

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

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS EFICIENTES NA FIXAÇÃO
SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO EM ERVILHACA (*Vicia sativa*) E NA PROMOÇÃO
DE CRESCIMENTO EM CULTIVARES DE ARROZ E AVEIA BRANCA**

RENATA D OLIVEIRA BATAIOLLI

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

Porto Alegre

Agosto/2016

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

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS EFICIENTES NA FIXAÇÃO
SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO EM ERVILHACA (*Vicia sativa*) E NA PROMOÇÃO
DE CRESCIMENTO EM CULTIVARES DE ARROZ E AVEIA BRANCA**

Renata D Oliveira Bataioli
Bióloga

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
Agosto/2016

Folha para homologação

“O único homem que está isento de erros é aquele que não arrisca acertar.”

Albert Einstein

“A persistência é o caminho para o êxito”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Dedico aos meus pais, Janete e Elemir, vocês são meus exemplos. Tenho a sorte de poder ter vocês presentes na minha vida me incentivando e me ajudando a superar todos os momentos. Não tenho palavras para agradecer tudo que fazem por mim. Em especial, dedico a vocês essa mais nova conquista. Amo vocês!

À minha irmã, Fernanda, que vibrou comigo quando entrei no mestrado, que me ajudou a enfrentar as dificuldades e que sempre me motivou e me apoiou mostrando o quanto sou capaz. Quero agradecer por mesmo de longe acompanhar cada passo meu e ter orgulho de mim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, onde sempre fui muito bem recebida pelos funcionários e professores.

Ao meu orientador, professor Enilson Luiz Saccol de Sá, por me aceitar em sua equipe de pesquisa, pelo conhecimento compartilhado e por sempre estar disposto a me auxiliar durante esses dois anos.

Ao seu Zé pelo conhecimento passado e auxílio na casa de vegetação, pois se mostrou atencioso todas as vezes que precisei.

A professora Ana Frazzon que além de uma ótima professora me recebeu de braços abertos em seu laboratório e sempre se mostrou muito atenciosa.

Aos meus colegas de laboratório que me receberam muito bem, Gleidson, Márcia, Márcio, Priscila, Victor, Vitor e Vanessa. Em especial à Bruna, Franciane, Kelly, Clarissa, por me ajudarem sempre que precisei, pela parceria e amizade que construímos ao longo desses dois anos e que certamente continuará, e a Tais, minha dupla, o que seria do pink sem o cérebro? Obrigada a todos pela parceria!

A todos meus amigos e familiares que de alguma forma estiveram presentes durante essa caminhada, principalmente a minha madrinha Olinda, minha Avó Nelci e minhas filhas Tchuca, Xixa e Preta pelo amor incondicional.

Meu muito obrigado a todos que de alguma forma contribuíram para que esta etapa fosse concluída.

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS EFICIENTES NA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO EM ERVILHACA (*Vicia sativa*) E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM CULTIVARES DE ARROZ E AVEIA BRANCA

Autor: Renata D Oliveira Bataioli

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

RESUMO

Os rizóbios são bactérias do solo que realizam simbiose com plantas leguminosas e fixam nitrogênio atmosférico. Estas bactérias também são conhecidas por colonizar endofiticamente e produzir substâncias estimuladoras que influenciam no crescimento e no desenvolvimento de plantas não leguminosas. Para aumentar a eficiência na promoção de crescimento vegetal, estuda-se a utilização de plantas leguminosas e não leguminosas em consórcio ou em sucessão, bem como a inoculação conjunta de rizóbios. O presente estudo tem como objetivo isolar e selecionar rizóbios simbiotes eficientes na fixação de nitrogênio em ervilhaca (*Vicia sativa*) e avaliar o potencial destas bactérias na promoção de crescimento em cultivares de arroz (*Oryza sativa*) e em aveia branca (*Avena sativa*). Sendo assim, os rizóbios foram caracterizados quanto à morfologia colonial, capacidade de solubilizar fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), e de produzir ácido indol-acético (AIA) com e sem adição de triptofano no meio de cultura. Em casa de vegetação, os rizóbios foram autenticados e avaliados quanto à eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio em ervilhaca. De acordo, com a capacidade de solubilizar fosfato tricálcico, produção de AIA com e sem adição de triptofano e a eficiência simbiótica, foram selecionados cinco rizóbios (UFRGS Vs6, UFRGS Vs12, UFRGS Vs16, UFRGS Vs26 e UFRGS Vs30) e avaliou-se o efeito destas bactérias sobre a germinação e a capacidade das mesmas em promover o crescimento vegetal em cultivares de arroz e de aveia, em casa de vegetação e posterior caracterização genética. Todos rizóbios isolados produziram ácido indol-acético em meio de cultura sem e com adição de triptofano, 19 solubilizaram fosfato tricálcico em meio de cultura. Em relação à eficiência dos rizóbios na fixação simbiótica de nitrogênio destacou-se o isolado UFRGS Vs30 com índice de eficiência relativa de 50%. Os rizóbios UFRGS Vs26 e UFRGS Vs30 estimularam a germinação das sementes de arroz IRGA 424RI e os rizóbios UFRGS Vs6 e UFRGS Vs16 de aveia. Em plantas de aveia, os rizóbios UFRGS Vs6, UFRGS Vs16, UFRGS Vs26 e UFRGS Vs30 aumentaram a massa da raiz. Em plantas de arroz os rizóbios UFRGS Vs12, UFRGS Vs16 e UFRGS Vs30 promoveram incremento na massa seca da parte aérea das três cultivares estudadas e da massa seca de raiz das cultivares IRGA 430 e IRGA 424. Anteriormente não haviam sido descritas espécies de *Rhizobium phaseoli* e *Rhizobium vallis* capazes de nodular e/ou fixar nitrogênio em ervilhaca.

Palavras-chave: fixação simbiótica de nitrogênio, promoção de crescimento, *Rhizobium vallis*, *Rhizobium phaseoli*

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. (53 p.) Agosto, 2016.

ISOLATION AND SELECTION OF RHIZOBIA EFFECTIVE FOR SYMBIOTIC FIXATION OF NITROGEN IN VETCH (*Vicia sativa*) AND GROWTH PROMOTION IN RICE CULTIVARS AND WHITE OAT

Author: Renata D Oliveira Bataioli

Advisor: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

ABSTRACT

Rhizobia are soil bacteria that perform symbiosis with leguminous plants and fix atmospheric nitrogen. Those bacteria are also known for colonizing - by endophytic form – and produce substances that promote growing and development of non-leguminous plants. To increase production efficiency in vegetable growing, we have been studying utilization of leguminous plants and non-leguminous plants in consortium or succession as well as inoculation of rhizobia alongside. This research have the objective of isolate and select rhizobia efficient to fix nitrogen in vetch (*Vicia sativa*) – by symbiosis - and evaluate potential of those bacteria increase growing of rice cultivars (*Oryza sativa*) and white oat (*Avena sativa*). Therefore, rhizobia were characterized about colony morphology, their ability to solubilize tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) and produce indole acetic acid (AIA), with or without addition of tryptophan in growing medium. In the greenhouse, rhizobia were authenticated and evaluated about of their efficiency in fixing nitrogen in vetch through symbiosis. It was selected five potential rhizobia (UFRGS Vs6, UFRGS Vs12, UFRGS Vs16, UFRGS Vs26 and UFRGS Vs30). We evaluated the effect of selected rhizobia on seed germination, ability of producing vegetable growing in cultivars of rice and oat in the greenhouse, and further genetic description. All isolated rhizobia produced indole acetic acid in the growing medium without and with addition of tryptophan, 19 solubilized tricalcium phosphate in growing medium. Related of rhizobia efficiency in fixing by symbiosis, the isolated UFRGS Vs30 stood out with efficiency level of 50%. Rhizobia UFRGS Vs26 and UFRGS Vs30 increased seeds germination of rice IRGA 424RI and rhizobia UFRGS Vs6 and UFRGS Vs16 increased it in oat. Rhizobia UFRGS Vs6, UFRGS Vs16, UFRGS Vs26 and UFRGS Vs30 increased dry mass of root of oat plants. Concerning rice plants, rhizobia UFRGS Vs12, UFRGS Vs16 and UFRGS Vs30 increase dry aerial mass in three cultivars of rice and the dry mass root of cultivars IRGA 430 and IRGA 424. There were not species of *Rhizobium phaseoli* and *Rhizobium vallis* able to nodulate or fix nitrogen in vetch.

Keywords: symbiotic fixation of nitrogen, grow promotion, *Rhizobium vallis*, *Rhizobium phaseoli*

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. (53 p.) August, 2016.

SUMÁRIO

| | |
|---|---|
| LISTA DE TABELAS | xi |
| LISTA DE FIGURAS | xii |
| RELAÇÃO DE APÊNDICES..... | xii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 OBJETIVOS | 3 |
| 2.1 Objetivo geral | 3 |
| 2.2 Objetivos específicos | 3 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 3.1 Simbiose entre rizóbios e leguminosa | 4 |
| 3.2 Fixação biológica de nitrogênio | 4 |
| 3.3 Mecanismos promotores de crescimento de plantas | 5 |
| 3.3.1 Produção de fitormônios..... | 6 |
| 3.3.2 Solubilização de fosfato..... | 7 |
| 3.4 Rizóbios como promotores de crescimento em gramíneas..... | 7 |
| 3.5 Arroz (<i>Oryza sativa</i> L) e aveia-branca (<i>Avena sativa</i> L.) | 8 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 10 |
| 4.1 Obtenção de nódulos radiculares..... | 10 |
| 4.2 Isolamento e caracterização morfológica dos rizóbios | 11 |
| 4.3 Autenticação dos isolados..... | 12 |
| 4.4 Solubilização de fosfato tricálcico..... | 12 |
| 4.5 Produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético (AIA)..... | 13 |
| 4.6 Avaliação da eficiência dos rizóbios na fixação simbiótica de nitrogênio em ervilhaca em casa de vegetação | 14 |
| 4.7 Efeito da inoculação de rizóbios na germinação de sementes de cultivares de arroz (<i>Oriza sativa</i>) e aveia branca (<i>Avena sativa</i>)..... | 15 |
| 4.8 Avaliação da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento em cultivares de arroz e aveia branca em casa de vegetação.... | Erro! Indicador não definido. 16 |

| | |
|---|--------------|
| 4.9 Extração de DNA e amplificação da região do gene 16S rRNA | 18 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 20 |
| 5.1 Caracterização morfológica e autenticação | 20 |
| 5.2 Capacidade de solubilização de fosfato tricálcico Erro! Indicador não definido. | 22 |
| 5.3 Produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético (AIA) | Erro! |
| Indicador não definido. | 23 |
| 5.4 Avaliação da eficiência dos isolados na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de ervilhaca em casa de vegetação | 25 |
| 5.5 Efeito dos rizóbios isolados sobre a germinação de sementes de arroz (IRGA 430, IRGA 424, IRGA 424RI) e de aveia (URS Corona)..... | 28 |
| 5.6 Avaliação da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento de plantas de arroz IRGA 430, IRGA 424 e IRGA 424RI em casa de vegetação.. | 33 |
| 5.7 Avaliação da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento de plantas de aveia branca variedade URS Corona em casa de vegetação | 35 |
| 5.8 Caracterização genética dos rizóbios estudados..... | 36 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 39 |
| 7 REFERÊNCIAS | 40 |
| 8 RELAÇÃO DE APÊNDICES | 52 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | Nodulação e fixação de nitrogênio por rizóbios isolados de raízes de Ervilhaca (<i>Vicia sativa</i>) cultivada em experimento para autenticação realizado em casa de vegetação por 40 dias..... | 21 |
| Tabela 2 | Capacidade de solubilização de fosfato tricálcico por rizóbios isolados de nódulos radiculares de ervilhaca (<i>Vicia sativa</i>)..... | 22 |
| Tabela 3 | Produção de ácido indol-acético (AIA) em meio de cultura LM, sem e com adição de triptofano por rizóbios isolados de ervilhaca (<i>Vicia sativa</i>)..... | 24 |
| Tabela 4 | 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) dos isolados de <i>Vicia sativa</i> e dos tratamentos controle..... | 26 |
| Tabela 5 | Médias seguidas do desvio padrão do índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de arroz, cultivares: IRGA 430, IRGA 424 e IRGA 424 RI e aveia..... | 28 |
| Tabela 6 | Médias seguidas do desvio padrão do percentual total de germinação em sementes de arroz, cultivares: IRGA 430, IRGA 424 e IRGA 424 RI e aveia..... | 29 |
| Tabela 7 | Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), número de perfilhos, volume de raiz (Vol. Raiz) e Nitrogênio total da parte aérea, de plantas de arroz cultivares 430, 424 e 424 RI em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de <i>Vicia sativa</i> | 33 |
| Tabela 8 | Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), volume de raiz (Vol. Raiz), número de folhas (N Folhas), índice de eficiência relativa (IER), de plantas de aveia em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de <i>Vicia sativa</i> | 35 |

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabela 9 | Identificação genética dos rizóbios testados (gene 16S rDna) | 37 |
|-----------------|--|----|

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Figura 1 | Percentual acumulado de germinação de sementes de arroz IRGA 424RI inoculadas com o rizóbio UFRGS Vs26 de <i>Vicia sativa</i> , em comparação com o tratamento controle com LM (caldo levedura-manitol)..... | 30 |
| Figura 2 | Percentual acumulado de germinação de sementes de arroz IRGA 424RI inoculadas com o rizóbio UFRGS Vs30 de <i>Vicia sativa</i> , em comparação com o tratamento controle com LM (caldo levedura-manitol)..... | 30 |
| Figura 3 | Percentual acumulado de germinação de sementes de aveia inoculadas com o rizóbio UFRGS Vs6 de <i>Vicia sativa</i> , em comparação com o tratamento controle com LM (caldo levedura-manitol)..... | 31 |
| Figura 4 | Percentual acumulado de germinação de sementes de aveia inoculadas com o rizóbio UFRGS Vs16 de <i>Vicia sativa</i> , em comparação com o tratamento controle com LM (caldo levedura-manitol)..... | 32 |

RELAÇÃO DE APÊNDICES

| | | |
|--------------------|--|----|
| Apêndice I | Meio levedura manitol sólido (LM) (VINCENT, 1970)..... | 52 |
| Apêndice II | Solução nutritiva de Sarruge (1975)..... | 53 |

1. INTRODUÇÃO

Os rizóbios são bactérias que apresentam forma celular de bastonetes, são Gram negativas, aeróbias obrigatórias e não formam esporos. O número e a posição de seus flagelos dependem do gênero a que pertence, dentre os quais estão classificados em *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium* e *Azorhizobium*, são coletivamente chamados de rizóbios.

Estas bactérias em simbiose com leguminosas disponibilizam nitrogênio à planta hospedeira, devido à sua capacidade de Fixação Biológica de Nitrogênio, em estruturas radiculares especializadas conhecidas como nódulos. Esta interação beneficia tanto a bactéria que recebe energia necessária para se multiplicar e se proteger, quanto à planta que recebe o nitrogênio. Quando ocorre a senescência do nódulo, as bactérias retornam para o solo, onde elas retornam a forma de vida livre, e competem com outras bactérias para a sobrevivência. A utilização de inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio tem contribuído com a redução do uso de fertilizantes nitrogenados reduzindo os impactos ambientais relacionados à contaminação do solo por perdas de nitrato.

Espécies de leguminosas forrageiras como a ervilhaca (*Vicia sativa*) são de grande importância na composição de pastagens, devido à alta qualidade nutricional, alta capacidade de fixação biológica de nitrogênio, além de ser considerada planta de cobertura utilizada para a melhoria da fertilidade e da qualidade do solo.

No entanto, rizóbios também se associam com plantas de outras famílias, como as gramíneas, na maioria das vezes, de maneira endofítica. Nesta associação não ocorre a formação de nódulos nem a fixação de nitrogênio, porém, a planta é estimulada por outros mecanismos produzidos por estas bactérias. O efeito destes mecanismos, como a solubilização de fosfato, a produção de fitormônios e a supressão de patógenos são estudados por contribuírem na promoção de crescimento vegetal.

Leguminosas são normalmente utilizadas em sistemas de rotação e consórcio, devido a transferência de nitrogênio para não-leguminosas como gramíneas, por excreção de compostos nitrogenados ou por decomposição de nódulos e raízes durante a senescência.

Este trabalho se justifica pela utilização de rizóbios fixadores de nitrogênio em

leguminosas, os quais, podem vir a promover o crescimento em plantas não-leguminosas de arroz e de aveia por outros mecanismos, além de disponibilizar nitrogênio residual para estas gramíneas. A inoculação de rizóbios em consórcio ou em sucessão de cultivos é estudada como uma forma de promover o crescimento vegetal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar e selecionar rizóbios simbiossantes eficientes na fixação de nitrogênio na leguminosa ervilhaca (*Vicia sativa*) e avaliar o potencial destas bactérias na promoção de crescimento em cultivares de arroz (*Oryza sativa*) e em aveia (*Avena sativa*).

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Isolar e selecionar rizóbios eficientes na fixação simbiótica do nitrogênio em ervilhaca (*Vicia sativa*).

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

2.2.3 Estudar o efeito da inoculação de rizóbios simbiossantes de ervilhaca (*Vicia sativa*) sobre a germinação em cultivares de arroz e aveia.

2.2.4 Avaliar a capacidade dos rizóbios em promover o crescimento em cultivares de arroz (*Oryza sativa*) e de aveia (*Avena sativa*).

2.2.5 Caracterização genética dos rizóbios selecionados para os testes de promoção de crescimento.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Simbiose entre rizóbio e leguminosa

Rizóbios são bactérias, Gram- negativas que habitam o solo. Quando em vida livre são caracterizados pela forma de bastonetes, aeróbios, móveis e não tem a capacidade de fixar nitrogênio. Assumem a forma de bacteroide quando em simbiose com leguminosa, interagindo especificamente com as raízes da planta e fixando nitrogênio (MOREIRA & SIQUEIRA 2006; HAGHIGHI et al., 2011).

A simbiose entre rizóbio e leguminosa pode suprir grande parte ou totalmente a quantidade de nitrogênio necessário ao desenvolvimento e produtividade de leguminosas. As plantas da família Fabaceae, conhecidas como leguminosas, excretam flavonóides (flavonas, flavanonas e isoflavonas), que servem como sinalizadores para que os rizóbios se desloquem em direção a esses exsudatos que irão servir como substrato metabólico (BULGARELLI et al., 2013). A bactéria expressa os fatores *Nod*, e inicia-se o encurvamento do pelo radicular formando um cordão de infecção, pelo qual ocorre a entrada da bactéria na raiz da planta e o desenvolvimento dos nódulos radiculares que serão os sítios de fixação do nitrogênio (GRAY & SMITH, 2005).

3.2 Fixação Biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial para o crescimento de plantas. É necessário para a síntese celular de enzimas, proteínas, clorofilas, DNA e RNA, (HAYAT et al., 2010). Encontra-se disponível na forma orgânica e inorgânica, mas a maior parte deste composto é disponível de forma inorgânica, como amônia (NH_3), nitrato (NO_3^-) ou nitrogênio atmosférico (N_2) (SILVEIRA, 2008).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada por bactérias diazotróficas, as quais convertem o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), através de um complexo enzimático denominado nitrogenase. (NEVES & RUMJANEK, 1998). Como a nitrogenase é sensível à presença de oxigênio, os rizóbios são microaerófilos, pois somente fixam N_2 quando não há acúmulo de oxigênio entorno delas (DOBEREINER, 1990). Por meio deste processo, compostos nitrogenados são fornecidos diretamente para as plantas, ou então, quando os micro-organismos

morrem, são liberados no ambiente (LINDERMANN & GLOVER, 2003). Das associações entre bactérias diazotróficas, a simbiose entre rizóbios e leguminosas é a mais eficiente na FBN.

Os micro-organismos diazotróficos estão distribuídos entre as α -proteobactérias (cujos gêneros mais conhecidos são *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium*) e as β -proteobactérias (onde se destacam os gêneros *Burkholderia* e *Crupiaavidus*) (ZAKHIA & LAUJUDIE, 2001; VANDAMME et al., 2002; SAHGAL & JOHRI, 2003; BARRETT & PARKER, 2006). Estes micro-organismos são capazes de promover o crescimento de plantas, devido à capacidade de induzir a formação de nódulos radiculares pela simbiose e com isso fixar nitrogênio atmosférico. (REEVES, 1994).

O Brasil é um dos países pioneiros na utilização de bactérias diazotróficas na produção de inoculantes, que é um método eficiente e disponível no mercado agrônômico (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Os inoculantes contribuem para o crescimento e desenvolvimento de diversas culturas acarretando em aumento da produção agrícola (YANNI et al., 1997). A utilização de bactérias que realizam a FBN implica na redução do uso de fertilizantes químicos nitrogenados reduzindo os custos de produção e preservando o meio ambiente. As plantas não leguminosas se beneficiam do nitrogênio residual de leguminosas através da transferência direta aos cultivos consorciados ou às espécies subsequentes utilizadas na rotação de culturas (HAYAT et al., 2008).

3.3 Mecanismos utilizados por rizóbios para promover o crescimento de não leguminosas

Os rizóbios podem habitar o interior de raízes de plantas, caules e folhas de não leguminosas e estimular o crescimento dessas plantas por produzirem substâncias reguladoras de crescimento vegetal, pertencentes ao grupo das auxinas, como o ácido-indolacético (AIA) (BISWAS et al., 2000), giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico (FERGUSON & LESSENGER, 2006) e por solubilizarem fosfato (SHARMA et al., 2013).

3.3.1 Produção de fitormônios

O fitormônio conhecido como ácido indolacético (AIA), é o mais estudado e produzido pela maioria das bactérias promotoras de crescimento de plantas. Este fitormônio atua na alongação das células vegetais, na formação das raízes laterais e de pêlos radiculares, aumenta a absorção de nutrientes pela planta e beneficia a germinação das sementes (BISWAS et al., 2000; SOLANO et al., 2010).

Existem diferentes rotas metabólicas para a síntese de AIA por bactérias (SPAEPEN et al., 2007). A grande maioria das bactérias sintetizam AIA via triptofano, usado como o principal precursor fisiológico para a biossíntese de auxinas em plantas e microrganismos (KHALID et al., 2004), embora também possam vir a sintetizar o AIA por vias sem a utilização do triptofano, mas em menores quantidades (SPAEPEN et al., 2007; WANI et al., 2007). Sendo que as duas principais rotas metabólicas de biossíntese de AIA dependem de triptofano e foram detectadas em bactérias. A rota mais bem caracterizada de bactérias é a de indol-3-acetamina (IAM). A enzima triptofano monoxigenase (IaaH) converte o triptofano em IAM, e a enzima IAM hidrolase converte o IAM em AIA. A rota indol-3-piruvato (IPyA) é utilizada por vegetais para produção de AIA, esta rota foi identificada em bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (LAMBRECHT et al., 2000). A utilização de triptofano nas rotas de produção de AIA por rizóbios foi estudada por OSÓRIO FILHO et al., (2009) que demonstraram que os rizóbios estudados são dependentes de triptofano, pois não se observou produção significativa de AIA na ausência deste aminoácido.

As citocininas estimulam divisão celular (citocinese) e são produzidas nas raízes e transportadas por todas as partes da planta. Este hormônio está envolvido na senescência foliar, na mobilização de nutrientes, na dominância apical, na formação e a atividade dos meristemas apicais, o desenvolvimento floral, a germinação de sementes e na quebra de dormência de gemas (TAIZ & ZEIGLER, 2004). Assim como as auxinas, as citocininas podem influenciar na divisão celular, no crescimento celular, no desenvolvimento de raízes e na formação de pêlos radiculares (FRANKENBERGER & ARSHAD, 1995; FERGUSON & LESSENGER 2006). As giberelinas são produzidas principalmente nas raízes e nos brotos foliares, estimulam o crescimento de caules e folhas e influenciam na germinação de sementes (ROSS et al., 2000; MIRANSARI & SMITH 2009).

3.3.2 Solubilização de fosfato

O fósforo (P) é um nutriente essencial para o metabolismo de plantas, podendo limitar o seu crescimento. Encontrado em baixas quantidades na forma assimilável por plantas no solo, desta forma, pode vir a prejudicar a produção agrícola (EZAWA et al., 2002). Em solos agrícolas, atualmente, se encontram altas quantidades de P devido ao uso de fertilizantes. No entanto, a maior parte deste fosfato aplicado pelos fertilizantes minerais não é disponibilizado para planta (RICHARDSON et al., 2009).

O fosfato pode ser encontrado de forma insolúvel, como: fosfato de cálcio, de ferro, de magnésio, de alumínio entre outros, e convertido por micro-organismos do solo, em fosfato solúvel para assimilação de plantas (GYANESHWAR et al., 2002; VESSEY, 2003; CHAGAS Jr et al., 2010). Os micro-organismos 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).

A liberação de ácidos orgânicos, como: cítrico, láctico, glucônico, oxálico, acético, entre outros (VASQUEZ et al., 2000) e o ácido carboxílico (DEUBEL & MERBACH, 2005) por rizóbios faz com que se diminua o pH na rizosfera e ocorra a dissociação de fosfatos inorgânicos, como o tricálcico, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Esses micro-organismos acabam disponibilizando fosfato de forma direta, na solução do solo, ou de forma indireta, estimulando o crescimento de raízes e pêlos radiculares e aumentando a captação de fosfato pela planta (SHARMA et al. 2013). A inoculação de rizóbios pode ser uma alternativa para tornar o fosfato disponível para plantas tanto em leguminosas, como em não leguminosas (VESSEY, 2003).

3.4 Rizóbios como promotores de crescimento em gramíneas

A utilização de micro-organismos, com propósito de melhorar a disponibilidade de nutrientes para as plantas é uma prática importante e necessária para a agricultura sustentável (FREITAS et al., 2007). A inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento - RPCPs (KLOEPPER e SCHROTH 1978) em culturas demonstram aumentos significativos no crescimento e no rendimento agrônômico.

Dentre o grupo de rizobactérias, os rizóbios são amplamente estudados pela associação de simbiose com leguminosas e pela FBN. Essas bactérias também são caracterizadas como micro-organismos endofíticos, e quando assumem este papel, vivem pelo menos um período do seu ciclo de vida no interior da planta, sem causar doença. São capazes de colonizar folhas, caules e, principalmente as raízes das plantas (HALLMANN et al., 1997; HAHN, 2013). Osório Filho (2009) estudou a infecção por rizóbios em plântulas de arroz (*Oryza sativa*), utilizando rizóbios marcados, através da inserção do gene Gus por conjugação de plasmídeo. Demonstrou a capacidade destes micro-organismos em colonizar tecido radicular e parte aérea, concentrando-se principalmente em raízes secundárias, no córtex radicular e no tecido vascular das folhas. Estudos demonstram o efeito benéfico da interação de rizóbios com outras gramíneas, como o milho (CASSAN et al., 2009; HAHN et al., 2013), a aveia (STAJKOVICSRBINOVIC et al., 2014) e o trigo (ETESAMI et al., 2009).

Além de disponibilizar o nitrogênio atmosférico para leguminosas, os produtos da fixação realizada pelos rizóbios também podem beneficiar plantas não leguminosas subsequentes, utilizadas na rotação de culturas. Devido não só ao nitrogênio residual que fica disponível para planta seguinte, mas também pelo aumento da população microbiana na rizosfera, que pode promover o crescimento das plantas por diferentes mecanismos (CHI et al., 2005; HAYAT et al., 2008).

3.5 Arroz (*Oryza sativa*) e aveia-branca (*Avena sativa*)

Com o crescimento da população mundial há a necessidade de aumentar a produção de alimentos. Dentre os cereais o arroz é um dos mais produzidos no mundo, por ser a base alimentar de grande parte da população humana. De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a Região Sul é responsável por 81,4% da estimativa da produção nacional. O Estado do Rio Grande do Sul, como maior produtor, com 71,2% da produção esperada para todo país, aguarda uma produção de 8.433.761 toneladas, com rendimento médio esperado, de 7.759 kg/ha neste ano de 2016. O consumo médio anual deste grão chega a ser em torno de 60 Kg por pessoa ao ano, no Brasil em média 45 Kg por pessoa ao ano (IBGE, 2016).

Além de este cereal ser direcionado principalmente para o consumo humano, outras partes da planta também podem ser utilizadas na alimentação animal, combustíveis, fertilizantes, fabricação de papel (CARANGAL & TENGCO, 1986), entre outros. O arroz também pode ser utilizado para alimentação animal, antes da produção dos grãos e após a colheita destes, para o aproveitamento das eventuais sobras da lavoura e rebrotes. Há produtores que enfardam a palha que sobra após a colheita dos grãos para fornecerem aos animais no período de maior carência alimentar (MONKS et al., 2002).

Outro cereal de ampla utilização é a aveia branca (*Avena sativa*), gramínea de clima temperado, cultivada em diferentes condições climáticas. Esta cultura é voltada para a produção de grãos, produção de forragem, planta de cobertura e alimentação animal. A utilização de aveia na dieta alimentar tem crescido nos últimos anos, pelo teor de proteínas de qualidade e fibras solúveis que a compõe, e pela busca de alimentos mais nutritivos e saudáveis pela população (CRESTANI et al., 2010; KLAJN et al., 2014).

Dentre os principais fatores limitantes de crescimento de plantas está o fornecimento adequado de nutrientes para as culturas. O nitrogênio é um nutriente limitante de crescimento e desenvolvimento podendo ser disponibilizado indiretamente por rizóbios. Pois apesar destas bactérias não fixarem N quando associadas a gramíneas, podem estimular o crescimento radicular aumentando o aproveitamento dos nutrientes do solo, incluindo o N. Devido ao nitrogênio residual que fica disponível para planta subsequente na rotação de culturas. Há algum tempo, estuda-se que gramíneas cultivadas depois de leguminosas têm incremento em sua produção (CHI et al., 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para o isolamento dos rizóbios foram coletadas, em março de 2015, 10 amostras de solo, na camada de 0 a 20 cm de área de ocorrência de ervilhaca (*Vicia sativa*) na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS), localizada no município de Eldorado do Sul. O solo de onde foram realizadas as coletas é classificado como Argissolo vermelho distrófico típico (EMBRAPA, 2006) e apresenta as seguintes características químicas (0-20 cm de profundidade): pH em água 5,6; 280 g.Kg⁻¹ de argila; 24 g.Kg⁻¹ de matéria orgânica; 12,5mg.dm⁻³ de fósforo; 76 mg.dm⁻³ de potássio; 2,6 cmolc.dm⁻³ de cácio; 1,1 cmolc.dm⁻³ de magnésio; 0,5 cmolc.dm⁻³ de alumínio (HAHN, 2013).

4.1 Obtenção de nódulos radiculares

Para a obtenção dos nódulos radiculares foram cultivadas plantas de ervilhaca, em casa de vegetação, utilizando-se vasos “Leonard” (VINCENT, 1970), contendo substrato, composto de uma mistura de vermiculita e areia (2:1) no compartimento superior. Os vasos foram esterilizados em autoclave durante duas horas a 120°C. Após a esterilização dos vasos foi adicionada solução nutritiva (SARRUGE, 1975) isenta de nitrogênio na porção inferior dos vasos.

As sementes de ervilhaca foram desinfestadas, por imersão em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 segundos e sete lavagens sucessivas com água destilada esterilizada em autoclave a 120 °C, por 20 minutos. Para pré-germinação das sementes utilizou-se placas de petri contendo papel absorvente (esterilizados em autoclave a 120°C, por 20 minutos). Foram dispostas 30 sementes por placa e adicionado três mL de água destilada estéril, as placas foram mantidas em estufa a 28°C no escuro e observadas diariamente durante três dias.

Foram plantadas quatro sementes pré-geminadas, por vaso. A inoculação dos vasos foi realizada imediatamente após o plantio, colocando-se 5 mL da suspensão de 10 gramas de solo em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada.

Após cinco dias foi realizado o desbaste deixando-se apenas uma planta por vaso. O experimento foi conduzido com quatro repetições para cada amostra. A

avaliação da nodulação foi realizada 40 dias após a inoculação e os nódulos obtidos foram retirados das raízes das plantas para avaliação.

4.2 Isolamento e caracterização da morfologia colonial dos rizóbios

O isolamento das colônias bacterianas foi realizado a partir dos nódulos radiculares de ervilhaca que foram acondicionados em frascos com sílica. Os nódulos foram reidratados durante uma hora em água destilada estéril. Após, os nódulos foram desinfestados, por imersão em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 segundos e sete lavagens sucessivas com água destilada esterilizada em autoclave a 120 °C, por 20 minutos.

Para o isolamento foram utilizadas placas de petri contendo meio de cultura levedura-manitol (LM) (VINCENT, 1970) com adição do corante vermelho congo ambos autoclavados. Os nódulos foram macerados nas placas de petri com auxílio de uma pinça estéril. E após, com o auxílio de alça de platina foi realizada a inoculação por meio da técnica de esgotamento em placas. As colônias foram reinoculadas em placas de petri até que se obtivessem colônias puras, isoladas e com características persistentes. As placas foram mantidas em estufa a 28 °C e observadas diariamente.

As colônias bacterianas foram inoculadas em tubos contendo meio ágar levedura manitol (LM) inclinado e armazenadas sob refrigeração a 12 °C para posteriores testes.

Os cultivos foram avaliados quanto à morfologia colonial, onde se observaram os seguintes aspectos: o tipo de borda, a forma colonial, a elevação, o brilho da superfície, o tamanho, a densidade ótica e a viscosidade das colônias.

Para a avaliação da produção de compostos alcalinos ou ácidos pelos rizóbios, estes foram inoculados em tubos contendo 10 mL de meio de cultura levedura manitol (LM) sólido (VICENT, 1970) com adição do corante azul de bromotimol (25mg/L) e incubados a 28 °C em estufa. Diariamente, os tubos foram avaliados visualmente e anotadas as alterações na coloração do meio durante 7 dias: cor amarela indicando acidificação e cor azul alcalinização (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994).

Além disso, os rizóbios foram submetidos à coloração de Gram com o kit Conjunto para coloração de Gram da marca NEW PROV®, de acordo com as

instruções do fabricante.

4.3 Autenticação dos isolados

Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de induzir a formação de nódulos radiculares e fixar nitrogênio em plantas de ervilhaca (*Vicia sativa*). O experimento foi realizado em casa de vegetação e foram utilizados copos descartáveis de 500 mL contendo substrato composto de uma mistura de vermiculita e areia na proporção de 2:1 respectivamente e previamente esterilizado em autoclave durante duas horas a 120°C.

As sementes de ervilhaca foram desinfestadas e pré-germinadas, como descritas no item 4.1. Quatro sementes pré-germinadas foram plantadas por copo, e adicionou-se 2 mL do inóculo com uma concentração média de $1,9 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹. O inóculo constitui-se do caldo de rizóbios crescidos em meio levedura-manitol (LM) por três dias a 28°C sob agitação constante a 120 rpm. Após cinco dias foi realizado o desbaste deixando-se apenas uma planta por vaso.

A cada dois dias foram aplicados 100 mL de solução nutritiva (SARRUGE, 1975) isenta de nitrogênio, diluída a 25%, para nutrição das plantas. Cada isolado foi inoculado em quatro repetições, distribuídas ao acaso e foi realizado um controle sem inoculação para avaliar alguma possível contaminação.

Após 40 dias as plantas foram retiradas dos copos plásticos descartáveis e avaliadas visualmente quanto à formação de nódulos radiculares e a verificação da coloração avermelhada do nódulo, a qual caracteriza de fixação biológica de nitrogênio. Os isolados bacterianos que não induziram a formação de nódulos radiculares foram descartados.

4.4 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato tricálcico

Para se avaliar a capacidade de solubilização de fosfato por rizóbios foram utilizadas placas de petri contendo o meio com 10 g.L⁻¹ glicose, 5 g.L⁻¹ de NH₄Cl, 1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 15 g.L⁻¹ de ágar (VERMA et al., 2001), em pH 6,8, adaptado, onde se substituiu 4 g.L⁻¹ de fosfato de cálcio (CaHPO₄) por 1 g.L⁻¹ de fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂), como fonte de fosfato, autoclavados a 120 °C, por 20 minutos. Para a inoculação em placas, todos os isolados foram crescidos em frascos

âmbar com tampa de baquelite contendo 15 mL de meio levedura manitol e mantidos sob agitação constante a 120 rpm, a 28°C durante três dias. A inoculação nas placas foi realizada com gotas de 20 µL, em três repetições por isolado. As placas foram mantidas em estufa a 28°C durante 7 dias. Foram utilizados dois controles, como controle positivo foi inoculado o rizóbio UFRGS-Vp16, já testado como solubilizador de fosfato, e como controle negativo o rizóbio UFRGS-Vp5 que não apresenta a capacidade de solubilizar fosfato (ALVES, 2005), ambos da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

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

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

Para este experimento foi utilizada a metodologia de ASGHAR et al., (2002), adaptada. Utilizando-se erlenmeyers de 50 mL contendo 25 mL do meio Levedura manitol (LM) líquido com e sem adição de triptofano (50 mg/L), esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos, os isolados bacterianos foram inoculados em triplicatas e incubados por três dias em incubadora a 28°C, sob agitação orbital de 120 rpm.

Após este período, foram transferidos 2mL do cultivo bacteriano para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e centrifugados a 10.000 por 10 minutos o sobrenadante foi retirado e adicionado 1 mL de solução de Salkowski (2 mL de FeCl₃ 0,5M + 98 mL de HClO₄ 35%), incubados com ausência de luz a temperatura ambiente durante 30 minutos, tempo necessário para que ocorra a reação de oxidação dos compostos indólicos por sais férricos. Para a quantificação foi utilizado o espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm.

A concentração de AIA das amostras foram calculadas comparando-se com as leituras da curva padrão, com 0,0,5, 1, 3, 7, 11, 15, 20, 25, 50 e 100 µg de AIA sintético mL⁻¹.

4.6 Avaliação da eficiência dos rizóbios na fixação simbiótica de nitrogênio em Ervilhaca

O experimento foi realizado em casa de vegetação e utilizaram-se vasos de 500 mL contendo substrato composto de uma mistura de vermiculita e areia na proporção de 2:1 respectivamente e previamente esterilizado em autoclave durante duas horas a 120°C. Em cada vaso foram plantadas quatro sementes de ervilhaca previamente desinfestadas e pré-germinadas, conforme descrito no item 4.1.

As bactérias foram inoculadas conforme descrito no item 4.3. Além dos tratamentos inoculados, também foram conduzidos dois tratamentos controles, um sem e outro com adição de nitrogênio (NH_4NO_3), conforme recomendação para a cultura ($100 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$), sendo o N aplicado em duas doses semanais ao longo do experimento e as plantas irrigadas diariamente com solução nutritiva (SARRUGE, 1975) esterilizada, diluída a 25%. Após cinco dias foi realizado o desbaste deixando-se apenas uma planta por vaso. O experimento foi conduzido durante 40 dias em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o delineamento do experimento foi inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento.

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 produção de matéria seca dos nódulos, o número de nódulos e a matéria seca da raiz. 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 da parte aérea, em comparação com os tratamentos controle.

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

Onde:

IER (%) = índice de eficiência relativa;

MS inoculado = massa seca da parte aérea do tratamento inoculado;

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

MS controle com N = massa seca da parte aérea do controle com adição de 100% de nitrogênio;

4.7 Efeito da inoculação de rizóbios na germinação de sementes de cultivares de arroz (*Oriza sativa*) e de aveia branca (*Avena sativa*)

De acordo com a avaliação da capacidade dos isolados em solubilizar fosfato, produzir ácido indolacético (AIA) e eficiência simbiótica, foram selecionados cinco isolados (UFRGS Vs6, UFRGS Vs12, UFRGS Vs16, UFRGS Vs26 e UFRGS Vs30) para serem testados em sementes de arroz das cultivares: IRGA 430, IRGA 424 e IRGA 424RI e em sementes de aveia branca variedade URS Corona.

Para o teste de germinação foram utilizadas sementes de arroz e de aveia branca previamente desinfestadas, como descrito no item 4.1.

Foram utilizadas placa de petri com papel absorvente, anteriormente esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos, onde foram dispostas 50 sementes de arroz e 30 sementes de aveia. Após, as bactérias foram inoculadas conforme descrito no item 4.3. O tratamento controle (sem inoculação) foi constituído de 2mL de meio levedura manitol liquido (LM) esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

As placas foram colocadas em estufa a 28°C e, a cada 24 horas, as sementes germinadas foram contadas e retiradas, avaliadas durante oito dias para o arroz e sete para aveia.

Para avaliação da germinação, foram utilizados os seguintes parâmetros: percentagem de germinação total calculada pela razão entre o número de sementes germinadas no final do período de incubação e o número total de sementes colocadas para germinar, 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) e o percentual de germinação acumulada, onde os isolados que apresentaram diferença significativa em relação ao controle LM foram submetidos ao teste t, com o auxílio do programa Past (HAMMER et al., 2015).

4.8 Avaliação da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento em cultivares de arroz e aveia branca em casa de vegetação

A capacidade dos rizóbios (UFRGS Vs6, UFRGS Vs12, UFRGS Vs16, UFRGS Vs26 e UFRGS Vs30) em promover o crescimento das plantas de arroz e de aveia foi avaliada em experimento em casa de vegetação.

Os rizóbios foram testados em plantas de arroz (*Oriza sativa*) das cultivares: IRGA 430, IRGA 424 e IRGA 424RI.

A cultivar IRGA 430 foi utilizada por apresentar bom desempenho de produtividade dos grãos, boa qualidade industrial e culinária dos grãos. É resistente à toxidez por ferro no solo, moderadamente resistente à brusone na folha e moderadamente suscetível à brusone da panícula. É de ampla adaptação nas diferentes regiões orizícolas do Rio Grande do Sul. A cultivar IRGA 424 destaca-se pelo alto potencial produtivo e boa qualidade industrial, além de ser tolerante à toxidez por ferro e resistente à brusone. Indicada para cultivo nas regiões da Zona Sul e Campanha, onde apresenta boa adaptação às condições de temperatura média baixa, mas mostra excelente desempenho também nas demais regiões do Estado do Rio Grande do Sul. Outra cultivar utilizada foi a IRGA 424 RI que é derivada da IRGA 424. Dentre suas características apresenta alto potencial de produtividade de grãos, resistente aos herbicidas do grupo químico das Imidazolinonas, e por isso é utilizada como alternativa de manejo para o controle do arroz vermelho. Resistente a brusone na folha e na panícula, além disso, é resistente à toxidez por excesso de ferro no solo. (SOSBAI, 2014).

Utilizou-se substrato composto de uma mistura de vermiculita e areia na proporção de 2:1 respectivamente, esterilizados em autoclave durante duas horas a 120°C. As sementes foram previamente desinfestadas e pré-germinadas, como descritas no item 4.1. Foram utilizados vasos de 500 mL contendo o substrato e plantadas quatro sementes pré-germinadas por vaso. As bactérias foram inoculadas conforme descrito no item 4.3. O desbaste foi realizado após sete dias do plantio,

deixando-se uma planta por vaso. Utilizaram-se tratamentos composto de rizóbio + 50% da dose de nitrogênio requerida pela cultura e o tratamento controle com adição de apenas 50% da dose de nitrogênio (para arroz 120 Kg.ha⁻¹), conforme recomendação para a cultura, sendo o N aplicado em duas doses semanais ao longo do experimento e as plantas irrigadas diariamente com solução nutritiva (SARRUGE, 1975) esterilizada, diluída a 25%. O experimento com plantas de arroz foi conduzido por um período de 40 dias com quatro repetições. As avaliações foram: massa seca da parte aérea, massa seca de raiz, número de perfilhos, volume de raiz. O teor de nitrogênio total na parte aérea foi determinado utilizando-se o método descrito por TEDESCO et al., (1995).

Para o experimento com plantas de aveia em casa de vegetação foi utilizado substrato composto de uma mistura de vermiculita e areia na proporção de 2:1 respectivamente, esterilizados em autoclave durante duas horas a 120°C. As sementes foram previamente desinfestadas e pré-germinadas, como descritas no item 4.1. Foram utilizados vasos de 2kg contendo o substrato e plantadas quatro sementes pré-germinadas por vaso. As bactérias foram inoculadas conforme descrito no item 4.3. O desbaste foi realizado após sete dias do plantio, deixando-se uma planta por vaso. Foram utilizados tratamentos rizóbio + 50% da dose de nitrogênio requerida pela cultura, um tratamento controle apenas com adição de 50% da dose de nitrogênio e outro com adição de 100% da dose (aveia 150 Kg.ha⁻¹), conforme recomendação para a cultura, sendo o N aplicado em duas doses semanais ao longo do experimento e as plantas irrigadas diariamente com solução nutritiva (SARRUGE, 1975) esterilizada, diluída a 25%. O experimento com plantas de aveia foi conduzido por um período de 30 dias com cinco repetições. As avaliações foram: massa seca da parte aérea, massa seca de raiz, volume de raiz, número de folhas e índice de eficiência relativa (IER).

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 da parte aérea, em comparação com os tratamentos controle conforme a seguinte equação:

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

Onde:

IER (%) = índice de eficiência relativa;

MS inoculado = massa seca da parte aérea do tratamento inoculado;

MS controle com 50% N = massa seca da parte aérea do controle inoculado com 50% N;

MS controle com 100% N = massa seca da parte aérea do controle inoculado com 100% N;

Para medir o volume de raiz das plantas de arroz e de aveia, as raízes foram separadas da parte aérea, com corte próximo a base do caule, e lavadas. Após, foram transportadas ao laboratório, onde, em uma proveta de 100 ml, adicionou-se 60mL de água destilada foram inseridas as raízes, anotando-se o volume de água deslocado. Após, as raízes foram acondicionadas em sacos de papel etiquetados e colocadas em estufa para secagem a 60°C até atingir peso constante após foram pesadas a massa seca da raiz e da parte aérea.

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

As bactérias UFRGS Vs6, UFRGS Vs12, UFRGS VS16, UFRGS Vs26 e UFRGS Vs30 testadas para promoção de crescimento em plantas de arroz e aveia foram caracterizadas em nível de espécie.

O DNA genômico foi extraído utilizando-se o Wizard kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

A partir do DNA genômico dos isolados, a região do DNA do gene que codifica a porção 16S rRNA foi amplificada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se os oligonucleotídeos 8F (AGAGTTTGATCCTTGGCTCAG) e 1492R (GCYTACCTTGTT-ACGACTT) (EDWARDS et al., 1989).

A reação da PCR foi realizada em volume total de 25 µL, master mix (Ludwig Biotecnologia) contendo 1X de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia), 1,5 mM de MgCl₂ (Ludwig Biotecnologia), 200 mM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 1U de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia), 100 ng de Dna e água ultra pura estéril para completar o volume da reação (MiliQPlus, Milipore®)

A reação foi incubada em termociclador “Applied Biosystems 2710 Thermal Cycler” nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 40

ciclos de desnaturação 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por um minuto; extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto da amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®) e visualizados sob luz ultravioleta.

Os fragmentos de DNA de aproximadamente 1000 pb foram enviados para o laboratório de biologia molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) para sequenciamento utilizando o equipamento automático ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para caracterizar as bactérias em nível de espécie foram comparados os resultados obtidos das fitas *forward* com os resultados obtidos das fitas *reverse* utilizando-se o software Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) e comparadas com as sequências de DNA existentes na base de dados do “National Center for Biotechnology Information – Basic Local Alignment Search Tool” (NCBI – BLAST) (<HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.10 Análise estatística

Para análise estatística os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa estatístico Assistat 7.7 (SILVA, 2015), e as médias foram comparadas utilizando o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização morfológica e autenticação

Foram obtidos 30 isolados bacterianos. Todos os isolados foram caracterizados como bastonetes de acordo com a forma celular e Gram negativos, por apresentarem coloração vermelha quando submetidos à coloração de Gram e visualizados em microscópio. Estes resultados estão de acordo com os observado para bactérias do grupo dos rizóbios, pertencentes as α -Proteobactérias, apresentando estes micro-organismos reação de Gram negativa (SOMASEGARAM & HOBEN, 1994; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Todos os isolados apresentaram colônias com cor creme, bordos lisos, forma circular, elevação convexa, superfície brilhosa e textura viscosa. Todos os isolados apresentaram colônias de crescimento rápido, característica que se refere a bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, sendo que o tamanho das colônias variou de ≤ 1 mm chegando a 6 mm de diâmetro após três dias de incubação a 28 ° C.

Outra característica avaliada foi a reação em meio cultura, levedura manitol (LM) sólido (VICENT, 1970) com adição do corante azul de bromotimol (25mg/L), após o crescimento dos rizóbios. O meio adquiriu coloração amarelada, para todos os isolados estudados indicando a acidificação do meio de cultura (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994). Características semelhantes foram observadas por CHAGAS JUNIOR et al., (2010) trabalhando com 20 isolados bacterianos de rizóbio. Todos os 20 isolados apresentaram borda lisa e forma da colônia circular, variando a cor da colônia entre branca e creme, a elevação da colônia caracterizada como plana ou elevada, 18 isolados com a textura colonial viscosa e 19 apresentaram pH ácido. Quanto ao tamanho das colônias houve variação de ≤ 2 e >2 e 14 isolados de crescimento rápido de ≤ 3 dias. Resultados semelhantes foram encontrados por MEDEIROS et al., (2009) que obtiveram 304 isolados com características persistentes de colônias de rizóbio. A maioria das colônias com coloração creme, borda inteira, homogênea, circular, crescimento rápido em apenas um dia e acidificaram o pH do meio de crescimento.

Todos os rizóbios isolados de ervilhaca foram inoculados em plantas de ervilhaca para se avaliar as características simbióticas de indução de nódulos radiculares e fixação simbiótica de nitrogênio (Tabela 1). Todos os isolados

mostraram capacidade de induzir a nodulação.

Tabela 1 - Nodulação e fixação de nitrogênio por rizóbios isolados de raízes de Ervilhaca (*Vicia sativa*) cultivada em experimento para autenticação realizado em casa de vegetação por 40 dias

| Isolado | Nodulação | Fixação N |
|----------------|------------------|------------------|
| UFRGS Vs 1 | + | - |
| UFRGS Vs 2 | + | - |
| UFRGS Vs 3 | + | - |
| UFRGS Vs 4 | + | - |
| UFRGS Vs 5 | + | - |
| UFRGS Vs 6 | + | + |
| UFRGS Vs 7 | + | - |
| UFRGS Vs 8 | + | - |
| UFRGS Vs 9 | + | - |
| UFRGS Vs 10 | + | - |
| UFRGS Vs 11 | + | - |
| UFRGS Vs 12 | + | + |
| UFRGS Vs 13 | + | + |
| UFRGS Vs 14 | + | + |
| UFRGS Vs 15 | + | + |
| UFRGS Vs 16 | + | + |
| UFRGS Vs 17 | + | + |
| UFRGS Vs 18 | + | + |
| UFRGS Vs 21 | + | + |
| UFRGS Vs 22 | + | + |
| UFRGS Vs 24 | + | + |
| UFRGS Vs 25 | + | + |
| UFRGS Vs 26 | + | + |
| UFRGS Vs 27 | + | + |
| UFRGS Vs 28 | + | + |
| UFRGS Vs 29 | + | + |
| UFRGS Vs 30 | + | + |
| UFRGS Vs 31 | + | - |
| UFRGS Vs 32 | + | + |
| UFRGS Vs 34 | + | + |

Legenda: + = positivo para característica; - = negativo para característica

Dentre os 30 rizóbios estudados, 19 mostraram capacidade de fixar nitrogênio. Essa capacidade é avaliada quando ocorre a formação de nódulos avermelhados, indicando a presença de leghemoglobina que é sintetizada nos nódulos da raiz de leguminosas durante a fixação biológica de nitrogênio, essa

coloração avermelhada é utilizada como indicativo de eficiência simbiótica (RIBEIRO & RAMOS, 2006).

5.2 Capacidade de solubilização de fosfato tricálcico

Os isolados de nódulos radiculares de ervilhaca (*Vicia sativa*) foram testados quanto a capacidade de solubilizar fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), em meio de cultura (Tabela 2).

Tabela 2 - Capacidade de solubilização de fosfato tricálcico por rizóbios isolados de nódulos radiculares de ervilhaca (*Vicia sativa*)

| Rizóbio | ISF |
|-------------|--------------------|
| UFRGS Vs 2 | 1,33 ^{ns} |
| UFRGS Vs 31 | 1,23 |
| UFRGS Vs 11 | 1,23 |
| UFRGS Vs 8 | 1,22 |
| UFRGS Vs 28 | 1,22 |
| UFRGS Vs 13 | 1,21 |
| UFRGS Vs 4 | 1,21 |
| UFRGS Vs 1 | 1,20 |
| UFRGS Vs 9 | 1,20 |
| UFRGS Vs 12 | 1,18 |
| UFRGS Vs 30 | 1,18 |
| UFRGS Vs 10 | 1,18 |
| UFRGS Vs 3 | 1,17 |
| UFRGS Vs 22 | 1,17 |
| UFRGS Vs 29 | 1,17 |
| UFRGS Vs 21 | 1,17 |
| UFRGS Vs 15 | 1,16 |
| UFRGS Vs 14 | 1,15 |
| UFRGS Vs 16 | 1,15 |
| UFRGS Vs 18 | 1,08 |
| UFRGS Vs 5 | - |
| UFRGS Vs 6 | - |
| UFRGS Vs 7 | - |
| UFRGS Vs 17 | - |
| UFRGS Vs 24 | - |
| UFRGS Vs 25 | - |
| UFRGS Vs 26 | - |
| UFRGS Vs 27 | - |
| UFRGS Vs 32 | - |
| UFRGS Vs 34 | - |
| CV (%) | 7,37 |

CV= coeficiente de variação, ns= não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-knott

Dentre os 30 isolados de rizóbios, as colônias bacterianas de 10 deles (UFRGSVs5, UFRGSVs6, UFRGSVs7, UFRGSVs17, UFRGSVs24, UFRGSVs25, UFRGSVs26, UFRGSVs27, UFRGSVs32 e UFRGSVs34) não formaram halo transparente no meio de cultura, indicando que estes isolados não são capazes de solubilizar fosfato tricálcico.

No entanto, os outros 20 isolados (Tabela 02) e o controle UFRGS-Vp16 (*Burkholderia sp.*), utilizado por já ter demonstrado previamente a capacidade de solubilizar fosfato no trabalho de Alves (2005), apresentaram a característica de formação de halo transparente ao redor da colônia em meio de cultura. Os índices de solubilização de fosfato (ISF) variaram de 1,08 a 1,33, não diferindo entre si. Resultados semelhantes foram encontrados por Chagas Junior et al (2010), que observaram variação em relação ao índice de solubilização de fosfato entre 1,10 e 1,55 em 10 dos rizóbios estudados. Em outro trabalho (ISLAM et al. 2007), foram isoladas rizobactérias de plantas de arroz, as quais apresentaram variação no ISF entre 1,2 e 2,5 e relacionado o tamanho do halo de solubilização a quantidade de fosfato solubilizado podendo chegar de 2 a 132 $\mu\text{g/ml}$ de fosfato tricálcico em meio de cultura líquido. Pandey e Maheshwari (2007) e Badawi et al. (2011) encontraram *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* eficientes solubilizadores de fosfato e, que também excretavam AIA. Foram utilizadas bactérias que solubilizam fosfato e excretam AIA por Chagas Junior et al (2010) e, obtiveram aumento significativo na produção de massa seca da parte aérea em plantas de feijão caupi. Os isolados chegaram a produzir cerca de 3,9g por vaso de massa seca da parte aérea, mesmo resultado obtido pelas plantas adubadas com nitrogênio.

5.3 Produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético (AIA)

A capacidade dos rizóbios de produzir ácido indol-acético foi avaliada em meio de cultura líquido LM com e sem adição de triptofano. Todos os rizóbios foram capazes de produzir ácido indol-acético em ambos os meios de cultura (Tabela 3).

Em meio de cultura sem adição de triptofano, as quantidades produzidas pelas bactérias variaram de 1,6 a 5,8 AIA $\mu\text{g.ml}^{-1}$. O isolado UFRGS Vs34 apresentou a menor produção (1,6 AIA $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A bactéria UFRGS Vs12 foi a que

mais produziu AIA (5,8 AIA $\mu\text{g. mL}^{-1}$), seguida por UFRGS Vs13 (5,0 AIA $\mu\text{g. mL}^{-1}$), e UFRGS Vs16 (4,9 AIA $\mu\text{g. mL}^{-1}$), demonstrando a capacidade de produção de AIA pelos isolados mesmo quando não adicionado o triptofano, precursor do ácido indol-acético, ao meio de cultura LM.

Tabela 3 - Médias seguidas do desvio padrão da produção de ácido indol-acético (AIA) em meio de cultura LM, sem e com adição de triptofano por rizóbios isolados de ervilhaca (*Vicia sativa*)

| Rizóbio | sem Triptofano | com Triptofano |
|-------------|-----------------------|--------------------|
| | $\mu\text{g/mL}^{-1}$ | |
| UFRGS Vs 27 | 1,8 \pm 0,2 c** | 87,3 \pm 3,1 a** |
| UFRGS Vs 16 | 4,9 \pm 0,7 a | 86,2 \pm 8,7 a |
| UFRGS Vs 15 | 2,9 \pm 0,5 b | 85,1 \pm 3,9 a |
| UFRGS Vs 10 | 3,2 \pm 0,4 b | 79,0 \pm 1,5 b |
| UFRGS Vs 29 | 1,6 \pm 0,4 c | 78,6 \pm 7,2 b |
| UFRGS Vs 28 | 1,7 \pm 0,5 c | 76,5 \pm 5,0 b |
| UFRGS Vs 7 | 2,9 \pm 0,2 b | 76,4 \pm 4,9 b |
| UFRGS Vs 14 | 2,2 \pm 0,6 c | 73,7 \pm 4,5 c |
| UFRGS Vs 12 | 5,8 \pm 0,7 a | 73,3 \pm 1,4 c |
| UFRGS Vs 21 | 2,5 \pm 0,4 b | 71,6 \pm 3,3 c |
| UFRGS Vs 31 | 2,3 \pm 0,4 c | 71,3 \pm 1,7 c |
| UFRGS Vs 32 | 2,2 \pm 0,4 c | 67,2 \pm 6,7 d |
| UFRGS Vs 26 | 2,0 \pm 1,2 c | 65,9 \pm 6,6 d |
| UFRGS Vs 22 | 2,7 \pm 1,7 b | 65,7 \pm 2,6 d |
| UFRGS Vs 6 | 2,5 \pm 0,2 b | 64,0 \pm 4,4 d |
| UFRGS Vs 30 | 2,2 \pm 0,7 c | 60,9 \pm 2,9 d |
| UFRGS Vs 5 | 2,9 \pm 0,2 b | 58,5 \pm 2,7 e |
| UFRGS Vs 18 | 2,3 \pm 0,8 c | 57,6 \pm 4,1 e |
| UFRGS Vs 8 | 2,6 \pm 0,0 b | 53,7 \pm 2,7 e |
| UFRGS Vs 9 | 3,2 \pm 0,2 b | 53,4 \pm 4,6 e |
| UFRGS Vs 34 | 1,6 \pm 0,7 c | 50,5 \pm 7,4 f |
| UFRGS Vs 17 | 2,5 \pm 0,1 b | 49,5 \pm 7,1 f |
| UFRGS Vs 24 | 3,4 \pm 1,2 b | 46,9 \pm 3,5 f |
| UFRGS Vs 13 | 5,0 \pm 1,0 a | 46,7 \pm 4,7 f |
| UFRGS Vs 25 | 2,2 \pm 0,5 c | 45,3 \pm 3,1 f |
| UFRGS Vs 2 | 2,8 \pm 0,3 b | 38,5 \pm 5,8 g |
| UFRGS Vs 11 | 2,4 \pm 0,1 c | 38,2 \pm 0,4 g |
| UFRGS Vs 3 | 3,1 \pm 0,3 b | 35,7 \pm 1,1 g |
| UFRGS Vs 1 | 2,5 \pm 0,3 b | 33,2 \pm 0,3 g |
| UFRGS Vs 4 | 2,7 \pm 0,1 b | 30,2 \pm 1,0 g |
| CV (%) | 21,81 | 7,64 |

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

Em meio de cultura enriquecido com 50 mg. mL⁻¹ de triptofano, os rizóbios foram estimulados a produzir mais ácido indol-acético. Os valores de AIA produzidos variaram de 30,2 a 87,3 µg. mL⁻¹ de AIA. As maiores produções de AIA foram alcançadas pelos isolados UFRGS Vs27, UFRGS Vs16 e UFRGS Vs15 que foram capazes de produzir respectivamente 87,3 e 86,2 e 85,1 µg.mL⁻¹ de AIA. Segundo, WANI et al., (2007) espécies de rizóbio na presença e ausência de triptofano são capazes de sintetizar AIA em quantidades variáveis. Dentre os efeitos benéficos atribuídos as plantas quando inoculadas com rizóbios produtores de AIA estão o aumento na formação de raízes adventícias (SOLANO et al. 2010) e o aumento da área superficial das raízes em não leguminosas (DAZZO & YANNI, 2006). Além disso, NOEL et al., (1996) observaram aceleração na germinação de canola e alface quando inoculados com estirpes produtoras de AIA e, BISWAS et al., (2000) relataram o aumento de matéria seca e produção de grãos, além de um incremento em N, P, K e teor de Fe nos tecidos de plantas de arroz inoculadas com *R. leguminosarum* bv. Trifolii. A produção deste fitormônio pelos rizóbios pode promover o crescimento de plantas, melhorando o seu desenvolvimento e rendimento (OSÓRIO FILHO et al., 2009). No entanto, o excesso de produção de AIA em alguns casos por rizobactérias promotoras de crescimento RBPCS pode ser prejudicial para as plantas. Segundo BISWAS et al., (2000), a produção de fitormônios, como o AIA por bactérias pode estimular a promoção de crescimento em plantas dentro de uma faixa benéfica de concentração. Onde as concentrações mais baixas são ineficazes e as mais elevadas são tóxicas para as plantas (AHMAD et al., 2005).

No trabalho de SCHLINDWEIN et al., (2008), foi demonstrado que a estirpe *R. leguminosarum* bv. trifolii TV-13 que produziu 171,1 µg.mL⁻¹ AIA em meio enriquecido com triptofano, causou efeito negativo na germinação de sementes de alface, enquanto que as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. isoladas a partir de raízes de acácia negra produziram entre 1,2 e 3,3 mg / mL de AIA aumentaram o vigor das plântulas de alface.

5.4 Avaliação da eficiência dos rizóbios na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de Ervilhaca (*Vicia sativa*) em casa de vegetação

A eficiência simbiótica dos rizóbios estudados foi avaliada em experimento em casa de vegetação com plantas de ervilhaca. Os parâmetros avaliados foram: 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 4).

Tabela 4 – 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) dos isolados de *Vicia sativa* e dos tratamentos controle

| Tratamentos | MSPA | MSR | MSN | NN | IER |
|--------------|------------------|------------------|---------------|----------------|-------|
| | MG | | | | % |
| Controle +N | 233,8 ± 81,3 a** | 107,8 ± 35,9 a** | - | - | 100 |
| UFRGS Vs 30 | 169,3 ± 53,6 b | 88,8 ± 16,9 a | 5,3 ± 4,5 a** | 60,2 ± 31,2 a* | 55,2 |
| UFRGS Vs 25 | 135,6 ± 46,7 c | 68,6 ± 12,2 b | 5,7 ± 1,6 a | 47,7 ± 11,9 b | 31,8 |
| UFRGS Vs 34 | 132,2 ± 38,0 c | 79,8 ± 43,2 a | 4,7 ± 0,2 a | 45,2 ± 12,7 b | 29,5 |
| UFRGS Vs 26 | 130,5 ± 46,5 c | 104,9 ± 33,3 a | 7,8 ± 3,6 a | 59,0 ± 24,3 a | 28,3 |
| UFRGS Vs 27 | 122,7 ± 51,8 c | 67,1 ± 13,8 b | 6,0 ± 2,8 a | 44,5 ± 14,3 b | 22,9 |
| UFRGS Vs 29 | 122,5 ± 39,9 c | 76,9 ± 32,8 a | 5,8 ± 4,9 a | 44,5 ± 17,3 b | 22,7 |
| UFRGS Vs 28 | 116,5 ± 15,6 c | 57,4 ± 17,1 b | 5,3 ± 1,2 a | 57,2 ± 21,4 a | 18,5 |
| UFRGS Vs 22 | 115,0 ± 22,0 c | 72,6 ± 9,3 a | 5,5 ± 2,9 a | 74,7 ± 20,7 a | 17,5 |
| UFRGS Vs 18 | 112,8 ± 52,9 c | 86,0 ± 42,9 a | 4,1 ± 0,7 a | 57,2 ± 9,9 a | 16,0 |
| UFRGS Vs 31 | 112,5 ± 48,1 c | 76,7 ± 26,0 a | 2,4 ± 1,6 b | 40,7 ± 24,9 b | 15,8 |
| UFRGS Vs 12 | 105,4 ± 15,8 c | 64,4 ± 5,5 b | 3,1 ± 0,6 b | 64,7 ± 28,5 a | 10,9 |
| UFRGS Vs 3 | 104,9 ± 18,2 c | 59,2 ± 6,2 b | 4,3 ± 1,2 a | 46,0 ± 8,0 b | 10,5 |
| UFRGS Vs 5 | 102,9 ± 27,4 c | 76,6 ± 18,2 a | 4,8 ± 1,7 a | 51,0 ± 20,7 b | 9,1 |
| UFRGS Vs 14 | 99,9 ± 21,8 c | 64,1 ± 19,9 b | 6,6 ± 1,8 a | 61,7 ± 8,1 a | 7,0 |
| UFRGS Vs 15 | 99,5 ± 14,4 c | 49,2 ± 9,9 b | 6,9 ± 1,8 a | 69,5 ± 13,0 a | 6,8 |
| UFRGS Vs 13 | 98,9 ± 22,5 c | 81,7 ± 44,6 a | 2,3 ± 1,5 b | 50,5 ± 9,7 b | 5,9 |
| UFRGS Vs 4 | 97,8 ± 11,4 c | 63,4 ± 20,3 b | 3,3 ± 1,3 b | 38,5 ± 6,4 b | 5,5 |
| UFRGS Vs 32 | 97,2 ± 27,1 c | 64,5 ± 22,4 b | 5,4 ± 1,4 a | 60,5 ± 16,1 a | 5,1 |
| UFRGS Vs 6 | 96,8 ± 50,3 c | 55,9 ± 16,8 b | 2,5 ± 0,7 b | 35,2 ± 16,3 b | 4,8 |
| UFRGS Vs 17 | 86,5 ± 20,2 d | 51,1 ± 3,1 b | 5,3 ± 0,9 a | 78,0 ± 30,3 a | -2,3 |
| UFRGS Vs 9 | 81,4 ± 12,2d | 42,0 ± 10,1 b | 3,3 ± 1,9 b | 58,7 ± 32,3 a | -5,8 |
| UFRGS Vs 24 | 76,9 ± 35,1d | 51,7 ± 19,5 b | 4,30 ± 1,8 a | 40,0 ± 14,3 b | -8,9 |
| UFRGS Vs 11 | 74,6 ± 20,8d | 50,2 ± 20,6 b | 2,80 ± 2,3 b | 32,2 ± 27,7 b | -10,5 |
| UFRGS Vs 10 | 74,1 ± 26,2d | 50,6 ± 14,4 b | 2,15 ± 0,4 b | 40,7 ± 15,6 b | -10,9 |
| UFRGS Vs 16 | 73,9 ± 11,7d | 51,4 ± 6,7 b | 4,90 ± 1,3 a | 92,7 ± 36,2 a | -11,1 |
| UFRGS Vs 2 | 70,9 ± 48,5d | 56,0 ± 18,8 b | 1,85 ± 0,7 b | 42,2 ± 9,8 b | -13,1 |
| UFRGS Vs 21 | 70,5 ± 28,9d | 45,8 ± 14,6 b | 6,45 ± 2,9 a | 66,0 ± 19,3 a | -13,4 |
| UFRGS Vs 1 | 67,6 ± 10,7d | 47,4 ± 6,8 b | 3,03 ± 1,8 b | 49,7 ± 15,3 b | -15,4 |
| UFRGS Vs 8 | 66,9 ± 12,9d | 55,7 ± 7,6 b | 3,58 ± 1,9 b | 47,2 ± 19,1 b | -15,8 |
| UFRGS Vs 7 | 58,4 ± 23,4d | 40,7 ± 5,5 b | 2,78 ± 0,9 b | 65,2 ± 39,2 a | -21,8 |
| Controle - N | 89,8 ± 22,11d | 92,05 ± 50,33 a | | | 0 |
| CV (%) | 33,81 | 35,45 | 22,83 | 19,72 | - |

Controle +N equivalente a 100 Kg.ha⁻¹ de N e Controle -N sem adição 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

De acordo com os valores médios em relação à massa seca da parte aérea (MSPA), o tratamento inoculado com UFRGS Vs30 obteve produção superior aos demais tratamentos inoculados e ao tratamento controle sem adição de nitrogênio (T-N). Dentre os 30 tratamentos inoculados 19 obtiveram valores superiores ao T-N.

Contudo, nenhum dos tratamentos obteve valores superiores ou equivalentes ao produzido pelo controle com adição de nitrogênio equivalente a 100 Kg.ha⁻¹ (T+N). Esta planta tem a capacidade de acumular nitrogênio na massa seca da parte aérea e liberar durante os primeiros 30 dias após seu manejo cerca de 60% deste nitrogênio (AITA & GIACOMINI, 2003). BORTOLINI et al., (2000) demonstraram que com aplicação de 60 kg ha⁻¹ de nitrogênio em plantas de milho, houve aumento na produtividade de grãos à medida que se elevou a proporção de ervilhaca no consórcio. Em outro trabalho, SILVA et al., (2007) obtiveram o maior rendimento de grãos de milho quando consorciado com ervilhaca comum (*Vicia sativa*), do que quando em consórcio com outras espécies de leguminosas. Esta leguminosa, ervilhaca, tem sido utilizada, em consórcio, com plantas não leguminosas, pois disponibilizam nitrogênio residual para outras plantas que não realizam a FBN. Esta espécie de leguminosa pode chegar a acumular 220 kg ha⁻¹ de nitrogênio durante o seu ciclo (MONEGAT, 1991). A utilização de leguminosas é estudada como alternativa para aumentar a disponibilidade de nitrogênio no solo também no consórcio de culturas. Permitindo reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados industriais nos cultivos em sucessão, o custo de produção da lavoura e o risco de contaminação ambiental devido à lixiviação de nitrato.

Todos os rizóbios demonstraram capacidade de induzir nodulação, pois todas as plantas dos tratamentos inoculados apresentaram nódulos radiculares. O número de nódulos variou de 32,25 a 92 por planta de ervilhaca. Em relação ao índice de eficiência relativa, que relaciona o acúmulo de massa seca da parte aérea dos tratamentos inoculados em relação aos tratamentos controles, nenhum dos isolados apresentou valores superiores a 100%, que se refere ao tratamento controle com adição de 100% de nitrogênio. Cerca de 60% dos isolados obtiveram valores superiores ao Controle -N, sem adição de nitrogênio. Os isolados UFRGS Vs25, UFRGS Vs26 UFRGS Vs30 e o UFRGS Vs34 apresentaram os maiores valores de IER, destacando-se o UFRGS Vs30 com IER de 50%. Os demais isolados tiveram desempenho inferior ao Controle -N. Indicando que estes isolados tem uma menor capacidade de fixar nitrogênio. Os valores de IER dos rizóbios UFRGS Vs1, UFRGS Vs2, UFRGS Vs7, UFRGS Vs8, UFRGS Vs9, UFRGS Vs10, UFRGS Vs11, UFRGS Vs16, UFRGS Vs21 e UFRGS Vs24 foram negativos. Demonstra que estes rizóbios induziram a nodulação, mas não fixaram o nitrogênio atmosférico para as plantas, desta forma sendo simbioticamente ineficientes, comportando-se de forma

parasitária (BARAIBAR et al.,1999).

Foram analisadas as características de solubilização de fosfato, produção de AIA com e sem triptofano e a eficiência simbiótica dos isolados, e selecionados cinco isolados para serem testados na promoção de crescimento. Quanto à eficiência simbiótica (Tabela 4), o tratamento inoculado com o isolado UFRGS Vs30 se destacou por apresentar os melhores valores para as variáveis avaliadas: a massa seca da parte aérea (MSPA), a massa seca da raiz (MSR), a massa seca dos nódulos (MSN) e o número de nódulos (NN), além de solubilizar fosfato (Tabela 2) e produzir ácido indolacético tanto com quanto sem triptofano (Tabela 3). O isolado UFRGS Vs26 também apresentou bom desempenho, de acordo, com seus valores de eficiência simbiótica (Tabela 4).

Os isolados UFRGS Vs16 e UFRGS Vs12 foram bons produtores de ácido indolacético sem utilização de triptofano ao meio de cultura (Tabela 3) e solubilizaram fosfato.

O isolado UFRGS Vs6 foi selecionado por não solubilizar fosfato (Tabela 2). Utilizou-se este isolado para avaliar o efeito da sua interação com as plantas e se as características que apresenta poderiam influenciar na promoção de crescimento de plantas.

5.5 Efeito dos rizóbios isolados sobre a germinação de sementes de arroz (cultivares IRGA 430, IRGA 424, IRGA 424RI) e de aveia (cultivar URS Corona)

Para avaliação da germinação, utilizou-se foi o índice de velocidade de germinação (IVG%) das sementes de arroz e de aveia inoculadas com rizóbios de ervilhaca (Tabela 5).

O efeito da inoculação dos rizóbios na velocidade de germinação das sementes (IVG) não foi significativo nas sementes de arroz. Observou-se que, a germinação das sementes das cultivares IRGA 430 e IRGA 424 iniciou no segundo dia, enquanto que a germinação da IRGA 424RI iniciou no terceiro dia e que as sementes das três cultivares não germinaram mais a partir do oitavo dia.

Tabela 5 - Médias seguidas do desvio padrão do índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de arroz (cultivares: IRGA 430, IRGA 424 e IRGA 424 RI) e aveia (cultivar URS Corona).

| Tratamentos | IVG | | | |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | IRGA 430 | IRGA 424 | IRGA 424RI | AVEIA |
| UFRGS Vs6 | 10,7 ± 1,5 ^{ns} | 12,9 ± 0,6 ^{ns} | 9,0 ± 0,7 ^{ns} | 5,50 ± 1,8 ^{ns} |
| UFRGS Vs12 | 11,6 ± 1,9 | 14,0 ± 0,8 | 8,9 ± 0,6 | 4,60 ± 1,5 |
| UFRGS Vs16 | 11,0 ± 1,4 | 14,8 ± 2,3 | 9,1 ± 0,8 | 5,20 ± 0,9 |
| UFRGS Vs26 | 11,7 ± 1,7 | 14,0 ± 2,5 | 9,5 ± 0,9 | 5,40 ± 1,7 |
| UFRGS Vs30 | 11,3 ± 1,0 | 13,6 ± 1,0 | 8,9 ± 1,2 | 4,80 ± 1,7 |
| T LM | 11,1 ± 1,1 | 13,8 ± 0,5 | 8,6 ± 0,5 | 2,90 ± 1,6 |
| CV (%) | 13,12 | 11,06 | 9,63 | 32,6 |

CV= coeficiente de variação, ns= não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-knott

O índice de velocidade de germinação (IVG) não foi significativo para sementes de aveia, as quais começaram a germinar a partir do terceiro dia e não germinaram mais a partir do sétimo dia de avaliação.

O efeito da inoculação dos isolados ao final dos oito dias de avaliação em sementes de arroz, de acordo com o percentual total de germinação, não foi significativo (Tabela 6).

Tabela 6 - Médias seguidas do desvio padrão do percentual total de germinação em sementes de arroz, cultivares: IRGA 430, IRGA 424 e IRGA 424 RI e aveia

| Tratamentos | Percentual total (%) | | | |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | IRGA 430 | IRGA 424 | IRGA 424RI | AVEIA |
| UFRGS Vs6 | 91,5 ± 5,2 ^{ns} | 83,5 ± 1,9 ^{ns} | 74,0 ± 8,5 ^{ns} | 61,70 ± 19,3 ^{ns} |
| UFRGS Vs12 | 84,5 ± 3,0 | 85,5 ± 5,9 | 75,5 ± 3,4 | 50,80 ± 15,2 |
| UFRGS Vs16 | 83,5 ± 7,2 | 94,0 ± 16,1 | 77,0 ± 9,3 | 59,20 ± 9,6 |
| UFRGS Vs26 | 89,0 ± 5,0 | 85,5 ± 13,4 | 80,5 ± 9,0 | 60,80 ± 15,9 |
| UFRGS Vs30 | 89,5 ± 9,7 | 85,0 ± 9,4 | 70,5 ± 7,7 | 58,30 ± 21,8 |
| T LM | 89,0 ± 1,1 | 84,0 ± 5,4 | 77,0 ± 5,3 | 37,50 ± 22,3 |
| CV (%) | 6,81 | 11,56 | 9,92 | 32,77 |

CV= coeficiente de variação, ns= não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-knott

Em sementes de aveia não se obteve diferença significativa quanto ao o percentual total de sementes germinadas avaliadas ao final dos sete dias do período de avaliação.

Outro parâmetro avaliado foi o percentual de germinação acumulada (Figura 1 e 2), onde os isolados que apresentaram diferença em relação ao controle LM foram

submetidos ao teste t, com o auxílio do programa Past (HAMMER et al., 2015).

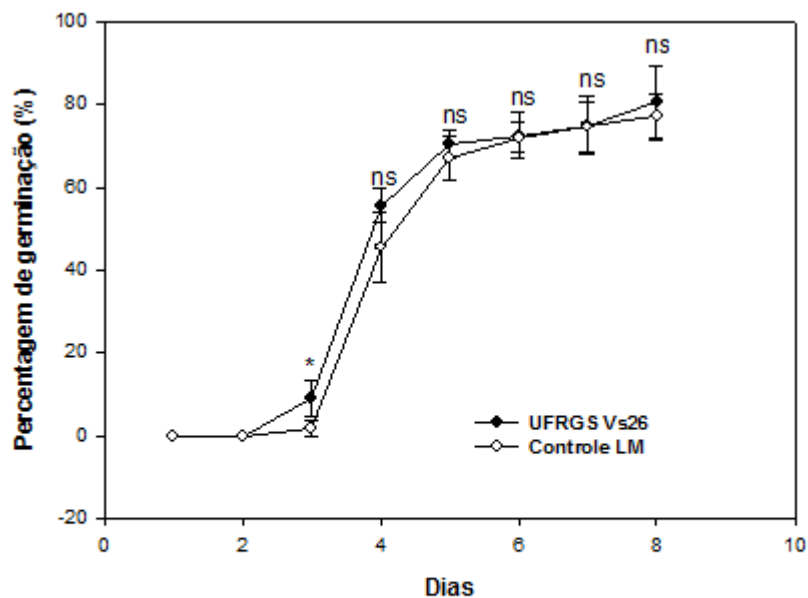


Figura 1 – Percentual acumulado de germinação de sementes de arroz IRGA 424RI inoculadas com o rizóbio UFRGS Vs26 de *Vicia sativa*, em comparação com o tratamento controle com LM (caldo levedura-manitol). Teste t, onde *= significativo a 5%, ns= não significativo. As barras de erro representam o desvio padrão.

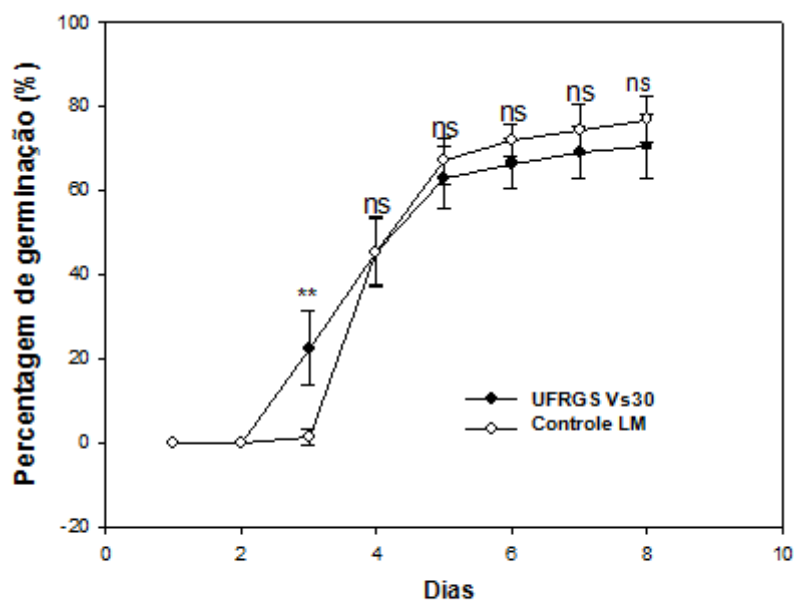


Figura 2 – Percentual acumulado de germinação de sementes de arroz IRGA 424RI inoculadas com o rizóbio UFRGS Vs30 de *Vicia sativa*, em comparação com o tratamento controle com LM (caldo levedura-manitol). Teste t, onde *= significativo a 5%, ns= não significativo. As barras de erro representam o desvio padrão.

Desta forma, o efeito de cada rizóbio na germinação das sementes de arroz foi comparado isoladamente com o tratamento controle LM. Observou-se que os isolados UFRGS Vs26 e UFRGS Vs30 apresentaram efeito superior em relação Controle LM quando inoculados em sementes de arroz cultivar IRGA 424RI, no terceiro dia de avaliação. Diferentes isolados podem vir a estimular a germinação das sementes de uma mesma cultivar. Resultado semelhante foi observado por OSÓRIO FILHO et al., (2014), utilizando diferentes rizóbios inoculados em arroz. BISWAS et al., (2000) relatam que em fases iniciais das culturas, a inoculação de rizóbios produtores de AIA pode aumentar o vigor de plântulas. No processo de germinação de sementes o AIA atua em conjunto com ácido giberélico e citocinina. Durante a germinação de sementes o AIA exógeno pode estimular a biossíntese de giberelina, que irá induzir a síntese de α -amilase que é uma enzima hidrolítica conhecida por desempenhar importante papel na degradação de carboidratos de reservas durante a germinação de sementes (BERI & GUPTA, 2007). No cultivo de arroz, a emergência precoce de plântulas pode resultar em maior vigor, permitindo que as mudas superem a concorrência de plantas daninhas (GIBSON et al., 2002). O efeito da inoculação de rizóbios na germinação inicial de plântulas de arroz foi verificado por VARGAS et al., (2009) utilizando estirpes de rizóbios nodulantes em trevo. O efeito de rizóbios isolados de alfafa na germinação de arroz comparado com o tratamento controle, foi avaliado por STROSCHEIN et al., (2011), e todos os isolados incrementaram a porcentagem de germinação a partir do segundo dia.

O efeito da inoculação dos isolados nas sementes de aveia também foi comparado isoladamente com o controle LM (Figura 3 e 4).

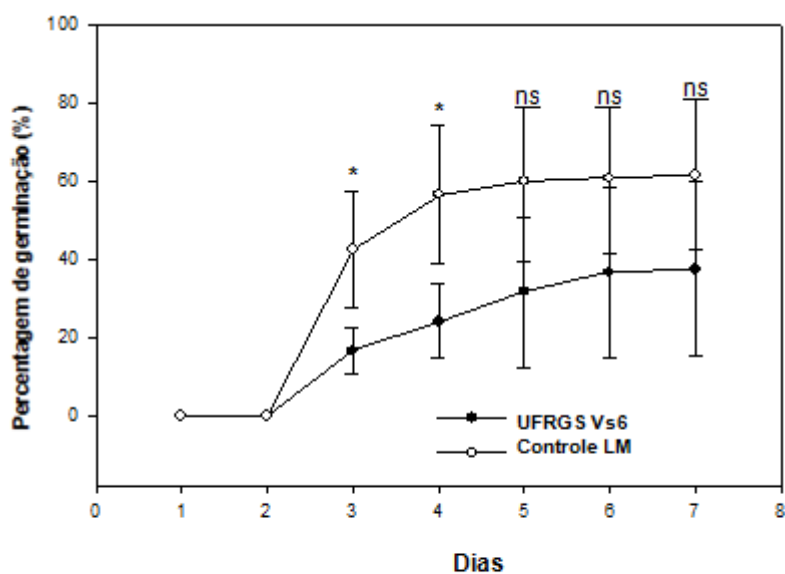


Figura 3 – Percentual acumulado de germinação de sementes de aveia inoculadas com o rizóbio UFRGS Vs6 de *Vicia sativa*, em comparação com o tratamento controle com LM (caldo levedura-manitol). Teste t, onde *= significativo a 5%, ns= não significativo. As barras de erro representam o desvio padrão.

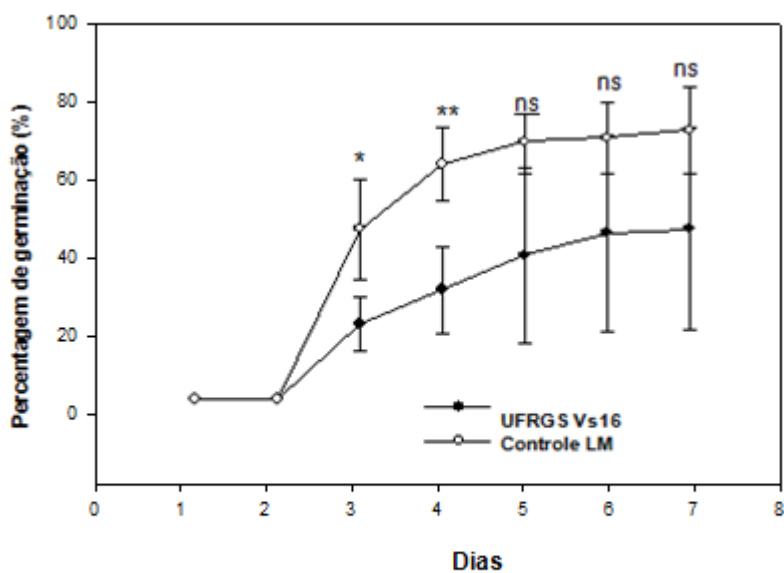


Figura 4 – Percentual acumulado de germinação de sementes de aveia inoculadas com o rizóbio UFRGS Vs16 de *Vicia sativa*, em comparação com o tratamento controle com LM (caldo levedura-manitol). Teste t, onde *= significativo a 5%, **= significativo a 1%, ns= não significativo. As barras de erro representam o desvio padrão.

As sementes inoculadas com os rizóbios UFRGS Vs6 e o UFRGS Vs16 apresentaram maior diferença em relação às sementes inoculadas com o controle LM no terceiro e quarto dia de avaliação, como mostra a Figura 3 e 4. Desta forma, percebe-se que estes rizóbios contribuem na germinação das sementes de aveia.

5.6 Avaliação da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento de plantas de arroz (cultivares IRGA 430, IRGA 424 e IRGA 424RI) em casa de vegetação

Os dados de produção de cultivares de arroz inoculado com rizóbios, em casa de vegetação, são mostrados na Tabela 7.

De acordo, com os dados obtidos com a inoculação dos rizóbios UFRGS Vs6, UFRGS Vs12, UFRGS Vs16 e UFRGS Vs30, mais metade da dose de N requerido pela cultivar de arroz IRGA 430, houve incremento na massa seca da parte aérea e da raiz, superior ao controle N/2 no qual foi aplicado o equivalente a metade de N exigido pela cultura. Assim como os outros isolados testados, o UFRGS Vs26 estimulou a produção de massa seca, mas de forma equivalente ao controle. Os rizóbios não se destacaram em estimular o perfilhamento, nesta cultivar, pois mesmo com inoculação não houve diferença estatística em relação ao controle. No entanto, UFRGS Vs6, UFRGS Vs12, UFRGS Vs26 foram capazes de aumentar o volume de raiz.

A produção de massa seca da parte aérea e da raiz da cultivar IRGA 424 foi incrementada com a inoculação dos rizóbios UFRGS Vs12, UFRGS Vs16 e UFRGS Vs30, os mesmos isolados incrementaram a produção de massa seca de raiz mais do que os tratamentos inoculados com as bactérias UFRGS Vs6, UFRGS Vs26 e o tratamento controle. Todos os isolados estimularam o perfilhamento, contudo, UFRGS Vs16 e UFRGS Vs26 se destacaram. As plantas inoculadas com UFRGS Vs12 e UFRGS Vs26 obtiveram um maior volume de raiz, quando comparados aos outros isolados e ao controle. OSÓRIO FILHO et al., (2016), utilizando o rizóbio UFRGS-Lc336 associado a uma dose de 60 kg há⁻¹ de nitrogênio obteve produção de matéria seca da parte aérea, na cultivar IRGA424, equivalente ao produzido com a dose de 160 kg ha⁻¹ de N, sem inoculação de rizóbio. Indicando que através da inoculação de rizóbios é possível reduzir a quantidade de nitrogênio aplicado na cultura.

Tabela 7 - Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), número de perfilhos, volume de raiz (Vol. Raiz), índice de eficiência relativa (IER), de plantas de arroz cultivar 430 em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de *Vicia sativa*

| Tratamentos | MSPA (g) | MSR (g) | Número de Perfilhos | Vol. Raiz (cm ³) | N total (mg) |
|---------------------------|---------------|---------------|------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Cultivar IRGA 430 | | | | | |
| Controle N/2 | 0,9 ± 0,1 b** | 0,3 ± 0,8 b** | 5 ± 1,5 ^{ns} | 6,1 ± 1,6 b** | 17,4 ± 3,9 b** |
| UFRGS Vs6 | 1,6 ± 0,1 a | 0,6 ± 0,2 a | 5 ± 1,1 | 9,0 ± 4,0 a | 23,2 ± 3,7 a |
| UFRGS Vs16 | 1,5 ± 0,2 a | 0,7 ± 0,1 a | 5 ± 1,3 | 4,7 ± 2,1 b | 24,1 ± 5,3 a |
| UFRGS Vs12 | 1,4 ± 0,2 a | 0,6 ± 0,1 a | 5 ± 1,1 | 9,7 ± 2,0 a | 21,8 ± 1,5 a |
| UFRGS Vs30 | 1,4 ± 0,3 a | 0,6 ± 0,1 a | 5 ± 0,9 | 4,9 ± 1,6 b | 20,9 ± 2,1 a |
| UFRGS Vs26 | 0,7 ± 0,6 b | 0,3 ± 0,6 b | 4 ± 0,4 | 8,4 ± 0,8 a | 15,2 ± 1,5 b |
| CV (%) | 16,58 | 29,04 | 24,09 | 31,39 | 16,31 |
| Cultivar IRGA 424 | | | | | |
| Controle N/2 | 1,4 ± 0,3 a** | 0,6 ± 0,1 b* | 6 ± 1,3 b** | 4,4 ± 1,9 c** | 28,0 ± 5,2 a** |
| UFRGS Vs16 | 1,9 ± 0,5 a | 0,9 ± 0,2 a | 9 ± 3,6 a | 5,2 ± 1,3 c | 25,9 ± 5,7 a |
| UFRGS Vs12 | 1,6 ± 0,3 a | 0,7 ± 0,1 a | 6 ± 1,1 b | 9,3 ± 1,1 a | 23,1 ± 8,0 a |
| UFRGS Vs30 | 1,4 ± 0,1 a | 0,7 ± 0,4 a | 7 ± 0,9 b | 4,3 ± 1,1 c | 22,3 ± 1,1 a |
| UFRGS Vs6 | 1,2 ± 0,1 b | 0,5 ± 0,9 b | 6 ± 0,4 b | 6,4 ± 1,6 c | 20,0 ± 2,0 a |
| UFRGS Vs26 | 0,7 ± 0,2 c | 0,5 ± 0,3 b | 8 ± 1,9 a | 7,5 ± 1,3 b | 12,9 ± 3,8 b |
| CV (%) | 21,62 | 25,97 | 25,77 | 20,29 | 22,05 |
| Cultivar IRGA 424I | | | | | |
| Controle N/2 | 1,2 ± 0,2 b** | 0,8 ± 0,2 b** | 6 ± 0,5 b* | 4,1 ± 1,7 b* | 27,5 ± 2,5 a** |
| UFRGS Vs16 | 1,5 ± 0,9 a | 0,8 ± 0,2 b | 7 ± 1,1 a | 8,7 ± 2,8 a | 25,8 ± 3,1 a |
| UFRGS Vs12 | 1,5 ± 0,1 a | 1,1 ± 0,2 b | 7 ± 1,6 a | 7,1 ± 0,9 a | 25,9 ± 1,7 a |
| UFRGS Vs30 | 1,4 ± 0,8 a | 0,7 ± 0,2 b | 6 ± 0,5 b | 8,2 ± 1,3 a | 25,1 ± 2,8 a |
| UFRGS Vs6 | 1,2 ± 0,3 b | 1,5 ± 0,3 a | 5 ± 1,1 b | 6,2 ± 0,8 b | 23,9 ± 2,6 a |
| UFRGS Vs26 | 1,1 ± 0,1 b | 0,9 ± 0,3 b | 5 ± 0,9 b | 7,4 ± 3,4 a | 19,4 ± 3,7 b |
| CV (%) | 10,58 | 24,87 | 18,26 | 30,4 | 10,58 |

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

O estímulo na produção de matéria seca da parte aérea, na cultivar IRGA424RI, é aumentado quando inoculado com UFRGS Vs12, UFRGS Vs16 e UFRGS Vs30. Já a massa seca de raiz teve maior produção com a inoculação de UFRGS Vs12, que foi superior aos demais tratamentos. A emissão de perfilhos por plantas inoculadas com os isolados UFRGS Vs12 e UFRGS Vs16 foram superiores

ao controle e aos outros isolados. Quanto ao volume de raiz apenas o UFRGS Vs6 foi equivalente ao controle, os demais inoculados obtiveram desenvolvimento superior. Observa-se que a parte aérea e o sistema radicular das plantas de todas as cultivares foram estimulados pela inoculação com rizóbios. No entanto, houve diferenças no efeito da inoculação dos rizóbios em estudo, indicando a ocorrência de diferentes interações entre as plantas e os microrganismos. Essas diferenças de interações também foram observadas em outros trabalhos, como de YANNI et al., (2001) e de OSÓRIO FILHO et al., (2016), que observaram que os isolados que estimulam mais a produção de massa seca da parte aérea, não necessariamente, incrementam o crescimento radicular da mesma cultivar.

A inoculação com os isolados UFRGS Vs12, UFRGS Vs16 e UFRGS Vs30 contribui de forma significativa para ambas cultivares estudadas quanto à produção de massa seca da parte aérea e massa seca de raiz das cultivares IRGA 430 e IRGA 424. Um dos mecanismos responsáveis pela promoção de crescimento em arroz, possivelmente, seja a produção de fitormônios, como o ácido indolacético. Pois este fitormônio estimula o crescimento radicular, melhorando a nutrição da planta e o seu crescimento (BISWAS et al., 2000; SOLANO et al., 2010).

Em relação ao acúmulo de nitrogênio na parte aérea da cultivar IRGA 430, as plantas inoculadas com os rizóbios UFRGS Vs6, UFRGS Vs12, UFRGS Vs16 e UFRGS Vs30 apresentaram desempenho superior ao tratamento controle N/2, que recebeu a mesma dose de nitrogênio dos inoculados. Nas cultivares IRGA 424 e IRGA 424RI 80% dos isolados foram capazes de acumular a mesma quantidade de nitrogênio que o controle N/2, ambos receberam a metade da dose de nitrogênio exigido pela cultura. OSÓRIO FILHO et al., (2016), demonstrou ocorrer incremento de massa na parte aérea de arroz com a inoculação de rizóbios. As plantas não inoculadas que receberam apenas a dose de 80 kg ha⁻¹, obtiveram 20mg de nitrogênio por planta. Porém, as plantas inoculadas com rizóbios obtiveram valores que variaram de 22 para 31 mg de nitrogênio por planta. Desta forma, apesar dos rizóbios não fixarem o nitrogênio atmosférico no cultivo de arroz são capazes de disponibilizar este nutriente no solo, propiciando economia ao produtor, referente ao uso de fertilizantes.

5.7 Avaliação da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento de plantas de aveia branca (cultivar URS Corona) em casa de vegetação

A promoção de crescimento pela inoculação de rizóbios foi avaliada em plantas de aveia branca em casa de vegetação (Tabela 8).

Tabela 8 - Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), volume de raiz (Vol. Raiz), número de folhas (N Folhas), índice de eficiência relativa (IER), de plantas de aveia em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de *Vicia sativa*

| Tratamentos | MSPA | MSR (mg) | Vol. Raiz (cm) | N Folhas | IER (%) |
|---------------|-----------------|----------------|-------------------|------------|------------|
| Controle + N* | 132,6 ± 57,5 ns | 50,6 ± 19,1 a* | 1,0 ± 0,0 b* | 5 ± 0,0 ns | 100 |
| UFRGS Vs30 | 222,8 ± 87,1 | 63,8 ± 18,6 a | 2,2 ± 0,4 a | 5 ± 0,8 | 735,21 |
| UFRGS Vs26 | 191,8 ± 74,8 | 77,6 ± 31,4 a | 2,0 ± 0,7 a | 5 ± 0,8 | 516,90 |
| UFRGS Vs6 | 187,6 ± 76,2 | 64,8 ± 17,4 a | 2,0 ± 0,7 a | 5 ± 0,7 | 487,32 |
| UFRGS Vs16 | 153,6 ± 57,7 | 60,6 ± 9,9 a | 1,6 ± 0,5 b | 4 ± 0,8 | 247,89 |
| UFRGS Vs12 | 112,8 ± 58,3 | 24,9 ± 8,9 b | 1,4 ± 0,5 b | 5 ± 1,0 | -39,44 |
| Controle N/2* | 118,4 ± 32,1 | 39,2 ± 12,5 b | 1,4 ± 0,5 b | 5 ± 0,0 | 0,00 |
| CV (%) | 40,98 | 33,54 | 33,05 | 15,17 | - |

*= Controle + N equivalente a 150 Kg.ha⁻¹ de N e controle N/2 equivalente a 75 Kg.ha⁻¹ de N, *= médias (5 repetições) seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias Scott-Knott (5%), ns= não significativo e CV= coeficiente de variação

De acordo, com os valores médios de massa seca da parte aérea (MSPA) as plantas inoculadas com os rizóbios UFRGS Vs6, UFRGS Vs16, UFRGS Vs12, UFRGS Vs26 e o UFRGS Vs30 não diferiram em relação ao Controle +N sem inoculação e com 100% da dose recomendada de nitrogênio e ao Controle – N com a metade da dose recomendada de nitrogênio.

Na massa seca de raiz, quatro dos isolados (UFRGS Vs6, UFRGS Vs16, UFRGS Vs26 e o UFRGS Vs30) apresentaram incremento de massa seca semelhante ao tratamento com a dose total de nitrogênio, sendo superiores ao controle N/2 com metade da dose de nitrogênio.

Em relação ao volume de raiz os isolados UFRGS Vs6, UFRGS Vs26 e o UFRGS Vs30 foram superiores aos tratamentos controles.

Quando analisado o número de folhas tanto os controles quanto os tratamentos não apresentaram diferença significativa.

A capacidade dos isolados em promover o acúmulo de massa seca na parte aérea, em comparação com os tratamentos controle foi calculado utilizando o índice de eficiência relativa (IER) adaptado de Brockwel et al., (1966) os rizóbios UFRGS Vs6, UFRGS Vs16 UFRGS Vs26 e UFRGS Vs30 apresentaram grande capacidade em promover o acúmulo de massa seca na parte aérea, quando comparados aos tratamentos controles. Em plantas de aveia inoculadas com bactérias promotoras de crescimento em casa de vegetação, STAJKOVIC-SRBINOVIC et al., (2014)

observaram que a massa seca da parte aérea das plantas inoculadas foi igual ao tratamento controle positivo, e superior aos tratamentos inoculados com outras bactérias. A inoculação de rizóbios em não-leguminosas vem sendo estudada como um estímulo na promoção de crescimento.

5.8 Caracterização genética dos rizóbios estudados

O DNA (gene 16S) dos rizóbios testados na promoção de crescimento UFRGS Vs6, UFRGS Vs12, UFRGS Vs16 e o UFRGS Vs30 foram amplificados e os resultados do sequenciamento genético da região de DNA do gene que codifica a porção 16S rDNA ribossomal são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Identificação dos rizóbio testados na promoção de crescimento pela sequência do gene 16S rDNA obtida com o programa BLAST

| Rizóbios | Verossimilhança ⁽¹⁾ | Identidade ⁽²⁾ (%) | Fragmento ⁽³⁾ | GenBank ⁽⁴⁾ |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------|
| UFRGS Vs6 | <i>Rhizobium vallis</i> | 99% | 960 pb | NR_116835.1 |
| UFRGS Vs12 | <i>Rhizobium vallis</i> | 99% | 954 pb | NR_116835.1 |
| UFRGS Vs16 | <i>Rhizobium vallis</i> | 99% | 945 pb | NR_116835.1 |
| UFRGS Vs30 | <i>R leguminosarum. bv.phaseoli</i> | 99% | 945 pb | NR_113671.1 |

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

As sequências de nucleotídeos dos rizóbios UFRGS Vs6, UFRGS Vs12 e UFRGS Vs16 quando comparadas com as sequências de genes existentes no banco de dados NCBI-BLAST, foram identificados como pertencentes à espécie *Rhizobium vallis* estirpe CCBAU 65647 com 99% de identidade. A sequência utilizada pode ser consultada pelo número de acesso INR_116835.1. Esta espécie *Rhizobium vallis* foi descrita recentemente e é proposta como uma nova espécie pertencente ao gênero *Rhizobium*. (WANG et.al., 2011). A estirpe foi isolada do Vale do Rio Vermelho, na província de Yunnan, China, sua planta hospedeira é o *Phaseolus vulgaris* na qual forma nódulos radiculares eficazes. As colônias bacterianas desta espécie apresentam formato circular, elevação convexa, cor perolada branca, e geralmente apresentam tamanho de 2 a 3 mm de diâmetro após três dias de incubação a 28 ° C, podendo crescer na faixa de pH de 6,0 a 9,0. São caracterizadas como Gram-negativas, não formam de esporos, aeróbicas e móveis

(WANG et.al., 2011). Tais características de morfologia colonial descritas para a espécie *Rhizobium vallis* são semelhantes às características observadas nas colônias dos rizóbios estudados no presente trabalho.

A análise das sequências de nucleotídeos do gene de 16S rRNA do rizóbio UFRGS Vs30 quando comparadas com as sequências de genes previamente existentes na base de dados NCBI – BLAST, indicam que o mesmo pertence à espécie *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*, com 99% de identidade com a sequência depositada no GenBank com o número de acesso INR_113671.1. Esta espécie é classificada como filo: *Proteobacteria*, classe: *Alphaproteobacteria*, ordem: *Rhizobiales*, família: *Rhizobiaceae* gênero: *Rhizobium*, espécie: *Rhizobium leguminosarum*. A espécie *Rhizobium leguminosarum* é subdividida ainda em três biovars: *phaseoli*, *trifolii* e *viciae* (GARRITY 2005). Considerando-se que *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* é simbioticamente eficiente em ervilhaca, poderia se esperar que os rizóbios caracterizados pertencessem a esta biovar *viciae*. Entretanto, isso não ocorreu, pois os isolados considerados compatíveis e/ou eficientes para a ervilhaca não foram classificados como pertencentes a essa espécie. Anteriormente não havia sido descrito espécies de *Rhizobium phaseoli* e *Rhizobium vallis* com capacidade de nodular ou até mesmo de fixar nitrogênio em ervilhaca. Diante deste fato há a necessidade de mais estudos para avaliar estas interações entre a leguminosa ervilhaca e as diferentes espécies de rizóbios.

A classificação taxonômica do rizóbio foi inicialmente baseada em sua especificidade hospedeira, no entanto, foi demonstrado que estirpes de rizóbio de diversos grupos de homologia são capazes de nodular outras leguminosas e que uma mesma leguminosa atraí geneticamente diferentes simbioses (CROW et al., 1981), devido a transferência de plasmídeos e a possíveis combinações de material genético (YOUNG et al., 2001; BROUGHTON 2003; WILLEMS 2006). Para melhor entendimento da relação entre planta e bactéria, a identificação pelo método de sequenciamento de rizóbios é de grande importância (CHUEIRE et al.,2003; STROSCHEIN et al.,2011; TOLEDO et al., 2009).

6 CONCLUSÕES

Os rizóbios testados são capazes de solubiliza fosfato tricálcico em meio de cultura.

Todos os rizóbios estudados no presente trabalho são capazes de produzir ácido indol-acético em meio de cultura sem e com adição de triptofano.

Todos os rizóbios estudados são capazes de nodular ervilhaca.

O rizóbio UFRGS Vs30 é eficiente na simbiose com plantas de ervilhaca.

Os rizóbios UFRGS Vs26 e UFRGS Vs30 estimulam a germinação das sementes de arroz da cultivar IRGA 424RI e os rizóbios UFRGS Vs6 e UFRGS Vs16 estimulam a germinação das sementes da cultivar de aveia URS Corona.

Existe diferença na capacidade dos rizóbios em promover o crescimento das cultivares de arroz estudadas.

Os rizóbios promovem acúmulo de nitrogênio em plantas de arroz.

Em plantas da cultivar de aveia URS Corona, os rizóbios UFRGS Vs6, UFRGS Vs16, UFRGS Vs26 e UFRGS Vs30 aumentam a massa seca da parte aérea e da raiz.

Os isolados identificados pelo sequenciamento do fragmento do 16S pertencem ao gênero *Rhizobium*.

O *Rhizobium vallis* foi identificado pela primeira vez em solos do Rio Grande do Sul.

Rizóbios são capazes de nodular diferentes leguminosas e uma mesma leguminosa pode atrair geneticamente diferentes simbiontes.

7 REFERÊNCIAS

AHMAD, F.; AHMAD,I.; KHAN,M.S. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of Azotobacter and fluorescent Pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. **Turkish Journal of Biology, Ankara**, v.29, n.1, p.29-34, 2005.

AITA, C.; GIACOMINI, S. J. Decomposição e liberação de nitrogênio de resíduos culturais de plantas de cobertura de solo solteiras e consorciadas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, n.3, p.601-612, 2003.

ALONI, R.; ALONI, E.; LANGHANS, M.; ULRICH, C. I. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Ann Bot**,97:883–893,2006.

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

ARSHAD.M; FRANKENBERGER.W.T.JR. Etileno:origem agrícola e aplicações. **Kluwer**, p. 342, 2002.

BANERJEE, M. R. Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. In. RAI, M.K. (Ed).Handbook of microbial biofertilizers. **New York: Food Products**, p.137-181, 2006.

BARAIBAR, A; FRIONI, L; GUEDES, M. E; LJUNGGREN,H. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 34,n.6, p. 1011- 1017, 1999.

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.

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, Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobia inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, v.92, n.5. p 880-886, 2000.

BORTOLINI, C.G.; SILVA, P.R. F.; ARGENTA, G.2000. **Sistemas consorciados de aveia preta e ervilhaca comum como cobertura de solo e seus efeitos na cultura do milho em sucessão**. Tese (mestrado em fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

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.

BROUGHTON, W. J. Roses by Other Names: Taxonomy of the Rhizobiaceae. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.2975-2979, 2003.

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.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; THEMAAT, E.V.L. Van.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.64, p.807-838, 2013.

CARANGAL, V. R.; TENGCO, P. L. Livestock feed resources in rice-based farming systems In: ROP LIVESTOCK SYSTEMS RESEARCH WORKSHOP. **Khonkaen. Proceedin.**, p. 136-138, 1986.

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.

CHAGAS JR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, N. A. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum. Agronomy, Maringá**, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010.

CHAGAS JR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. (2010), Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

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, n. 11, p. 7271-7278, 2005.

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.

CHUIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas de soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.833-840, 2003.

COUNCE, P.; KEISLING, T.C.; MITCHELL, A.J. A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science, Madison**, v.40, n.2, p. 436-443, 2000.

CRESTANI, M.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; SIC.; SARTORI, J.F.; BARBIERI, R.L.; BARETTA, D.LVA, J.A.G.; GUTKOSKI, L. Conteúdo β -glucana em cultivares de aveia-branca cultivadas em diferentes ambientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, V.45.n.3 p.261-268, 2010.

CROW, V.L.; JARVIS, B.D.W.; GREENWOOD, R.M. Deoxyribonucleic acid homologies among acid-producing strains of *Rhizobium*. **International Journal of Systematic Bacteriology, Washington**, v.31, p.152-172, 1981.

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.

DE FREITAS JR.; BANERJEE M, R.; GERMIDA, J. J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus*). **Biol Fertil Soils** 36:842–855, 1997.

DEUBEL, A.; MERBACH, W. Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. In: BUSCOT, F.; VARMA, A. Microorganisms in soils: roles in genesis and functions, **Berlin Heidelberg: Springer-Verlag**, p. 177- 191, 2005.

DOBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação de nitrogênio no Brasil. In: **CONFERÊNCIA, Universidade Rural do Rio de Janeiro, Artigos Assinados Estudos Avançados**, v. 4, n.8, p. 144-152, 1990.

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.

EDWARDS, U. et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes characterization of a gene coding for 16S-ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.17, n.19, p.7843-7853, 1989.

EIJK, D. van der. **Phosphate fixation and the response of maize to fertilizer phosphate in Kenyan soils**. 1997. 186 f. Dissertação (Mestrado) - Wageningen Agricultural University, Wageningen, 1997.

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.

EZAWA, T.; SMITH, S.E.; SMITH, F.A.P Metabolism and Transport in AM Fungi. **Plant and Soil**, v, 244, n. 1-2,p.221-230, 2002.

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

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

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C.E R.S.; STAMFORD, N.P.; LYRA, M.C.C.P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino no Estado de Pernambuco, **Brasil. Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 497–504, 2007.

GARRITY, G.M. (editor) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria), **Springer, New York**, 2005.

GIBSON, K.D.; FISCHER, A.J.; FOIN, T.C.; HILL, Implicações de atraso *Echinochloa* spp. germinação e duração da concorrência para a gestão integrada de plantas daninhas em arroz semeado em água. **Erva daninha. Res.**, 42:

351-358, 2002.

GLICK BR; KARATUROVI DM; NEWELL PC. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *Pseudomonas*. **Can J Microbiol** 41:533–536, 1995.

GRAY,E.J.;SMITH,D.L. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plantbacterium signaling process. **Soil Biology and Biochemistry, Oxford**, v.37, p. 395-412, 2005.

GUPTA, A.; GOPAL, M.; TILAK,,K..V. Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. **Indian J Exp Biol**,v.38, p. 856–862, 2000.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plant. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.

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.

HALLMANN. J.;QUADT-HALLMANN.A.; MAHAFFEE.W .F.; KLOEPPER.J.W.Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43.p. 385-914, 1997.

HAGHIGHI, B.J.; ALIZADEH, O.; FIROOZABADI, A.H. The role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in sustainable agriculture. **Advances in Environmental Biology** v.5, p.3079-3083, 2011.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. **PAST** – Palaeontological Statistics, versão 3.10, 2015.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals Microbiology**, v.60, p.579-598, 2010.

HAYAT, R.; ALI, S.; SIDDIQUE, M.T.; CHATHA, T.H. Biological nitrogen fixation of summer legumes and their residual effects on subsequent rainfed wheat yield. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, p.711-722, 2008.

IBGE, **Instituto brasileiro de geografia e estatística** 2016. (Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/>)

IGUAL, J. M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁZQUEZ, E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculantes for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. **Agronomie**, v. 21, n. 2, p. 561-568, 2001.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growthpromoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n. 3, p.:473-480, 2004.

KLAJN, V.M.; COLUSSI, R.; FIORENTINI, A.M.; ELIAS, M.C.; GUTKOSKI, L.C. Processamento hidrotérmico em escala industrial sobre parâmetros de qualidade em frações de aveia. **Ciência Rural**, v.44, n.5, p.931-936, 2014.

KLOEPPER JW; SCHROTH MN. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes, In: Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria, Angers, **France**, pp 879–882, 1978.

KUMAR, K.V; SINGH, N; BEHL,H.M; SRIVASTAVA,S. Influência de bactérias de crescimento de plantas que promovem e sua mutante sobre a toxicidade de metais pesados em Brassica juncea cultivados em cinzas volantes solo

alterado. **Chemosphere** 72: 678-683, 2008

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology, Cambridge**, v. 8, n.7, p. 298-300, 2000.

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

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

MIRANSARI, M.; SMITH, D. Rizóbios lipo-chitooligosaccharides e giberelinas melhorar cevada (*Hordeum vulgare* L.) germinação das sementes. **Biotechnology**, n.8, p.270-275, 2009.

MONEGAT, C. **Plantas de cobertura de solo: características e manejo em pequenas propriedades**. Chapecó: Ed. do Autor, 1991. 337p.

MORDUKHOVA, E.A.; SKVORTSOVA, V.V.; KOCHETKOV, A.N.; DUBEIKOVSKII, A.N.; BORONIN, A.M. Synthesis of the phytohormone indole-3-acetic acid by rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas*. **Mikrobiologiya** 60, p. 494–500, 1991.

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

NOEL TC.; SHENG C, YOST CK, PHARIS RP, HYNES MF. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. **Can J Microbiol**, v. 42(3), p. 279-83, 1996.

OSORIO FILHO, B. D., 2009. **Rizóbios eficientes em Lotus como promotores de crescimento em arroz irrigado**- Tese de Doutorado- Programa de Pós-Graduação

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

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.

POONGUZHALI,S; MADHAIYAN,H; AS, T. O isolamento e identificação de solubilizar fosfato bactérias de couve chinesa e seus efeitos sobre o crescimento e utilização de fósforo das plantas. **J Microbiol Biotechnol** 18: p.773-777, 2008.

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.

ROSS, J.J.; O'NEILL, D.P.; SMITH, J.J.; KERCKHOFFS, L.H.J; ELLIOTT, R.C. Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. **Plant Journal** 21, p. 547–552. 2000.

SAHGAL, M.; JOHRI, B. N. The changing face of rizhobial 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.

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, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T.

A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus efficiency in agricultural soils. **Springerplus**, v. 2, p. 587, 2013.

SIDDIKEE, M.A.; GLICK, B.R.; CHAUHAN, P.S.; YIM, W.J.; AS, T. Aumento do crescimento e tolerância de mudas de pimenta vermelha (*Capsicum annuum* L.), regulando o estresse de etileno sintetizado com bactérias halotolerante contendo atividade deaminase ACC. **Plant Physiol Biochem** 49: 427-434, 2011.

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

SILVEIRA, A.B., 2008. **Isolamento e caracterização de linhagens de Bacillus e Paenibacillus promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul**– Tese Doutorado - Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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.

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.

SOSBAI, Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Arroz irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil. In **XXX Reunião técnica da cultura do arroz irrigado**. Bento Gonçalves, 2014.

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.

STROSCHEIN, M.R.D.; SÁ, E.L.S.; MACHADO, R.G.; BRUXEL, T.L.C.M.; GIONDO, A.; FONTOURA, R.C. Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Ciência rural**, v. 41, n.10, p. 1738-1743, 2011.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 559p.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, p. 174, 1995. (Boletim técnico, 5.)

TOLEDO, B. F. B.; MARCONDES, J.; LEMOS, E. G. M. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do 16S rRNA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.44, p.384-391, 2009.

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.

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

VARGAS, L.K. et al. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo, Piracicaba**, v.33, n.5, p.1227-1235, 2009.

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.

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

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586,2003.

VESSEY, J.K.; BUSS, T.J. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes. **Controlled-environment studies. Can J Plant Sci** 82, p.282–290, 2002.

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

WANG.F; WANG.E.T;WU.L.J; SUI.X.H; LI.Y; JR; CHEN.W.X. *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** . 61, 2582–2588, 2011.

WANI, P.A.; KHAN, M.S.; ZAIDI, A. Efeito de metal de crescimento tolerantes planta promoção *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) sobre o crescimento, simbiose, produção de sementes e absorção do metal por greengram plantas. **Chemosphere** 70,p. 36-45, 2007c.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil** v.287, p.3–14, 2006.

YANG,J;JOSEPH,W; KLOEPPER,J.W; R,C.M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Tendências planta Sc**,.v. 14,p.1-4, 2009.

YANNI, Y.G, DAZZO, F.B. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. **PlantSoil**, v.336,p.129–142., 2010.

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

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; ABD EL-FATTAH, F.K.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJIN, F.; 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.

YOUNG J. M.; KUYKENDALL, L D.; MARTINEZ-ROMERO E.; KERR, A.; SAWADA, H. A Revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all. *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 51, p.89–103, 2001.

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

8 APÊNDICES

APÊNDICE I: MEIO LEVEDURA MANITOL SÓLIDO (LM) (VINCENT, 1970)

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

Modo de preparo:

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

APÊNDICE II: SOLUÇÃO NUTRITIVA DE SARRUGE (1975).

| | Composição | Para 1L (sol. estoque) | Para 1 litro de meio |
|--|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Macronutrientes | KH ₂ PO ₄ | 1M (136,1g) | 1mL |
| | MgSO ₄ . 7H ₂ O | 1M (246,4g) | 2mL |
| | CaCl ₂ | 1M (111,1g) | 5mL |
| | KCl | 1M (74,6g) | 5mL |
| | NH ₄ NO ₃ | 1M (80g) | 1mL |
| | Fe EDTA | 1M | 10mL |
| | Micronutrientes | H ₃ BO ₃ | 2,86g |
| ZnCl ₂ | | 0,1g | 1mL |
| CuSO ₄ . 5H ₂ O (**) | | 0,04g | 1mL |
| Na ₂ MoO ₄ . 4H ₂ O | | 0,02g | 1mL |
| | | | |

(*) retirou-se o MnCl₂ . 4H₂O, pois o solo do RS possui muito manganês;

- Preparar as soluções estoque de macro e micronutrientes;
- Juntar os itens, exceto NH₄NO₃, que deve ser autoclavado separadamente;
- Autoclavar a 121°C por 15min;
- Colocar em um galão com água esterilizada (de aproximadamente 20L).

SOLUÇÃO ESTOQUE DE FERRO EDTA

| Composição | Para 1L solução estoque |
|---|-------------------------|
| Na EDTA (titriplex III – C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ . 2H ₂ O) | 3,72g |
| FeSO ₄ . 2H ₂ O | 3,78g |
| Água destilada | 1L |

- Dissolver o Na EDTA e o FeSO₄ . 2H₂O em 900 mL de água;
- Aquecer até 80°C até dissolver totalmente;
- Completar o volume com água.