGHAR W, AHMED S, AHMAD I, JAHANGIR MM, ANWAR W (2016) Combined use of microbial and synthetic amendments can improve radish (*Raphanus sativus*) yield. J Environ Agric Sci 6:10–15s.
- GUPTA S K, PRASAD JK and RAGHUWANSHI R (2017). Characterizing rhizospheric plant growth promoting bacteria for their effects on oat (*Avena sativa*). Article Microbiology. International Journal of Pharma and Bio Sciences ISSN 0975-6299.