

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM MANEJO DO SOLO

ISABEL CRISTINA MENDONÇA CARDOSO

OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO
GÊNERO *Azospirillum* NA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO
EM SANTA CATARINA

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias (CAV/UDESC) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Manejo do Solo.

Orientador: Dr. Osmar Klauberg Filho

LAGES – SC

2008

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Cardoso, Isabel Cristina Mendonça

Ocorrência e diversidade de bactérias endofíticas do
gênero *Azospirillum* na cultura do arroz irrigado em Santa
Catarina / Isabel Cristina Mendonça Cardoso – Lages,
2008.

75 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências
Agroveterinárias / UDESC.

1. Arroz irrigado. 2. *Azospirillum*. 3. Auxina. 4.
Nitrogênio - Fixação. I. Título.

CDD – 633.18

ISABEL CRISTINA MENDONÇA CARDOSO

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO
GÊNERO *Azospirillum* NA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO
EM SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Manejo do Solo.

Aprovado em: 18/12/2008
Pela banca examinadora:

Homologado em:
Por:

Dr. Osmar Klauberg Filho
Orientador – UDESC/Lages-SC

Dr. Paulo César Cassol
Coordenador Técnico do Programa de
Mestrado e Doutorado em Manejo do Solo

Dr. Fernando Gomes Barcellos
EMBRAPA SOJA

Dr. Ricardo Trezzi Casa
Coordenador Geral do Programa de
Pós-graduação em Ciências Agrárias

Dr. Júlio César Pires dos Santos
UDESC/Lages-SC

Dr. Adil Knackfuss Vaz
Diretor Geral do Centro de Ciências
Agroveterinárias – UDESC/Lages-SC

Dr. David Miquellutti
UDESC/Lages-SC

LAGES – SC, 18/12/2008

Ao amor da minha vida, Gilvane, que esteve ao meu lado para compartilhar a experiência do mestrado e que faz de cada dia das nossas vidas, um dia especial, **DEDICO**.

Aos meus pais, Magna e Carlos, e meus sogros, Neli e Mário, que mesmo sabendo que enfrentar a distância não seria fácil, nos apoiaram e nos permitiram realizar mais um sonho, **OFEREÇO**.

AGRADECIMENTOS

Ao grande e bondoso Deus pelas bênçãos diárias e por ter cuidado das pessoas que amo e de quem não pude estar perto durante o mestrado.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio e estímulo.

Ao meu noivo, Gilvane, pela companhia, compreensão e dedicação.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pela oportunidade do mestrado.

Ao meu orientador, Dr. Osmar Klauberg Filho, pela orientação em todos os aspectos, amizade e confiança.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao prof. Dr. Júlio César Pires e demais professores do Departamento de Solos que participaram direta ou indiretamente da minha formação, pela amizade e troca de conhecimentos.

À Dra. Mariângela Hungria pela co-orientação durante a caracterização genética e por ter me recebido com tanto carinho em Londrina.

Ao prof. Dr. David Miquellutti pela prontidão em ajudar com as análises estatísticas.

À curadora da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, Rosa Pittard, pelo envio das estirpes-padrão.

Aos amigos queridos, Cláudia e Fernando, pela acolhida, pelo carinho e pela companhia durante divertidas noites de sábado.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia do Solo, em especial aos grandes amigos James e Elaine, e aos bolsistas de iniciação científica: Aline, Anelize, Dalciana e David, pela convivência e colaboração.

À querida amiga Simone pelos momentos compartilhados durante o segundo semestre de 2007.

Aos colegas de mestrado pela amizade, pelos dias de estudo e pelos momentos de descontração.

À todos do Laboratório de Biotecnologia do Solo, da Embrapa Soja, em especial às amigas Ilmara e Luciana, pela ajuda durante as análises, pelas dúvidas esclarecidas e pelas longas conversas e boas risadas.

Aos amigos do Laboratório de Homeopatia e Saúde Vegetal, da Epagri-Lages, especialmente à Michele, pela receptividade e amizade.

RESUMO

Bactérias do gênero *Azospirillum* podem colonizar endofiticamente plantas de arroz irrigado e contribuem para o desenvolvimento da cultura através da produção de hormônios de crescimento vegetal e biodisponibilização de nutrientes. O objetivo desse trabalho foi estudar a ocorrência e a diversidade de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em cultivos de arroz irrigado em Santa Catarina, e a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, produção de auxinas e solubilização de fosfatos de cálcio por isolados do gênero. Amostras de plantas de arroz irrigado foram coletadas em oito propriedades rurais nas cidades de Guarimirim (duas áreas), Massaranduba, Rodeio (duas áreas), Rio do Sul, Agronômica e Pouso Redondo. A ocorrência de *Azospirillum* spp. em raízes desinfestadas e colmos foi avaliada através do método do Número Mais Provável de Propágulos e a similaridade entre as áreas foi estimada através da análise de componentes principais (ACP). Após os procedimentos de isolamento e purificação, os isolados foram caracterizados morfológicamente e sua similaridade fenotípica foi avaliada através de análise de agrupamento utilizando o coeficiente de coincidência simples. Dentre todos os isolados obtidos, foram selecionados 25 isolados para serem caracterizados geneticamente e fisiologicamente. A caracterização genética foi feita através da amplificação do DNA dos isolados por rep-PCR e a similaridade dos perfis estimada através do coeficiente de Jaccard e do algoritmo UPGMA. A produção de AIA foi avaliada em meio de cultura com triptofano. O potencial de fixação biológica de nitrogênio *in vitro* foi estimado através da quantificação do teor de N total do meio de cultura e a solubilização de fosfatos de cálcio foi avaliada em placas de Petri. A densidade populacional média de *Azospirillum* spp. foi de $1,6 \times 10^8$ e $1,42 \times 10^8$ células g^{-1} de matéria fresca (meio LGI), e $1,76 \times 10^8$ e $1,56 \times 10^8$ células g^{-1} de matéria fresca (meio NFb), para raízes e colmos respectivamente. Foram obtidos 62 isolados, a maioria de raízes desinfestadas, e com similaridade fenotípica superior a 94%. Os 25 isolados caracterizados geneticamente por rep-PCR tiveram similaridade genética superior a 55%. A maioria dos isolados caracterizados fisiologicamente (64%) produziram AIA em meio de cultura em quantidades que variaram entre 5,67 e 119,72 μg AIA mL^{-1} . Treze isolados fixaram entre 5,18 e 22,8 μg N mL^{-1} em meio de cultura e quatro isolados mostraram habilidade de solubilização de fosfato de cálcio em placas de Petri. Os isolados caracterizados nesse trabalho deverão ser testados em ensaios de inoculação para confirmação do seu potencial biotecnológico e eficiência agrônoma para aplicação na cultura do arroz irrigado.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas. Colonização endofítica. Promoção de crescimento vegetal. Rep-PCR.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Azospirillum* can colonize rice plants endophytically and contribute to the development of the culture by producing plant growth hormones and enhancing nutrient availability. The objective of this work was to study the occurrence and diversity of endophytic *Azospirillum* spp. in lowland rice at the state of Santa Catarina, Brazil, and the capacity of biological nitrogen fixation, auxins production and calcium phosphate solubilization by *Azospirillum* strains. Samples of rice plants were collected at eight farms in the cities of Guaramirim (two areas), Massaranduba, Rodeio (two areas), Rio do Sul, Agronômica and Pouso Redondo. *Azospirillum* spp. occurrence in disinfested roots and stems of the collected plants was evaluated using the More Probable Number method (MPN) and the similarity between the eight areas estimated by principal component analysis (PCA). After isolating and purifying proceedings, the strains were characterized morphologically and their phenotypic similarity was evaluated by clustering analysis using the simple matching coefficient. Twenty five strains were selected to be characterized genetically and physiologically. Genetic characterization was done by rep-PCR DNA amplification using the primer BOXA1R and the strains similarity was estimated using Jaccard coefficient and the UPGMA algorithm. Indol-acetic acid (IAA) production was estimated in culture broth supplemented with tryptophan. *In vitro* biological nitrogen fixation was estimated by quantification of total N in culture broth, and calcium phosphate solubilization was tested in Petri dishes. The population of *Azospirillum* spp. varied from 1.6×10^8 to 1.42×10^8 cells g^{-1} of fresh matter (LGI), and from 1.76×10^8 to 1.56×10^8 cells g^{-1} fresh matter (NFb), in roots and stem, respectively. Sixty two (62) isolates were obtained, most of them from disinfested roots, and their phenotypic similarity was superior to 94%. The 25 strains characterized by rep-PCR showed a genetic similarity superior to 55%. Most of the strains characterized physiologically (64%) were able to produce IAA in culture broth in contents that varied from 5.67 to 119.72 μg IAA mL^{-1} . Thirteen strains fixed between 5.18 and 22.8 μg N mL^{-1} in culture broth and only four strains could solubilize calcium phosphate in Petri dishes. The strains characterized in this work should be tested in inoculation trials to confirm their biotechnological potential and agronomic efficiency to future application in lowland rice culture.

Keywords: Diazotrophic bacteria. Endophytic colonization. Plant growth promotion. Rep-PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Visualização da película aerotóxica típica do crescimento de *Azospirillum* em meio LGI (A) e NFb com azul de bromotimol (B) semi-sólidos. 17
- Figura 2 - Árvore filogenética da região 16S rDNA de *Azospirillum* spp. e outras α -Proteobactérias relacionadas ao gênero (SCHMIDT & HARTMANN, 2007). . 25
- Figura 3 - Representação esquemática do processo de isolamento de *Azospirillum* spp. a partir de material vegetal. (Videira et al., 2007). 33
- Figura 4 - Similaridade entre áreas de coleta de arroz irrigado (Guara1: Guaramirim 1, guara2: Guaramirim 2, massar: Massaranduba, rodeio1: Rodeio 1, rodeio2: Rodeio 2, rsul: Rio do Sul, agron: Agronômica, pron: Pouso Redondo) considerando a ocorrência de *Azospirillum* spp. em raízes (RA) e colmos (CO) isolados em meio NFb (NFbRA e NFbCO) e LGI (LGIRA e LGICO) (A), e os atributos químicos dos solos: pH, NH_4^{4+} (NH_4), $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ($\text{NO}_3.\text{NO}_2$) e P disponível (Ptotal) (B), estimada através da análise de componentes principais (ACP). 37
- Figura 5 - Observação ao microscópio de bactérias gram-negativa (A) e gram-positiva (B). 39
- Figura 6 - Número e porcentagem de isolados de *Azospirillum* spp. obtidos de colmos e raízes de arroz irrigado, utilizando os meios de isolamento NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) e LGI (*A. amazonense*). 39
- Figura 7 - Número de isolados de *Azospirillum* spp. obtidos de colmos e raízes de arroz irrigado, utilizando os meios de isolamento NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) e LGI (*A. amazonense*), considerando as áreas de coleta de plantas. 40
- Figura 8 - Distância entre isolados bacterianos do gênero *Azospirillum* spp. oriundos de raízes e colmos de arroz irrigado, avaliada pelo coeficiente de Coincidência Simples (SOCKAL & MICHENER, 1958). 43

Figura 9 - Similaridade genética dos produtos de amplificação por rep-PCR (*primer* BOX A1R) de isolados de *Azospirillum* spp. estimada através do coeficiente de Jaccard e do algoritmo UPGMA. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ranking mundial de produção de arroz na safra 2006/2007.	14
Tabela 2 - Efeito de diferentes concentrações de sobrenadante de <i>A. brasilense</i> (ATCC29710) no comprimento de raízes de arroz.	20
Tabela 3 - Relação de algumas teses e dissertações defendidas no Brasil entre 1998 – 2007 envolvendo o gênero <i>Azospirillum</i> na cultura do arroz.	27
Tabela 4 - Localização das áreas de coleta de plantas de arroz irrigado em Santa Catarina.	33
Tabela 5 - Estimativa da ocorrência de bactérias do gênero <i>Azospirillum</i> em raízes e colmos de plantas de arroz irrigado coletadas em Santa Catarina, utilizando-se os meios de isolamento NFb (<i>A. lipoferum</i> e <i>A. brasilense</i>) e LGI (<i>A. amazonense</i>), pelo método NMP.	36
Tabela 6 - Atributos químicos dos solos das áreas de coleta de plantas de arroz irrigado.	38
Tabela 7 - Origem, área de coleta de plantas de arroz irrigado e meio de isolamento de isolados de <i>Azospirillum</i> spp. anexados à Coleção de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento do CAV/UDESC.	41
Tabela 8 - Descrição de isolados de <i>Azospirillum</i> spp. oriundos de raízes e colmos de arroz irrigado coletado em SC utilizados para estudos de caracterização genética e fisiológica.	49
Tabela 9 - Produção de auxinas em meio de cultura (AIA) e fixação biológica de nitrogênio <i>in vitro</i> por isolados de <i>Azospirillum</i> spp.	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 A CULTURA DO ARROZ IRRIGADO: UMA VISÃO SÓCIO-ECONÔMICA E AMBIENTAL.	14
2.2 BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Azospirillum</i> NA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO ...	16
2.2.1 Promoção de crescimento vegetal por <i>Azospirillum</i> spp.	18
2.2.1.1 Produção de auxinas	19
2.2.1.2 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)	21
2.2.1.3 Solubilização de fosfatos	22
2.3 FERRAMENTAS MOLECULARES PARA ESTUDO DA BIODIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Azospirillum</i> spp.....	23
2.4 A PESQUISA SOBRE <i>Azospirillum</i> spp. NO BRASIL: ASPECTOS RELEVANTES ..	26
3 CAPÍTULO I: OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Azospirillum</i> ISOLADAS DE RAÍZES E COLMOS DE ARROZ IRRIGADO	29
3.1 RESUMO.....	29
3.2 ABSTRACT	30
3.3 INTRODUÇÃO	30
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.4.1 Estudo da ocorrência de bactérias do gênero <i>Azospirillum</i> em raízes e colmos de arroz irrigado	32
3.4.2 Isolamento e caracterização morfológica de <i>Azospirillum</i> spp.	34
3.4.3 Caracterização fenotípica de isolados de <i>Azospirillum</i> spp.	35

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.5.1 Ocorrência de <i>Azospirillum</i> spp. em raízes e colmos de arroz irrigado em SC.	35
3.5.2 Isolamento e caracterização de <i>Azospirillum</i> spp.	38
3.6 CONCLUSÕES	44
4 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE AZOSPIRILLUM SPP. ORIUNDOS DE PLANTAS DE ARROZ IRRIGADO.....	45
4.1 RESUMO.....	45
4.2 ABSTRACT	45
4.3 INTRODUÇÃO	46
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.4.1 Isolados utilizados nos experimentos	48
4.4.2 Caracterização genética de isolados de <i>Azospirillum</i>	48
4.4.2.1 Extração do DNA	48
4.4.2.2 Amplificação do DNA de isolados de <i>Azospirillum</i> por rep-PCR utilizando o primer BOX A1R	50
4.4.3 Caracterização fisiológica de isolados do gênero <i>Azospirillum</i> spp.	51
4.4.3.1 Preparo do pré-inóculo	51
4.4.3.2 Avaliação da produção de ácido indol acético (AIA) <i>in vitro</i>	51
4.4.3.3 Avaliação da capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) <i>in vitro</i>	52
4.4.3.4 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio <i>in vitro</i>	52
4.4.3.5 Análise estatística dos dados	53
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.5.1 Diversidade genética de isolados de <i>Azospirillum</i> spp.	53
4.5.2 Diversidade fisiológica de isolados de <i>Azospirillum</i> spp.	54
4.6 CONCLUSÕES	59
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO GERAL

Diante da importância econômica e social da cultura do arroz irrigado, o desenvolvimento de biotecnologias limpas que possibilitem o aumento da disponibilidade e aproveitamento do nitrogênio e outros nutrientes pela cultura, aumentando o seu rendimento, reduzindo as doses de fertilizante aplicadas e auxiliando na conservação do ecossistema e preservação da biota do solo constitui estratégia indispensável. Dentre essas alternativas está o uso de bactérias do gênero *Azospirillum* que podem se associar endofiticamente a várias espécies de gramíneas e são capazes de auxiliar no seu crescimento e desenvolvimento através da produção de hormônios de crescimento vegetal e da biodisponibilização de nutrientes pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico, e em algumas espécies, pela solubilização de fosfatos.

Considerando que o gênero *Azospirillum* envolve espécies microaerofílicas e que o microclima da cultura do arroz irrigado oferece condições ideais de concentração e difusão de oxigênio para o desenvolvimento dessas espécies, esse trabalho objetivou estudar a ocorrência e a diversidade de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em cultivos de arroz irrigado em Santa Catarina, e os aspectos relacionados à capacidade de fixação biológica de nitrogênio, produção de auxinas e solubilização de fosfatos de cálcio por isolados do gênero. O primeiro capítulo dessa dissertação tem caráter ecológico e envolve os estudos de ocorrência, isolamento e caracterização morfológica dos isolados obtidos em oito áreas com plantio de arroz irrigado, distribuídas em seis municípios de SC. No segundo capítulo são apresentados os resultados da caracterização genética de 25 isolados de *Azospirillum* spp. oriundos de raízes e colmos de arroz irrigado, e suas capacidades de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato de cálcio e produção de auxinas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A CULTURA DO ARROZ IRRIGADO: UMA VISÃO SÓCIO-ECONÔMICA E AMBIENTAL.

Cultivado e consumido em todo o mundo por mais de 10.000 anos, a cultura do arroz (*Oryza sativa*) desempenha papel importante tanto no âmbito econômico quanto social (FAO, 2000). Cereal com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína diária necessária ao homem, o arroz constitui alimento básico para mais de dois bilhões de pessoas e estima-se que até 2050 seja necessária uma produção que atenda o dobro dessa demanda (AZAMBUJA et al. 2004; ALONÇO et al., 2005).

Segundo dados da FAOSTAT (2008), na safra 2006/2007 a produção mundial de arroz foi superior a 650 milhões de toneladas e 90% deste total foram produzidos na Ásia, principalmente na China e na Índia, principais países produtores de arroz no mundo. Nesse mesmo período, o Brasil produziu 11 milhões de toneladas de arroz, e ocupou o décimo lugar entre os maiores produtores do cereal com participação de 1,7% na produção mundial (Tabela 1).

Tabela 1 - Ranking mundial de produção de arroz na safra 2006/2007.

Principais países produtores de arroz	Produção (milhões toneladas)	Participação na produção mundial (%)
China	185.490	28,5
Índia	141.134	21,7
Indonésia	57.049	8,8
Bangladesh	43.504	6,7
Vietnã	35.567	5,5
Myanmar	32.610	5,0
Tailândia	27.879	4,3
Filipinas	16.000	2,5
Brasil	11.080	1,7

Fonte: Adaptado de FAOSTAT Database, 2008.

No Brasil, onde cerca de 65% do arroz é cultivado sob sistema irrigado, a cultura ocupa o quarto lugar em área plantada com mais de 2,8 milhões de hectares e a Região Sul do país concentra a maior parte dessa área (1,2 milhões de hectares). Na safra 2007/2008 a

produção brasileira de arroz superou 12 milhões de toneladas e juntos, os estados do Rio Grande Sul, Santa Catarina e Paraná foram responsáveis por 70% dessa produção. Entretanto, a produção brasileira de arroz ainda não consegue atender o mercado interno. Somente no ano de 2007 o país necessitou importar 46 mil toneladas de arroz com casca e 672 mil toneladas de arroz beneficiado (ALONÇO et al., 2005; AZAMBUJA et al., 2004; CONAB, 2008).

No estado de Santa Catarina, segundo maior produtor do país, com cerca de 1 milhão de toneladas, a produção de arroz se concentra no litoral (Norte, Sul e Central) e no Baixo, Médio e Alto Vale do Itajaí. Em todas as áreas produtoras, o arroz é cultivado em várzeas (arroz irrigado por inundação contínua) sob sistema de plantio pré-germinado que possibilita incrementos na produção devido ao melhor controle de plantas daninhas e à aceleração da liberação de nutrientes essenciais às plantas. Na safra 2007/2008 o estado alcançou a segunda maior produtividade do país (6.690 kg ha^{-1}) perdendo apenas para o Rio Grande do Sul (6.881 kg ha^{-1}), entretanto na safra 2006/2007, ocupou o primeiro lugar do ranking com produtividade média de 7 mil kg ha^{-1} (ALONÇO et al., 2005; CONAB, 2008; KNOBLAUCH & REIS, 2004).

Para o incremento da produtividade da cultura do arroz, a disponibilidade de nutrientes é fator limitante, especialmente o nitrogênio (N) que contribui para o aumento da área foliar da planta que implica em melhor aproveitamento da radiação solar, maior produção de energia pela fotossíntese e conseqüentemente maior produtividades de grãos (FAGERIA & BARBOSA FILHO, 2006). Em um sistema agrícola, as fontes de N para as plantas são a matéria orgânica do solo, a fixação biológica de nitrogênio (N_2) atmosférico e os fertilizantes nitrogenados (FAGERIA et al., 2003). No estado da Santa Catarina, a adubação nitrogenada é feita em cobertura, diretamente sobre a lâmina d'água, e a recomendação de adubação baseia-se no teor de matéria orgânica do solo variando entre 30 e 90 kg N ha^{-1} para solos com alto e baixo teor de matéria orgânica respectivamente (KNOBLAUCH & REIS, 2004).

As plantas podem absorver o N sob as formas de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), no entanto, em condições de inundação, a eficiência de recuperação de N pelas plantas é de apenas 40% devido às perdas do nutriente por volatilização, lixiviação e desnitrificação. Para compensar as perdas, muitas vezes os fertilizantes nitrogenados são aplicados em doses elevadas, o que aumenta a possibilidade de contaminação ambiental e também onera o custo de produção devido ao alto valor do fertilizante (FAGERIA et al., 2003).

Principalmente para a cultura do arroz irrigado, a aplicação de doses inadequadas de N é preocupante porque em solos inundados, quando a água percola, o NO_3^- acumulado no

interior dos poros fica sujeito à lixiviação se localizado abaixo da zona radicular e dentro da zona não-saturada, chamada zona vadose. Uma vez na zona vadose, o NO_3^- pode atingir as águas subterrâneas e tornar-se um potencial poluente (MATTOS, 2004). Além disso, há também a possibilidade de contaminação das águas superficiais, pois, quando aplicado diretamente na lâmina de irrigação, o fertilizante nitrogenado pode ser transportado pela água que ao retornar ao seu curso natural, poderá ser utilizada para abastecimento urbano e industrial, e consumo de animais nas propriedades (NOLDIN et al., 2004; MARTINELLI, 2007).

A preocupação com o impacto ambiental da cultura do arroz irrigado traz à tona a necessidade de aumentar a sustentabilidade deste agroecossistema. Dentro desse contexto, a biologia do solo se insere oferecendo alternativas para o desenvolvimento de biotecnologias limpas e eficientes, que auxiliam na nutrição das plantas e manutenção de boas produtividades, com o mínimo impacto ambiental (DÖBEREINER, 1990). Para aplicação na cultura do arroz irrigado, alguns microrganismos benéficos com destaque para as bactérias do gênero *Azospirillum*, têm sido alvo de pesquisas no mundo todo como forma de aumentar a disponibilidade de nutrientes e auxiliar na promoção do crescimento das plantas.

2.2 BACTÉRIAS DO GÊNERO *Azospirillum* NA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO

O gênero *Azospirillum* é formado por bactérias heterotróficas, microaerófilas, gram-negativas, e envolve atualmente as espécies: *A. brasilense* e *A. lipoferum* (TARRAND et al., 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987), *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. largimobile* (DEKHIL et al., 1997), *A. dobereinerae* (ECKERT et al., 2001), *A. melinis* (PENG et al., 2006), *A. oryzae* (XIE & YOKOTA, 2005) e *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007). As primeiras espécies classificadas no século passado, na década de 70, são as mais estudadas e destas, *A. brasilense* é a espécie que concentra maior número de publicações e pode ser considerada modelo de estudo nessa área (REIS et al., 2005).

O descobrimento do gênero *Azospirillum* deve-se principalmente à introdução do meio NFb semi-sólido, livre de nitrogênio. Embora tenham um metabolismo aeróbico, essas bactérias são sensíveis ao oxigênio e devido a isso, deslocam-se para regiões do meio de cultura onde a taxa de difusão de O_2 esteja em equilíbrio com sua taxa respiratória formando uma película em forma de véu (Figura 1). Esse fenômeno chamado aerotaxia, permite que seja gerada energia utilizando o O_2 como aceptor de elétrons e ao mesmo tempo evita que a

nitrogenase, que é sensível ao O₂, seja desativada (DÖBEREINER et al., 1995; ZHULIN et al., 1996). Após o meio NFb, apenas com a variação da fonte de carbono, foi desenvolvido também o meio LGI que permitiu a identificação de novas espécies de *Azospirillum* (DÖBEREINER et al., 1995).

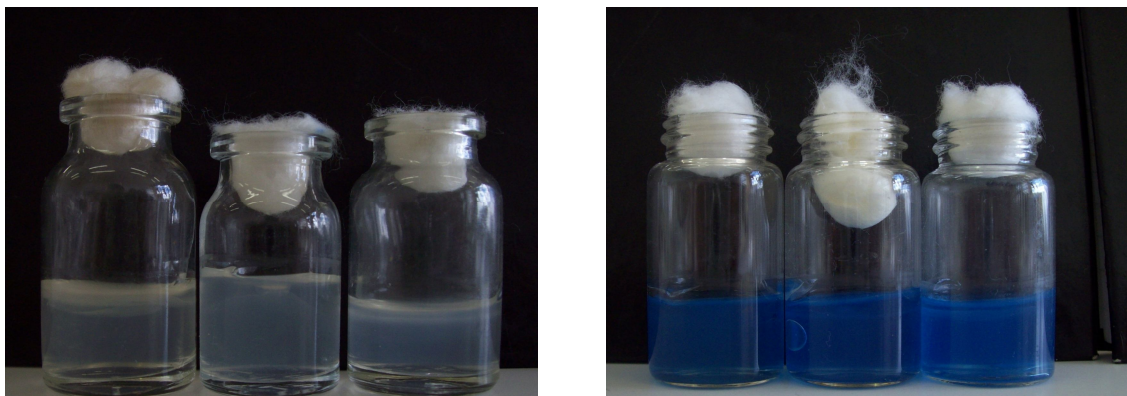


Figura 1 - Visualização da película aerotóxica típica do crescimento de *Azospirillum* em meio LGI (A) e NFb com azul de bromotimol (B) semi-sólidos.

Diferente do que ocorre na interação rizóbio-leguminosa, os microrganismos desse gênero, classificados como associativos, colonizam as plantas sem que haja a formação de estruturas diferenciadas e sem que se estabeleça qualquer relação de simbiose (BERGAMARSCI, 2006). Maior parte das espécies do gênero é encontrada colonizando a zona de elongação das raízes e os pêlos radiculares, no entanto, algumas estirpes podem ser encontradas no interior das plantas, por isso são consideradas endofíticas facultativas (BALDANI et al., 1997; DÖBEREINER et al., 1995). Além da possibilidade de sobrevivência no ambiente rizosférico ou no interior da planta, o gênero *Azospirillum* apresenta boa sobrevivência no solo. Sob condições de estresse, essas bactérias têm capacidade de agregação devido à produção de flocos e também de cistos ricos em poli- β -hidroxibutirato (PHB) que, na ausência de alimento, pode servir como fonte de carbono e energia para essas espécies (BASHAN & HOLGUIN, 1997; BURDMAN et al., 1998).

Azospirillum lipoferum, *A. brasilense* e *A. amazonense* apresentam uma ampla distribuição ecológica e são as principais espécies com ocorrência nas regiões de clima tropical, onde maior parte dos isolados são obtidos da rizosfera e da parte aérea de diversas gramíneas de interesse econômico, dentre elas o arroz (BALDANI et al., 1997). Devido ao seu metabolismo microaerofílico, essas bactérias têm sido consideradas como de potencial para utilização na cultura do arroz irrigado, já que a condição de alagamento do solo reduz a

concentração e difusão O_2 na água (VAHL & SOUZA, 2004), sendo o ambiente de cultivo das plantas de arroz também ideal para o crescimento dessas bactérias, que podem contribuir para o desenvolvimento da cultura promovendo o crescimento vegetal através da produção de fitohormônios e da fixação biológica do nitrogênio (FRANCO & BALEIRO, 1999).

2.2.1 Promoção de crescimento vegetal por *Azospirillum* spp.

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) exercem efeitos benéficos no desenvolvimento das plantas e possibilitam a redução da aplicação de fertilizantes químicos, diminuindo o custo de produção e os problemas de contaminação ambiental decorrentes das perdas de nutrientes (FREITAS & VILDOSO, 2004; NELSON, 2004).

Segundo Oliveira et al. (2003), as BPCV podem afetar o crescimento das plantas através de mecanismos diretos e indiretos. Os mecanismos diretos de promoção de crescimento incluem a fixação biológica de nitrogênio, síntese de sideróforos, produção de fitohormônios, solubilização de fosfatos e aceleração do processo de mineralização dos nutrientes. Indiretamente, atuam os mecanismos de indução de resistência sistêmica das plantas, antagonismo à patógenos, aumento da resistência das plantas a situações de estresse e produção de antibióticos.

Na cultura do arroz, as bactérias do gênero *Azospirillum* estão entre as principais BPCV estudadas atualmente. A possibilidade de estabelecimento endofítico dessas bactérias faz com que elas influenciem com maior eficiência a promoção do crescimento das plantas, considerando que, no interior do vegetal, essas bactérias estão menos sujeitas as flutuações ambientais e à competição com outros microrganismos, além disso, a troca de metabólitos com a planta é mais direta do que aquela que ocorre em ambiente rizosférico (PERIN et al., 2003).

Rodrigues et al. (2008) analisaram o efeito da inoculação de sementes de arroz com estirpes de *A. amazonense* isoladas de plantas de arroz irrigado coletadas no estados do Rio de Janeiro e Goiás, cultivadas em casa-de-vegetação sob sistema irrigado até o período de maturação dos grãos. Os tratamentos inoculados com *A. amazonense* apresentaram maior número de panículas por vaso em comparação com os tratamentos Controle I e Controle II não inoculados e adubados com 80 e 50 mg N kg⁻¹ de solo, respectivamente. Os isolados BR11833 e BR11752 aumentaram em até 10% a matéria seca de grãos, e os tratamentos com BR11755, Y2^T e BR11746 incrementaram em até 18% o teor de N acumulado nos grãos. Guarnato et al. (1999) avaliaram o capacidade de promoção de crescimento de três isolados

do gênero *Azospirillum* (AZ92-2, V.S2-2 e VIII.P1-2) oriundos de gramíneas de ocorrência no Japão e inoculados em plântulas de arroz irrigado, que foram cultivadas em solo não estéril em casa-de-vegetação, e observaram que a inoculação dos isolados nos tratamentos sem aplicação de N aumentou o peso seco de parte aérea das plântulas em até 14,8% em comparação ao tratamento não inoculado.

Os resultados positivos de promoção de crescimento vegetal pelas bactérias do gênero *Azospirillum* devem-se à sua capacidade de produção de fitohormônios, principalmente auxinas, e biodisponibilização de nutrientes através da fixação biológica de nitrogênio (ROESCH et al., 2007) e solubilização de fosfatos inorgânicos por algumas espécies (SESHADRI et al., 2000).

2.2.1.1 Produção de auxinas

O gênero *Azospirillum* destaca-se pela capacidade dessas bactérias em produzir hormônios de crescimento vegetal, principalmente auxinas (PERRIG et al., 2007; RODRIGUES, 2004). A auxina produzida em maior quantidade por esses microrganismos é o ácido indolacético (AIA), que, quando absorvido pelos vegetais, causa modificações nas raízes, aumentando o seu comprimento e induzindo a formação de raízes laterais e pêlos radiculares. As mudanças morfológicas das raízes, estimuladas pela colonização de *Azospirillum*, podem melhorar a absorção de água e nutrientes pelas plantas (KUSS, 2006) melhorando a sua nutrição e tornando-as mais resistentes às intempéries.

As bactérias do gênero *Azospirillum* possuem três diferentes vias biossintéticas de produção AIA, duas delas dependentes de L-triptofano, um aminoácido precursor da produção desse fitohormônio, e a terceira via independente deste aminoácido mas dependente de outros precursores, como o ácido 3-indol pirúvico (OLIVEIRA et al., 2003; PATTEN & GLICK, 1996). Zakharova et al. (1999) estudaram a biossíntese de AIA por *A. brasilense* Sp245 em meio de cultura suplementado com 100 mg L⁻¹ de triptofano após 8, 24, 48 e 72 horas de incubação, e observaram que a capacidade de produção de AIA por essa estirpe aumentou exponencialmente a medida que se passou o tempo de incubação chegando a 15 mg L⁻¹ às 72 horas.

Perrig et al. (2007) avaliaram o potencial de síntese de AIA das estirpes Cd e Az39 (*A. brasilense*) cultivadas em meio NFb sem triptofano através de cromatografia e observaram que a estirpe Cd produziu 10,8 µg AIA mL⁻¹, quantidade significativamente maior que a produzida por Az39 (2,9 µg mL⁻¹). Roesch et al. (2007) caracterizaram 224 isolados de

Azospirillum spp. oriundos de raízes, colmos e solo rizosférico de plantas de arroz irrigado coletadas no Rio Grande do Sul, quanto à produção de AIA em meio sem triptofano e os 30 isolados mais promissores segundo os autores, produziram entre 3,51 μg e 246,69 μg AIA.

A capacidade de síntese de AIA por estirpes de *Azospirillum* sugere que essas bactérias possam ser utilizadas na cultura do arroz na forma de inoculantes contribuindo para o crescimento e desenvolvimento da cultura. Didonet et al. (2003) avaliando o desempenho de linhagens de arroz inoculadas com isolados de *Azospirillum*, observaram efeitos da inoculação na altura das plantas e no comprimento das raízes que produziram mais raízes secundárias e maior número de ramificações, que implicam em maior capacidade de absorção de nutrientes devido ao aumento da área de solo explorada pelas raízes.

Considerando que as raízes das plantas são sensíveis a altas concentrações de fitohormônios, a capacidade de produção de AIA por *Azospirillum* spp. deve ser analisada com cuidado, pois efeitos negativos nas plantas também podem ser encontrados (Rodrigues et al., 2008). El-Khawas & Adashi (1999) avaliaram o efeito da inoculação do sobrenadante de *A. brasilense* (ATCC29710), em concentrações que variaram entre 0 e 16%, no desenvolvimento de raízes de plântulas de arroz cultivadas em solução nutriente. A estirpe utilizada no ensaio produziu 46 μg AIA mL^{-1} em meio de cultura após 72 h de incubação, e a inoculação do seu sobrenadante em concentrações acima de 12% reduziu drasticamente o comprimento radicular das plantas que chegou a ser menor que no tratamento não inoculado (Tabela 2). De acordo com Lambrecht et al. (2000), quando são produzidas altas quantidades de AIA exógenas, ao contrário do esperado, elas podem inibir o desenvolvimento das raízes, portanto é importante que isolados com potencial de produção de AIA *in vitro* sejam avaliados em ensaios de inoculação para que seja possível a seleção daqueles mais eficientes em promover o crescimento de plantas.

Tabela 2 - Efeito de diferentes concentrações de sobrenadante de *A. brasilense* (ATCC29710) no comprimento de raízes de arroz. Médias de cinco repetições.

Concentração de sobrenadante (%)	Comprimento de raiz (cm planta ⁻¹)
0	32 d
2	38 c
4	48 b
6	55 a
8	58 a
10	40 c
12	26 e
14	19 f
16	19 f

Fonte: El-Khawas & Adashi (1999).

2.2.1.2 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

A fixação do nitrogênio é um processo biológico restrito a microrganismos procariotos (algumas bactérias e cianobactérias, e também actinomicetos do gênero *Frankia*) que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, bioquímica, genética e filogenética (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002; SIQUEIRA & FRANCO, 1988). Esses microrganismos, chamados diazotróficos, são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico (N_2) a amônia (NH_3^+) através da quebra da ligação tríplice do N pela enzima nitrogenase, com um alto consumo de energia na forma de ATP. Após a reação de redução, a amônia é rapidamente convertida a NH_4^+ que ao ser transportado para fora da célula, é assimilado pela célula vegetal sob a forma de glutamina. O processo de FBN é complexo e dependente da expressão de um conjunto de genes denominados *nif*, que codificam as proteínas envolvidas no processo ((CARDOSO et al., 1992; REIS & TEIXEIRA, 2005; TEIXEIRA, 1997).

Em gramíneas, a FBN é conhecida desde que a bactéria *Beijerinckia fluminensis* foi isolada da rizosfera de cana-de-açúcar por Döbereiner & Rushel (1958), mas foi somente após a redescoberta de bactérias do gênero *Azospirillum* (DÖBEREINER & DAY, 1975) devido ao desenvolvimento do meio de cultura NFb, que pesquisadores tornaram-se interessados pelo estudo da FBN em gramíneas (BALDANI & BALDANI, 2005; BALDANI et al, 1999).

Com o avanço da pesquisa, novos meios de isolamento foram desenvolvidos e com isso novos gêneros e espécies de diazotróficos puderam ser identificados (BALDANI & BALDANI, 2005). O gênero *Azospirillum* foi um dos que mais se destacou e além dele outros gêneros são conhecidos pela capacidade de FBN em diversas espécies de gramíneas, entre eles *Gluconacetobacter*, *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Klebsiela* (REIS & TEIXEIRA, 2005).

A capacidade do *Azospirillum* spp. de colonizar o interior dos vegetais e sobreviver em regiões de baixa concentração de O_2 levanta hipóteses de que as espécies de origem endofítica sejam mais eficientes na FBN quando comparadas às espécies de colonização rizosférica (BALDANI et al., 1999), e podem contribuir com até 30% do N acumulado pelas plantas (CAMPOS et al., 2003). O potencial de FBN por *Azospirillum* spp. pode variar em função da interação da bactéria com o genótipo da planta, das condições ideais de concentração e difusão de O_2 para criação do ambiente microaerofílico que possibilite a expressão da enzima nitrogenase, e da disponibilidade de NH_4^+ no solo (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Malik et al. (1997) estudaram a contribuição da associação das estirpes fixadoras de nitrogênio N-4 (*A. lipoferum*) e Wb-3 (*A. brasilense*) à cultura do arroz no Paquistão. As

estirpes apresentaram atividade da nitrogenase, detectada pela técnica da redução do acetileno (ARA), igual a 686 e 215 nmol C₂ H₄/h/mg proteína⁻¹, respectivamente, e foram inoculadas em plântulas dos genótipos NIAB-6 e BAS-370 cultivadas em vasos contendo vermiculita, solução de Hoaglands e 34 mg de sulfato de amônio marcado com o isótopo ¹⁵N para quantificação da contribuição da FBN. De acordo com os autores, o efeito benéfico da inoculação foi mais perceptível para o genótipo BAS-370 inoculado com a estirpe N-4 que contribuiu com 66% do N total absorvido pelas plantas.

Pedraza et al. (2008), em experimento realizado na província de Tucuman na Argentina, com as estirpes de *A. brasilense* REC-3 e 13-2C inoculadas em sementes de arroz, cultivar Taranga, relataram o efeito da adubação nitrogenada sobre a atividade das estirpes estudadas. Quando REC-3 foi inoculado no tratamento sem adubação, a porcentagem de N total acumulado nos grãos foi igual a 1,68%, superando o tratamento não inoculado e adubado com uréia (50 kg N ha⁻¹) que teve média de 1,45%. Já a inoculação de REC-3 no tratamento com adubação, não teve efeito sobre a porcentagem de N total nos grãos. Em contrapartida, a estirpe 13-2C que no tratamento sem adubação igualou-se ao tratamento adubado e não inoculado, foi beneficiada pela adubação nitrogenada apresentando porcentagem média de N total nos grãos superior 1,55%.

Pelo fato da interação de *Azospirillum* spp. com as plantas não ser simbiótica e sim associativa, a presença dessas bactérias em altas concentrações nas raízes e até no interior das plantas nem sempre quer dizer que elas estejam contribuindo significativamente com a nutrição nitrogenada do vegetal através da FBN (JAMES, 2000). No entanto, embora a contribuição da FBN associativa aos vegetais não seja tão expressível quando comparada às interações simbióticas, ela se torna importante se considerarmos a grande extensão de áreas cobertas por gramíneas e cereais no mundo todo (NÓBREGA et al., 2004). Para a cultura do arroz irrigado, a FBN pode ser de grande valia e possibilitar a redução das doses de fertilizante nitrogenado e do custo de produção, e conseqüentemente os problemas ambientais decorrentes das perdas de N (CHOUDHURRY & KENNEDY, 2004).

2.2.1.3 Solubilização de fosfatos

O fósforo (P), assim como o N, é um elemento essencial aos organismos vivos por fazer parte dos componentes estruturais das células, de coenzimas e compostos atuantes no processo de armazenamento e transferência de energia. O P é um elemento de ciclo biogeoquímico cujas transformações químicas resultam das interações solo-planta-

microrganismo. Esse elemento está presente no solo sob as formas orgânicas e inorgânicas, e é absorvido pelas raízes das plantas na forma de fosfato (PO_4^-). Uma vez na solução do solo, o íon PO_4^- está sujeito à adsorção pelos colóides do solo e se complexa a outros cátions como o cálcio, ferro e alumínio, ficando cada vez menos disponível aos vegetais (NAHAS, 1999).

A atividade biológica do solo é um dos principais fatores que afetam a disponibilidade de P aos vegetais. Além do papel na mineralização do P orgânico, fungos e bactérias liberam ácidos orgânicos, resultantes do seu metabolismo, que alteram o pH do solo e auxiliam na solubilização de fosfatos de baixa solubilidade (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002; NAHAS, 1999). A capacidade de solubilização de fosfatos por *Azospirillum* spp. é pouco relatada, no entanto, resultados positivos têm sido encontrados.

Seshadri et al. (2002), ao avaliarem a eficiência de solubilização de fosfatos insolúveis em meio líquido de três estirpes da espécie *A. halopraeferans*, oriundas de ambientes salinos no Brasil, observaram que todas as estirpes foram eficientes solubilizando até $1,45 \text{ g P.mL}^{-1}$ de meio. A capacidade de solubilização de P por estirpes de *A. lipoferum* foi comprovada por El-Komy (2005) que relatou que ambas as estirpes avaliadas solubilizaram em média $80 \mu\text{g P.mL}^{-1}$.

A utilização de bactérias do gênero *Azospirillum* em cultivos de arroz irrigado, que também possam contribuir para a disponibilização do P através dos mecanismos de solubilização, é importante já que este nutriente tem efeito direto sobre componentes de produtividade, principalmente número de panículas por área, e, por conseguinte, sobre a produtividade da cultura (FAGERIA & BARBOSA FILHO, 2006).

2.3 FERRAMENTAS MOLECULARES PARA ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Azospirillum* spp.

Considerando que várias bactérias associativas ou de vida livre podem ser isoladas a partir de meios semi-sólidos livres de N e que apenas as caracterizações fenotípicas e fisiológicas desses microrganismos não são suficientes para a identificação completa de uma espécie, é importante a utilização de técnicas mais acuradas de análise a nível molecular que auxiliem na identificação desses organismos e que, aliadas às demais caracterizações tradicionais, possibilitem o estudo da sua biodiversidade (KIRCHHOF et al., 1996).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular que permitem a caracterização de microrganismos a partir do DNA e do RNA proporcionou avanços nos estudos de ecologia microbiana e abriram as portas para um novo campo interdisciplinar atualmente conhecido

como Ecologia Molecular Microbiana. A extração do DNA possibilita a obtenção de várias informações genéticas sobre uma espécie, enquanto os métodos de extração do RNA auxiliam o estudo da atividade de uma determinada comunidade microbiana (ROSADO et al., 1997).

As metodologias moleculares com base no DNA são mais específicas, rápidas e sensíveis e são utilizadas sozinhas ou em combinação com outras ferramentas. Essas técnicas moleculares, principalmente a reação de polimerização em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) vêm causando enorme impacto na pesquisa científica, sendo a reação de PCR a de maior aplicabilidade nas diferentes áreas da agricultura (GUIMARÃES, & SÁ, 2002).

A técnica de PCR, utilizada em conjunto com várias outras, permite a amplificação de uma região específica do DNA por meio da ligação de oligonucleotídeos (*primers*) a regiões que delimitam a seqüência alvo do DNA e sua extensão é dependente de uma DNA polimerase termoestável, geralmente extraída de *Thermus aquaticus*, chamada Taq DNApolimerase. O PCR é baseado em repetitivos ciclos de extensão enzimática de oligonucleotídeos em duas posições opostas de uma fita de DNA. A amplificação acontece após ciclos repetitivos que envolvem a desnaturação a 94 °C, o anelamento dos primers a temperaturas que variam entre 37 °C a 60 °C, e a extensão do primer em temperatura intermediária (70-72 °C) (ROSADO et al., 1997; ROSADO et al., 1999).

Juntamente com os estudos que envolvem o DNA, como polimorfismos de DNA, a análise da região 16S do RNA ribossômico, cujos genes são os rDNAs, tem sido adotada como ferramenta para identificação de gêneros bacterianos existentes em determinados ambientes devido ao seu alto grau de conservação e também por gerar grande quantidade de informações úteis para análises filogenéticas (REIS JÚNIOR et al., 2002). A diferenciação das espécies de *Azospirillum* identificadas atualmente somente foi possível através de estudos que envolveram caracterizações morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, e análises de polimorfismo de DNA e filogenia com base no gene ribossomal 16S (HOLGUIN et al. 1999; SCHMID & HARTMANN, 2007) (Figura 2).

Brasil et al. (2005) avaliaram a diversidade genética de *Azospirillum* spp. isolados em gramíneas de ocorrência no pantanal Sul-Matogrossense através do seqüenciamento da região 16S do DNA ribossomal. A análise de agrupamento mostrou que os 39 isolados foram divididos em cinco grupos genéticos distintos, pertencentes aos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*. De acordo com os autores, os isolados identificados como *A. amazonense* e *A. lipoferum* tiveram 50% de similaridade, e *A. amazonense* se agrupou às outras espécies do gênero com apenas 25% de similaridade.

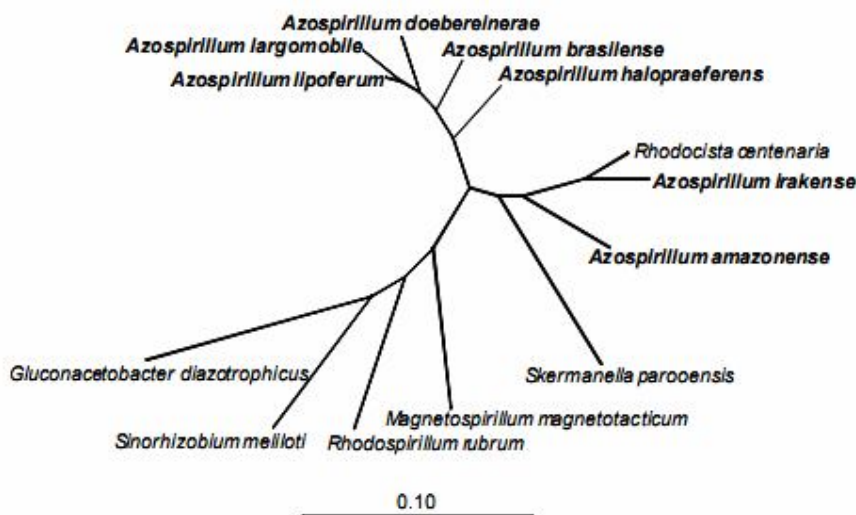


Figura 2 - Árvore filogenética da região 16S rDNA de *Azospirillum* spp. e outras α -Proteobactérias relacionadas ao gênero (SCHMIDT & HARTMANN, 2007).

Outra ferramenta útil para estudo de biodiversidade de *Azospirillum* e outros diazotróficos, como os simbiontes do gênero *Rhizobium*, é o rep-PCR (REIS JÚNIOR et al., 2002; STOCCO et al., 2008). A técnica de rep-PCR (*repetitive extragenic palindromic* PCR) se baseia na utilização de *primers* que amplificam seqüências repetitivas e conservadas do DNA bacteriano, possibilitando a geração de perfis únicos de DNA ou “*fingerprints*” de estipes individuais altamente específicos e precisos.

Em rep-PCR, as seqüências repetitivas amplificadas e que são utilizadas como alvo para anelamento dos *primers* nas análises, são chamadas de *rep-elements*. Os *rep-elements* são de três tipos: REP (*repetitive enterobacterial palindromic*) (35-40 pb), ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) (124-127 pb) e BOX (subunidade A – 54 pb, B – 43 pb e C – 50 pb) (REIS JÚNIOR et al., 2002; ROSADO et al., 1997; VERSALOVIC et al., 1998). Stolfus et al. (1997) estudaram a diversidade genética de 133 bactérias diazotróficas isoladas de oito variedades de arroz cultivadas em cinco solos diferentes, no Instituto Internacional de Pesquisa do Arroz, nas Filipinas. A amplificação do DNA dos isolados através de rep-PCR (BOX e ERIC) mostrou alto grau de diversidade genética dos isolados e, a ausência de correlação entre os grupos formados e sua origem mostrou que essas bactérias eram de ocorrência cosmopolita. O rep-PCR é uma técnica rápida e com boa reprodutibilidade, além de não necessitar de alta tecnologia, pois utiliza recursos e

equipamentos usuais de um laboratório de biologia molecular (ROSADO et al., 1997; VERSALOVIC et al., 1998).

2.4 A PESQUISA SOBRE *Azospirillum* spp. NO BRASIL: ASPECTOS RELEVANTES

O potencial de promoção de crescimento vegetal do gênero *Azospirillum* tem impulsionado estudos visando a aplicação biotecnológica dessas bactérias em culturas comerciais de importância econômica na forma de inoculante. Países como Israel, Argentina, África do Sul, México, Índia, Paquistão, Filipinas e China estão à frente na pesquisa e já possuem inoculantes e biofertilizantes à base de *Azospirillum* spp. registrados e aprovados para uso comercial em culturas em gramíneas como arroz, milho e trigo (ARAÚJO, 2008; MONSALUD, 2008)

No Brasil, os trabalhos de pesquisa com espécies de *Azospirillum* e outras bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal se concentram principalmente na Embrapa Agrobiologia, na Embrapa Soja, na Embrapa Cerrados (ARAÚJO, 2008) e se incluem em linhas de pesquisa de instituições de ensino superior e pós-graduação. Na última década, estudos de ocorrência, obtenção e caracterização morfológica, fisiológica e genética de isolados de *Azospirillum* spp. para aplicação na cultura do arroz têm sido os objetivos principais de vários projetos, e o número de dissertações e teses geradas a partir desses estudos é crescente (Tabela 3). A caracterização de isolados de *Azospirillum* spp., principalmente fisiológica, é essencial para que se conheça o potencial de cada estirpe com relação à contribuição que este poderá trazer para a cultura através da fixação biológica de nitrogênio, produção de hormônios de crescimento vegetal, solubilização de fosfatos entre outras características importantes para a produção de inoculantes e desenvolvimento de programas de co-inoculação.

Assim como aconteceu para microrganismos simbioses utilizados em programas de inoculação de leguminosas, a criação e manutenção de bancos de germoplasma e programas de seleção de estirpes envolvendo vários laboratórios também é importante para que futuramente seja possível a recomendação dessas estirpes para uso comercial. A Embrapa Soja, em parceria com o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), a Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), a Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) e o Laboratório de Bioinformática (Labinfo) do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), está desenvolvendo o primeiro banco de germoplasma de bactérias de importância agrícola do país conectado virtualmente e através dele será possível o acesso a amostras de estirpes coletadas

em diferentes ecossistemas brasileiros passíveis de reprodução e utilização na agricultura, e também a informações sobre as estirpes cadastradas no banco (EMBRAPA SOJA, 2008). A Embrapa Agrobiologia também possui um banco de germoplasma de bactérias diazotróficas em que 25% das estirpes são do gênero *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, que servem como referência para estudos realizados no Brasil e no exterior, e estão em fase de caracterização taxonômica com ênfase a produção de inoculantes (EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2008)

Tabela 3 - Relação de algumas teses e dissertações defendidas no Brasil entre 1998 – 2007 envolvendo o gênero *Azospirillum* na cultura do arroz.

REFERÊNCIA	FOCO DA PESQUISA
Azevedo, 1998	Diversidade gênica de isolados de <i>A. amazonense</i>
Ferreira, 2004	Veículos para inoculação de bactérias diazotróficas em arroz inundado
Rodrigues, 2004	Caracterização fisiológica e inoculação de <i>A. amazonense</i>
Brasil, 2005	Ocorrência e diversidade genética de bactérias endofíticas na cultura do arroz
Gomes, 2006	Inoculação de <i>Azospirillum</i> em genótipos de arroz de terras altas
Kuss, 2006	Ocorrência e caracterização fisiológica de bactérias diazotróficas em arroz irrigado
Silva, 2006	Caracterização fisiológica de <i>A. brasilense</i> e <i>A. lipoferum</i> para produção de inoculante
Sabino, 2007	Interação planta-bactéria diazotrófica

Do ponto de vista agroindustrial, o Ministério da Agricultura (MAPA) juntamente com a Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII) e a Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE), já prevêm normas para produção, registro, comercialização e recomendação de estirpes, inoculantes e outros produtos para veiculação de bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento de plantas não-leguminosas (BALDANI, 2007; SILVA, 2006). Recentemente, um inoculante para aplicação na cultura da cana-de-açúcar contendo as bactérias diazotróficas *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*, foi desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia e liberado para industrialização, e poderá representar uma economia de trinta quilos de N por hectare (EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2008). Embora ainda não existam produtos registrados à base de *Azospirillum* spp. para aplicação na cultura do arroz, espera-se os investimentos em

pesquisa nessa área continuem e que brevemente essa tecnologia esteja disponível ao produtor representando ganho econômico e também ambiental.

3 CAPÍTULO I: OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Azospirillum* ISOLADAS DE RAÍZES E COLMOS DE ARROZ IRRIGADO

3.1 RESUMO

Bactérias do gênero *Azospirillum* podem colonizar endofiticamente plantas de arroz irrigado e contribuem para o desenvolvimento da cultura. O objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência e a diversidade fenotípica de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* isolados de raízes e colmos de arroz irrigado cultivado em Santa Catarina. Amostras de plantas de arroz irrigado foram coletadas em oito propriedades rurais nas cidades de Guaramirim (duas áreas), Massaranduba, Rodeio (duas áreas), Rio do Sul, Agronômica e Pouso Redondo. A ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em raízes desinfestadas e colmos foi avaliada através do método do Número Mais Provável de Propágulos (NMP), em meio seletivo semi-sólido NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) e LGI (*A. amazonense*), e a similaridade entre as áreas foi estimada através da análise de componentes principais (ACP). As bactérias crescidas nos meios semi-seletivos foram purificadas em seus respectivos meios, isoladas em meio BDA até a obtenção de culturas puras, caracterizadas morfológicamente e tiveram sua similaridade fenotípica avaliada através de análise de agrupamento utilizando o coeficiente de coincidência simples (SOCKAL & MICHENER, 1958). A densidade populacional média de *Azospirillum* spp. foi de $1,6 \times 10^8$ e $1,42 \times 10^8$ células g^{-1} de matéria fresca (meio LGI), e $1,76 \times 10^8$ e $1,56 \times 10^8$ células g^{-1} de matéria fresca (meio NFb), para raízes e colmos respectivamente. Ao final do isolamento foram obtidos 62 isolados, dos quais a maior parte oriunda de raízes desinfestadas e com similaridade fenotípica superior a 94%. Os resultados obtidos mostraram que *Azospirillum* spp. ocorrem em altas populações em regiões produtoras de arroz irrigado e podem ser encontrados colonizando endofiticamente raízes e colmos das plantas.

Palavras-chave: *Oryza sativa*. Bactérias endofíticas. *Azospirillum* spp.

3.2 ABSTRACT

Bacteria of the genus *Azospirillum* can colonize rice plants endophytically and contribute to the development of the culture. The objective of this work was to evaluate the occurrence and phenotypic diversity of endophytic *Azospirillum* spp. isolated from roots and stems of lowland rice plants grown in the State of Santa Catarina, Brazil. Samples of rice plants were collected at eight farms in the cities of Guaramirim (two areas), Massaranduba, Rodeio (two areas), Rio do Sul, Agronômica and Pouso Redondo. *Azospirillum* spp. occurrence in disinfested roots and stems of the collected plants was evaluated using the More Probable Number method (MPN), in two semi-solid selective broth: NFb (*A. lipoferum* and *A. brasilense*) and LGI (*A. amazonense*), and the similarity between the eight areas estimated by principal component analysis (PCA). The bacteria grown in semi-solid broth were purified in their respective broth, isolated in PDA broth to obtain pure cultures, characterized morphologically and had their phenotypic similarity evaluated by clustering analysis using the simple matching coefficient (SOCKAL & MICHENER, 1958). The population of *Azospirillum* spp. varied from 1.6×10^8 to 1.42×10^8 cells g^{-1} of fresh matter (LGI), and from 1.76×10^8 to 1.56×10^8 cells g^{-1} fresh matter (NFb), in roots and stem, respectively. Sixty two (62) isolates were obtained, most of them from disinfested roots, and their phenotypic similarity was superior to 94%. The results showed that *Azospirillum* spp. occur in high population at lowland rice fields in Santa Catarina and can be find colonizing roots and stems of rice plants.

Keywords: *Oryza sativa*. Endophytic bacteria. *Azospirillum* spp.

3.3 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é o grão de maior importância econômica e social no mundo por ser alimento básico para maioria da população. O Brasil está entre os dez principais países produtores de arroz e nesse cenário, a região Sul, onde se concentra o cultivo de arroz irrigado, tem uma participação de 70% da produção brasileira. No estado de Santa Catarina, que está entre os principais produtores do cereal e junto com o Rio Grande do Sul detém as maiores produtividades do país, o cultivo do arroz irrigado tem grande representatividade por ser fonte de renda para aproximadamente dez mil famílias (ALONÇO et al., 2005; CONAB, 2008).

O microclima da cultura do arroz irrigado apresenta uma ecologia microbiana especial e diversificada (KUSS, 2006). Devido ao alagamento do solo, a difusão de oxigênio é reduzida e assim cria-se um ambiente favorável ao desenvolvimento de bactérias microaerofílicas como as do gênero *Azospirillum* que contribuem para melhor nutrição e desenvolvimento da cultura (DÖBEREINER, 1990; SOUZA et al., 2000). Essas bactérias podem ser encontradas colonizando a rizosfera, mas também ocorrem em associação endofítica com diversas plantas, entre elas outras gramíneas de interesse econômico cultivadas em regiões de clima tropical, como milho, trigo e aveia (REIS & TEIXEIRA, 2005).

As principais espécies do gênero *Azospirillum* estudadas atualmente são *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense*. Essas bactérias podem ser isoladas através dos meios de culturas semi-específicos NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) e LGI (*A. amazonense*), ambos livres de nitrogênio e que se diferenciam devido às fontes de carbono. *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense* crescem em meio cuja fonte de carbono é o ácido málico e *A. amazonense* utiliza a sacarose como fonte de energia (DÖBEREINER et al., 1995).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são de ampla ocorrência e podem ser encontradas em densidades populacionais variadas dependendo da sua interação com o genótipo e o ambiente. Kuss (2006) estudou a ocorrência de *Azospirillum* spp. em solo e raízes de genótipos de arroz irrigado cultivados Rio Grande do Sul. As densidades populacionais mais baixas de *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense* foram encontradas no solo (10^3 células g solo seco⁻¹) enquanto nas raízes essas populações variaram entre 10^4 e 10^8 células g raízes⁻¹. Estudos de ocorrência de bactérias do gênero *Azospirillum* são importantes devido ao seu caráter ecológico, pois podem fornecer informações úteis a respeito do impacto do manejo de um determinado ecossistema sobre a comunidade bacteriana e se esta é influenciada pelo solo e condições ambientais. Pittner et al. (2007) compararam a ocorrência de *Azospirillum* spp. em solo de campo nativo e solo cultivado com milho, na região de Guarapuava no Paraná, e observaram que a flutuação populacional de *Azospirillum* entre agosto de 2003 e abril de 2004 foi influenciada pelas condições ambientais e também pelo manejo do solo, pois as populações mais altas foram encontradas no solo da área de cultivo de milho em relação a área de campo nativo.

O interesse da comunidade científica em pesquisas sobre *Azospirillum* spp. está na capacidade desses microrganismos de promover o crescimento vegetal através da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) e principalmente da produção de fitohormônios (BALDANI & BALDANI, 2005; DÖBEREINER, 1990; PERRIG et al., 2007). Devido a

essas características, esses microrganismos são considerados com grande potencial para utilização na agricultura sob a forma de inoculante, com o objetivo de aumentar a sustentabilidade da produção reduzindo a utilização de fertilizantes e, conseqüentemente, os problemas de contaminação ambiental decorrentes das perdas desses nutrientes (CHOUDHURY & KENNEDY, 2004).

No entanto, para que seja possível conhecer o potencial biotecnológico do gênero *Azospirillum* para aplicação na rizicultura catarinense, os estudos de ocorrência, isolamento e diversidade dessas espécies são essenciais para auxiliar no estudo do comportamento e atividade desses microrganismos e na seleção de isolados com características de interesse para uso como biofertilizantes ou bioestimulantes de crescimento de plantas. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência e a diversidade fenotípica de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* isoladas de raízes e colmos de arroz irrigado coletados em propriedades rurais no estado de Santa Catarina.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Estudo da ocorrência de bactérias do gênero *Azospirillum* em raízes e colmos de arroz irrigado

Amostras de plantas inteiras (planta + solo adjacente às raízes) de arroz irrigado foram coletadas ao acaso em oito propriedades rurais nos municípios de Guaramirim (duas áreas), Massaranduba, Rodeio (duas áreas), Rio do Sul, Agrônômica e Pouso Redondo. A coleta foi realizada no dia 28 de fevereiro de 2007 e os dados de localização das áreas encontram-se descritos na Tabela 4. Em cada propriedade foram coletadas seis amostras compostas por quatro plantas, que foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em caixa de isopor com gelo. Também foram coletadas amostras de solo compostas para determinação do pH em água, nitrogênio mineral (N-NH₄ e N-NO₃ + NO₂), e fósforo disponível extraível pelo método da resina de troca catiônica (TEDESCO et al., 1995). As análises biológicas e químicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC).

O processo de isolamento de *Azospirillum* spp. foi adaptado de acordo com a metodologia descrita por Videira et al. (2007). Raízes e colmos das plantas coletadas foram lavados em água para retirada de partículas de solo aderidas e utilizadas para o estudo da ocorrência de *Azospirillum* sp de colonização endofítica (Figura 3). Amostras de 10 g de raízes e colmos foram desinfetadas pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (1%) por

30 segundos, enxaguadas com água destilada e trituradas em 90 mL de solução de sacarose (4%) com o auxílio de um mixer. A solução resultante foi diluída sucessivamente até 10^{-7} utilizando solução de sacarose (4%) como diluente, e então 100 μL das diluições 10^{-2} a 10^{-7} foram inoculados em frascos de penicilina com capacidade para 10 mL, contendo 5 mL de meio semi-sólido. Foram utilizados os meios NFb para isolamento de *A. brasiliense* e *A. lipoferum*, e LGI para isolamento de *A. amazonense* (DÖBEREINER et al., 1995).

Tabela 4 - Localização das áreas de coleta de plantas de arroz irrigado em Santa Catarina.

ÁREA	LATITUDE	LONGITUDE	ALTITUDE (m)
Guaramirim 1	26° 24' 38.1" S	48° 57' 50.9" W	44
Guaramirim 2	26° 31' 07.8" S	48° 58' 52.3" W	37
Massaranduba	26° 38' 11.6" S	49° 00' 52.1" W	38
Rodeio 1	26° 57' 47.5" S	49° 20' 07.9" W	80
Rodeio 2	26° 57' 47.5" S	49° 20' 07.9" W	80
Rio do Sul	27° 10' 41.5" S	49° 34' 45.4" W	332
Agronômica	27° 15' 49.6" S	49° 43' 24.0" W	334
Pouso Redondo	27° 14' 49.1" S	50° 01' 23.9" W	358

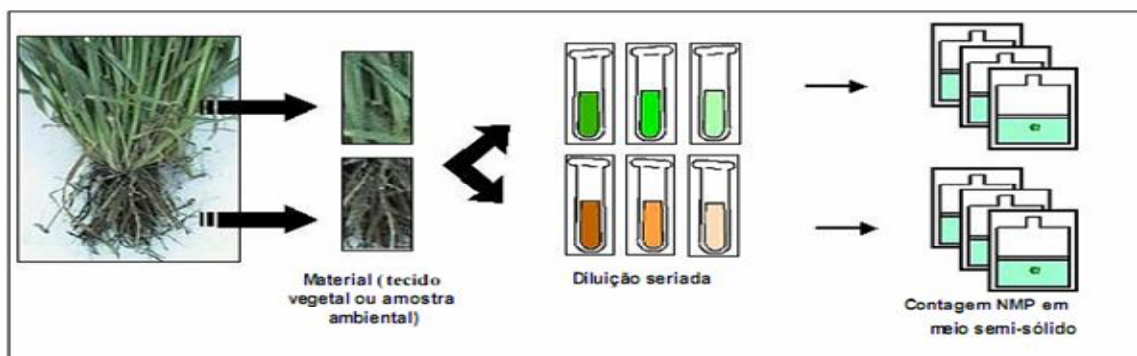


Figura 3 - Representação esquemática do processo de isolamento de *Azospirillum* spp. a partir de material vegetal (VIDEIRA et al., 2007).

Foram utilizadas cinco repetições de cada diluição inoculada nos frascos contendo meio semi-sólido, os quais foram incubados a 32 °C por quatro a sete dias em incubadora BOD. No sétimo dia de incubação foram realizadas as avaliações sendo considerados positivos os frascos que apresentaram a formação da película aerotóxica em forma de véu, característica do crescimento de bactérias do gênero em meio semi-sólido. O número de frascos positivos para cada diluição foi utilizado para a estimativa do número de células por grama de matéria fresca de colmos e raízes, utilizando o método do Número Mais Provável de Propágulos (NMP) seguindo a tabela de McCrady (DÖBEREINER et al., 1995).

Os resultados do estudo de ocorrência de *Azospirillum* spp. nas raízes e colmos de arroz irrigado foram transformados em $\log(x+1)$ para análise da similaridade entre as áreas utilizando análise de componentes principais (ACP). Considerando que populações de microrganismos podem ser afetadas por fatores abióticos como pH e disponibilidade de nutrientes, os atributos químicos dos solos de cada área também foram analisados através de ACP. O objetivo da ACP é representar os objetos de estudo e suas variáveis em um sistema de coordenadas em que, através de uma matriz de correlação, a máxima variância dos dados originais possa ser retratada e os resultados são ilustrados em *biplots* para que possam ser interpretados (RAMETTE, 2007). As análises de ACP foram conduzidas utilizando o programa computacional R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

3.4.2 Isolamento e caracterização morfológica de *Azospirillum* spp.

Os frascos que, no estudo de ocorrência, apresentaram a película em forma de véu típica do crescimento de diazotróficos microaerofílicos foram utilizados para isolamento de culturas puras. Uma alçada de cada frasco foi repicada em placas de Petri contendo os meios semi-específicos LGI e NFb sólidos e incubadas a 32 °C por três a cinco dias. Então as placas com crescimento foram inoculadas em meios LGI e NFb semi-sólidos e novamente incubadas por quatro dias para a formação de um novo véu. Os frascos que continuaram apresentando crescimento após esse período, tiveram suas colônias purificadas pela repicagem em placas de Petri contendo meio BDA por repetidas vezes, até que fossem formadas colônias puras e isoladas. Como o gênero *Azospirillum* é formado por bactérias gram-negativas, os isolados obtidos foram caracterizados bioquimicamente pelo teste de coloração Gram, seguindo o protocolo sugerido por Yano et al. (1991). Os isolados gram-positivos foram descartados da coleção.

As placas com isolados gram-negativos tiveram suas colônias transferidas para tubos de ensaio com tampa rosqueável (uma colônia por tubo) contendo meio BDA inclinado, em triplicatas, e incubados por três dias. Para estocagem, as culturas foram cobertas com meio batata (VIDEIRA et al., 2007) mais glicerol (50%), e então os tubos foram vedados e identificados com a sigla SC que acompanha o número do isolado, e armazenados em câmara seca a 4 °C.

Os isolados obtidos foram incluídos na Coleção de Bactérias Diazotróficas Promotoras de Crescimento do CAV/UEDESC, que está integrada à “Rede Centro-Sul para a manutenção, bioprospecção e caracterização da biodiversidade de coleção de culturas e de genes de

bactérias de importância agroindustrial: diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas”, sob coordenação da Embrapa Soja.

3.4.3 Caracterização fenotípica de isolados de *Azospirillum* spp.

Os isolados de *Azospirillum* spp. incluídos na coleção de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento do CAV/UEDESC foram inoculados em meio BDA sólido utilizando a técnica de esgotamento em placa e, após 7 dias de incubação a 32 °C, as colônias formadas foram avaliadas quanto às características morfológicas visualmente perceptíveis do bordo, elevação, diâmetro, coloração e consistência conforme metodologia adaptada de Nóbrega et al. (2004) (ANEXO A). As estirpes BR11080 - *A. lipoferum*, BR11001 - *A. brasilense* (TARRAND et al., 1978) e BR11140 - *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), cedidas pela Embrapa Agrobiologia, foram utilizadas como padrão para comparação dos resultados. Para cada uma das 27 características consideradas durante a avaliação foram atribuídos os números 0 ou 1, indicando ausência ou presença da característica, respectivamente. A similaridade dos isolados foi estimada pela análise de agrupamento utilizando o coeficiente da Coincidência Simples (*Simple Matching*) (SOCKAL & MICHENER, 1958) e os valores obtidos foram utilizados para construção de um dendograma, através do programa computacional R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Ocorrência de *Azospirillum* spp. em raízes e colmos de arroz irrigado em SC.

Observou-se a ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* spp. em raízes e colmos de arroz irrigado nas oito áreas estudadas (Tabela 5). Tanto o meio NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) quanto o meio LGI (*A. amazonense*) apresentaram número mais provável de propágulos da ordem de 10^8 células g^{-1} de matéria fresca de raízes e colmos. A densidade média de *A. lipoferum* e *A. brasilense* foi de $1,6 \times 10^8$ células g^{-1} de raízes e $1,42 \times 10^8$ células g^{-1} de colmos, enquanto a média populacional de *A. amazonense* foi de $1,76 \times 10^8$ células g^{-1} de raízes e $1,56 \times 10^8$ células g^{-1} de colmos. Segundo Baldani & Baldani (2005), bactérias do gênero *Azospirillum* e outras diazotróficas são encontradas colonizando gramíneas em populações que variam entre 10^4 a 10^7 células g^{-1} de matéria fresca.

Tabela 5 - Estimativa da ocorrência de bactérias do gênero *Azospirillum* em raízes e colmos de plantas de arroz irrigado coletadas em Santa Catarina, utilizando-se os meios de isolamento NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) e LGI (*A. amazonense*), pelo método NMP*. Média de cinco repetições.

ÁREA	RAIZ		COLMO	
	NFb	LGI	NFb	LGI
	-----n° de células g ⁻¹ de matéria fresca-----			
Guaramirim 1	1,5x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,21x10 ⁸	9,22x10 ⁷
Guaramirim 2	1,8x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,24x10 ⁸	1,8x10 ⁸
Massaranduba	1,57x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,62x10 ⁸	1,8x10 ⁸
Rodeio 1	1,57x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,51x10 ⁸	1,51x10 ⁸
Rodeio 2	1,57x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,51x10 ⁸	1,51x10 ⁸
Rio do Sul	1,77x10 ⁸	1,8x10 ⁸	9,78x10 ⁷	1,8x10 ⁸
Agronômica	1,57x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,51x10 ⁸	1,33x10 ⁸
Pouso Redondo	1,5x10 ⁸	1,51x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,78x10 ⁸
Média	1,6x10 ⁸	1,76x10 ⁸	1,42x10 ⁸	1,56x10 ⁸

* NMP = número mais provável de propágulos (DÖBEREINER et al., 1995)

As populações de *Azospirillum* em raízes de arroz irrigado variaram entre 1,5x10⁸ e 1,8x10⁸ células g⁻¹ de matéria fresca, no entanto, as densidades populacionais encontradas em colmos tiveram maior variação (9,22x10⁷ a 1,8x10⁸ células g⁻¹ de matéria fresca) (Tabela 5). O maior número de bactérias do gênero *Azospirillum* colonizando raízes possivelmente se deve à morfologia da própria planta, cujas raízes possuem aerênquimas que possibilitam a aeração da rizosfera em condições de inundação e a secreção de substâncias orgânicas. Essas características tornam as camadas mucilaginosas da epiderme e os espaços intercelulares do córtex um ambiente rico em substrato para o crescimento de bactérias diazotróficas microaerofílicas deste gênero (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

A análise multivariada das oito áreas de coleta considerando a ocorrência de *Azospirillum* spp. em raízes (RA) e colmos (CO) de arroz irrigado isolados de meio LGI (LGIRA e LGICO) e NFb (NFbRA e NFbCO), através da análise de componentes principais (ACP), mostrou que os dois primeiros componentes (Comp1 e Comp2) explicam 59% dos resultados, sendo 32% explicados por Comp1 (ANEXO B). Dentre as variáveis analisadas, as que mais contribuíram para a variação dos resultados foram NFbRA e LGICO. Através da ACP ilustrada na figura 4a, observou-se a formação de um grande grupo que incluiu as áreas Rodeio 1 (rodeio1), Rodeio 2 (rodeio2), Agronômica (agron), Massaranduba (massa) e Guaramirim 2 (guara2), onde foram encontradas populações semelhantes de *Azospirillum* em raízes e colmos, tanto em meio NFb (NFbRA e NFbCO) quanto em meio LGI (LGIRA e LGICO). A área de Rio do Sul (rsul) também foi similar a este grande grupo embora tenha

apresentado uma baixa população de bactérias isoladas de colmos em meio NFb ($9,78 \times 10^7$ células g^{-1} de matéria fresca) em relação às demais áreas. A área Guaramirim 1 (guara1) que apresentou médias populacionais mais baixas para NFbRA e LGICO não se agrupou a nenhuma área, assim como Pouso Redondo (pron) onde também foram observadas populações mais baixas colonizando raízes e colmos em meio NFb (NFbRA e NFbCO) e meio LGI (LGICO).

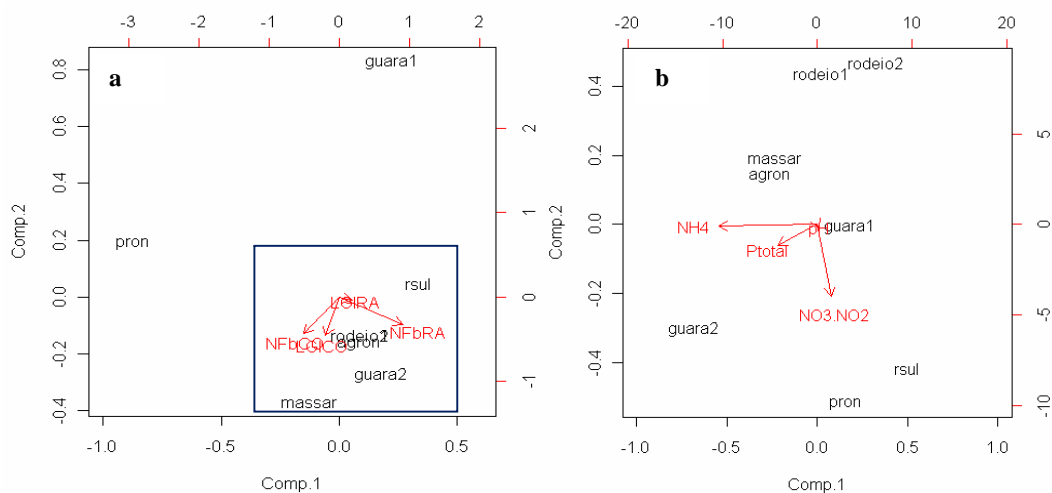


Figura 4 - Similaridade entre áreas de coleta de arroz irrigado (Guara1: Guaramirim 1, guara2: Guaramirim 2, massar: Massaranduba, rodeio1: Rodeio 1, rodeio2: Rodeio 2, rsul: Rio do Sul, agron: Agronômica, pron: Pouso Redondo) considerando a ocorrência de *Azospirillum* spp. em raízes (RA) e colmos (CO) isolados em meio NFb (NFbRA e NFbCO) e LGI (LGIRA e LGICO) (a), e os atributos químicos dos solos: pH, NH_4^+ (NH_4), $NO_3^- + NO_2^-$ ($NO_3.NO_2$) e P disponível (Ptotal) (b), estimada através da análise de componentes principais (ACP).

Com relação aos atributos químicos dos solos (pH, NH_4^+ (NH_4), $NO_3^- + NO_2^-$ ($NO_3.NO_2$) e P disponível (Ptotal)), a análise de componentes principais mostrou que juntos Comp1 (52%) e Comp2 (30%) explicam 82% dos resultados (ANEXO C). A análise dos atributos químicos dos solos das oito áreas em que foram coletadas amostras de plantas de arroz irrigado separou as áreas em dois grupos distintos e as variáveis NH_4 , $NO_3.NO_2$ e Ptotal contribuíram para esse agrupamento (Figura 4b). O primeiro grupo foi formado por Rodeio 1 e Rodeio 2, e o segundo grupo por Massaranduba e Agronômica, essas áreas se assemelharam quanto aos atributos pH, NH_4^+ e P disponível, e não apresentaram teores detectáveis de $NO_3^- + NO_2^-$. As demais áreas apresentaram valores variados em relação aos teores de NH_4^+ , $NO_3^- + NO_2^-$ e P disponível, e portanto não se agruparam (Tabela 6). O pH dos solos coletados esteve entre 4,2 (Rodeio 1) e 4,92 (Rio do Sul), dentro da faixa ácida para crescimento de bactérias se considerarmos que, em condições *in vitro*, o pH ótimo para

Azospirillum spp. está próximo à neutralidade (entre 6,0 e 6,8). No entanto, em solos tropicais tipicamente ácidos, a ocorrência dessas bactérias tem sido verificada em solos com pH abaixo de 4,5 sendo *A. amazonense* a espécie com maior adaptabilidade a ambientes ácidos (MAGALHÃES et al. 1983; SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Tabela 6 - Atributos químicos dos solos das áreas de coleta de plantas de arroz irrigado.

Área	pH (H ₂ O)	-----mg kg ⁻¹ -----		P disponível* mg dm ⁻³
		NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻ + NO ₂ ⁻	
Guaramirim 1	4,35	12,52	2,28	1,48
Guaramirim 2	4,33	23,90	2,28	6,04
Massaranduba	4,52	17,07	nd	5,34
Rodeio 1	4,24	14,79	nd	1,00
Rodeio 2	4,34	10,24	nd	0,78
Rio do Sul	4,92	7,97	4,55	1,57
Agronômica	4,48	17,07	nd	6,28
Pouso Redondo	4,34	12,52	4,55	3,18

*Avaliado pelo método da resina de troca de ânions (TEDESCO et al., 1995) nd= não detectado

Embora os solos das oito áreas em estudo apresentem propriedades químicas distintas, as altas densidades populacionais de *Azospirillum* spp. observadas em todas as áreas permitem concluir que a ocorrência dessas bactérias de colonização endofítica em raízes e colmos de arroz irrigado não foi influenciada pelo nível de fertilidade do solo. No entanto, vale salientar que embora não afetem sua ocorrência, esses fatores nutricionais podem ter efeito na atividade e diversidade desses microrganismos. Devido à sua diversidade genética e funcional, a atividade dessas bactérias pode variar em função das concentrações de P e N no solo que são elementos envolvidos nos processos de fixação biológica de nitrogênio e produção de hormônios de crescimento vegetal (DÖBEREINER, 1990; RADWAN et al., 2005), portanto é importante que os isolados obtidos a partir desse estudo sejam também avaliados quanto à sua atividade em termos de produção de fitohormônios e capacidade de FBN.

3.5.2 Isolamento e caracterização de *Azospirillum* spp.

Noventa e quatro (94) isolados foram obtidos ao final do processo de plaqueamento e purificação das bactérias isoladas de raízes e colmos de arroz irrigado. A coloração diferencial de Gram das células destes isolados demonstrou que 62 isolados eram gram-negativos (Figura 5a) e 32 isolados eram gram-positivos (Figura 5b). Os isolados gram-positivos foram descartados já que as bactérias do gênero *Azospirillum* são Gram negativas.

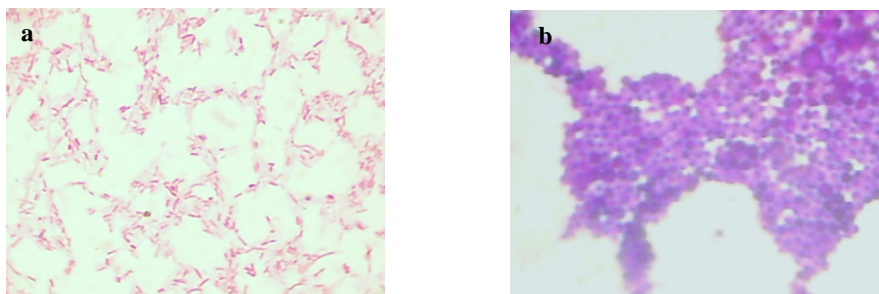


Figura 5 - Observação ao microscópio de bactérias gram-negativa (a) e gram-positiva (b).

Das 62 bactérias Gram negativas, 39 (62,9%) foram isoladas de meio LGI (*A. amazonense*) e as demais de meio NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*). Semelhante ao observado no estudo de ocorrência, as raízes desinfetadas permitiram a obtenção de um número mais alto de isolados em relação ao colmo, sendo que 59,7% foram oriundos das raízes (15 isolados em meio NFb e 22 isolados em meio LGI) (Figura 6). Os resultados encontrados nesse estudo se assemelham ao que foi relatado por Brasil (2006), em isolamento de bactérias diazotróficas que colonizavam raízes, colmos e folhas das cultivares de arroz irrigado IAC4440, CNA7553 e IR42, cultivadas em um argissolo na Embrapa Agrobiologia, que obteve um número mais alto de isolados de *Azospirillum* originados de raízes (19) em comparação com colmos (16), e observou que dos 56 isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Azospirillum*, 69% eram da espécie *A. amazonense*.

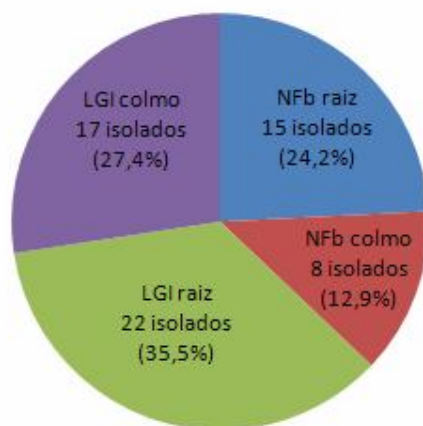


Figura 6 - Número e porcentagem de isolados de *Azospirillum* spp. obtidos de colmos e raízes de arroz irrigado, utilizando os meios de isolamento NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) e LGI (*A. amazonense*).

Considerando que várias bactérias associativas e de vida livre podem ser isoladas a partir de meios semi-sólidos livres de N (KIRCHOFF et al., 1996), o crescimento de isolados bacterianos nos meios semi-seletivos NFb e LGI não implica que todos os isolados obtidos nesse estudo sejam do gênero *Azospirillum*, portanto é importante que esses isolados também sejam caracterizados quanto às suas características fenotípicas, fisiológicas e genéticas para confirmação das espécies.

Em relação à área de coleta das plantas de arroz irrigado utilizadas para isolamento de *Azospirillum* spp., 77,4% dos isolados foram oriundos de plantas coletadas nas propriedades localizadas no Vale do Itajaí (Rodeio 1, Rodeio 2, Rio do Sul, Agronômica e Pouso Redondo) (Figura 7). As áreas de Rodeio 1 e Agronômica tiveram 19,3% e 20,9% do total de isolados, respectivamente. Embora, no estudo de ocorrência (Item 3.3.1), tenham sido detectadas altas populações de *Azospirillum* spp. colonizando raízes das plantas coletadas nas áreas do norte catarinense (Guaramirim 1, Guaramirim 2 e Massaranduba), nenhum isolado oriundo de raízes foi obtido ao final do processo de isolamento em meio NFb e somente Guaramirim 2 teve um (1) isolado de meio LGI.

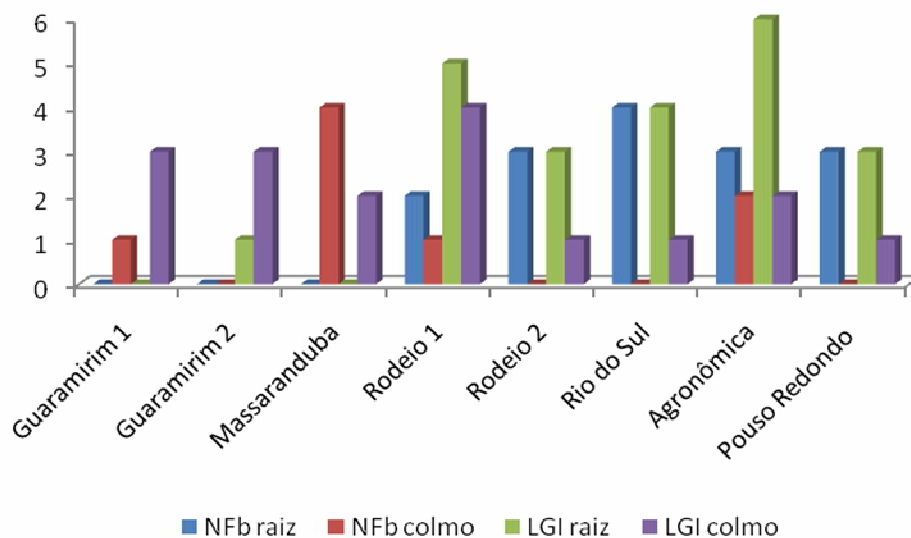


Figura 7 - Número de isolados de *Azospirillum* spp. obtidos de colmos e raízes de arroz irrigado, utilizando os meios de isolamento NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) e LGI (*A. amazonense*), considerando as áreas de coleta de plantas.

A relação completa dos isolados obtidos nesse estudo e sua descrição quanto à origem (raiz desinfestada ou colmo), área de coleta das plantas e meio de isolamento (NFb ou LGI) encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Origem, área de coleta de plantas de arroz irrigado e meio de isolamento de isolados de *Azospirillum* spp. anexados à Coleção de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento do CAV/UEDESC.(continua)

ISOLADO	ORIGEM	ÁREA DE COLETA	MEIO DE ISOLAMENTO
SC0003	Raiz desinfestada	Agronômica	NFb*
SC0004	Raiz desinfestada	Agronômica	LGI
SC0007	Colmo	Guaramirim 1	NFb
SC0008	Colmo	Agronômica	LGI
SC0009	Colmo	Massaranduba	LGI
SC0012	Raiz desinfestada	Rodeio 1	NFb
SC0013	Raiz desinfestada	Pouso Redondo 1	NFb
SC0014	Colmo	Rodeio 1	LGI
SC0015	Colmo	Rio do Sul	LGI
SC0016	Raiz desinfestada	Rio do Sul	NFb
SC0018	Colmo	Guaramirim 2	LGI
SC0019	Colmo	Guaramirim 1	LGI
SC0021	Colmo	Massaranduba	NFb
SC0022	Colmo	Rodeio 1	NFb
SC0027	Colmo	Rodeio 2	LGI
SC0028	Raiz desinfestada	Rodeio 2	NFb
SC0029	Raiz desinfestada	Rodeio 2	NFb
SC0030	Raiz desinfestada	Agronômica	LGI
SC0031	Colmo	Guaramirim 2	LGI
SC0032	Colmo	Guaramirim 1	LGI
SC0033	Colmo	Guaramirim 1	LGI
SC0036	Raiz desinfestada	Agronômica	NFb
SC0040	Raiz desinfestada	Pouso Redondo 1	NFb
SC0041	Raiz desinfestada	Pouso Redondo 1	NFb
SC0043	Colmo	Rodeio 1	LGI
SC0046	Colmo	Rodeio 1	LGI
SC0047	Colmo	Rodeio 1	LGI
SC0048	Raiz desinfestada	Agronômica	LGI
SC0049	Raiz desinfestada	Agronômica	LGI
SC0051	Raiz desinfestada	Rodeio 2	NFb
SC0054	Raiz desinfestada	Pouso Redondo 1	LGI
SC0056	Raiz desinfestada	Agronômica	LGI
SC0057	Colmo	Agronômica	NFb
SC0059	Raiz desinfestada	Pouso Redondo 1	LGI
SC0060	Raiz desinfestada	Rio do Sul	LGI
SC0061	Raiz desinfestada	Agronômica	NFb
SC0062	Raiz desinfestada	Rio do Sul	LGI
SC0063	Colmo	Massaranduba	LGI
SC0065	Raiz desinfestada	Rodeio 1	LGI
SC0066	Raiz desinfestada	Rodeio 1	LGI
SC0067	Raiz desinfestada	Rodeio 2	LGI
SC0068	Raiz desinfestada	Pouso Redondo 1	LGI
SC0070	Raiz desinfestada	Rodeio 1	LGI
SC0071	Colmo	Massaranduba	NFb
SC0072	Raiz desinfestada	Rodeio 2	LGI
SC0073	Raiz desinfestada	Rodeio 2	LGI
SC0074	Colmo	Agronômica	LGI
SC0077	Raiz desinfestada	Agronômica	LGI
SC0079	Raiz desinfestada	Pouso Redondo 1	LGI

Tabela 7 - Origem, área de coleta de plantas de arroz irrigado e meio de isolamento de isolados de *Azospirillum* spp. anexados à Coleção de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento do CAV/UDESC (conclusão).

ISOLADO	ORIGEM	ÁREA DE COLETA	MEIO DE ISOLAMENTO
SC0080	Raiz desinfestada	Rodeio 1	LGI
SC0081	Colmo	Pouso Redondo 1	LGI
SC0082	Colmo	Agronômica	NFb
SC0083	Raiz desinfestada	Rio do Sul	LGI
SC0084	Raiz desinfestada	Rodeio 1	LGI
SC0085	Raiz desinfestada	Rio do Sul	NFb
SC0086	Colmo	Massaranduba	NFb
SC0087	Raiz desinfestada	Rodeio 1	NFb
SC0088	Colmo	Guaramirim 2	LGI
SC0089	Colmo	Massaranduba	NFb
SC0092	Raiz desinfestada	Rio do Sul	NFb
SC0093	Raiz desinfestada	Rio do Sul	NFb
SC0094	Raiz desinfestada	Rio do Sul	LGI

*Meio NFb semi-seletivo a *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense*, e meio LGI semi-seletivo a *A. amazonense* (DÖBEREINER et al., 1995)

A caracterização fenotípica dos isolados de *Azospirillum* spp. descritos na Tabela 7 mostrou grande diversidade dos isolados quanto à morfologia das colônias. Dentre as 27 características avaliadas (ANEXO A), somente as características de bordo erodido e coloração rosa não foram observadas. A análise de similaridade dos isolados através do coeficiente de Coincidência Simples (Sokal & Michener, 1958) mostrou que a maioria dos isolados apresentam similaridade entre si e se agruparam às estirpes-padrão (Figura 8). O dendograma gerado pelos valores do coeficiente encontrados apresenta quatro grupos (GI, GII, GIII e GIV) com similaridade morfológica superior a 94% (coeficiente de similaridade maior que 0,6).

Os isolados SC0063 e SC0086 (GI) se agruparam ao padrão BR11140 (*A. amazonense*) (Figura 8). Ambos os isolados são oriundos de colmos e da área de coleta Massaranduba, no entanto apenas SC0063, cuja similaridade com BR11140 esteve entre 96% e 97%, foi isolado em meio LGI específico para a espécie *A. amazonense*. Os isolados do grupo GII não se relacionaram a qualquer estirpe padrão, no entanto todos foram isolados de meio LGI e SC0019, SC0032 e SC0033 foram obtidos de colmos de plantas coletadas em Guaramirim 1.

Os dois maiores grupos formados (GIII e GIV) se agruparam à estirpe BR11080 (*A. lipoferum*) e BR11001 (*A. brasilense*) respectivamente, ambos com similaridade morfológica maior que 95% (Figura 8). As características dos isolados de GIII e GIV variam em relação à origem, área de coleta e meio de isolamento, no entanto observou-se que 57% dos isolados

originados de raízes desinfestadas estão dentro de GIII e 67% daqueles originados de colmos fazem parte de GIV.

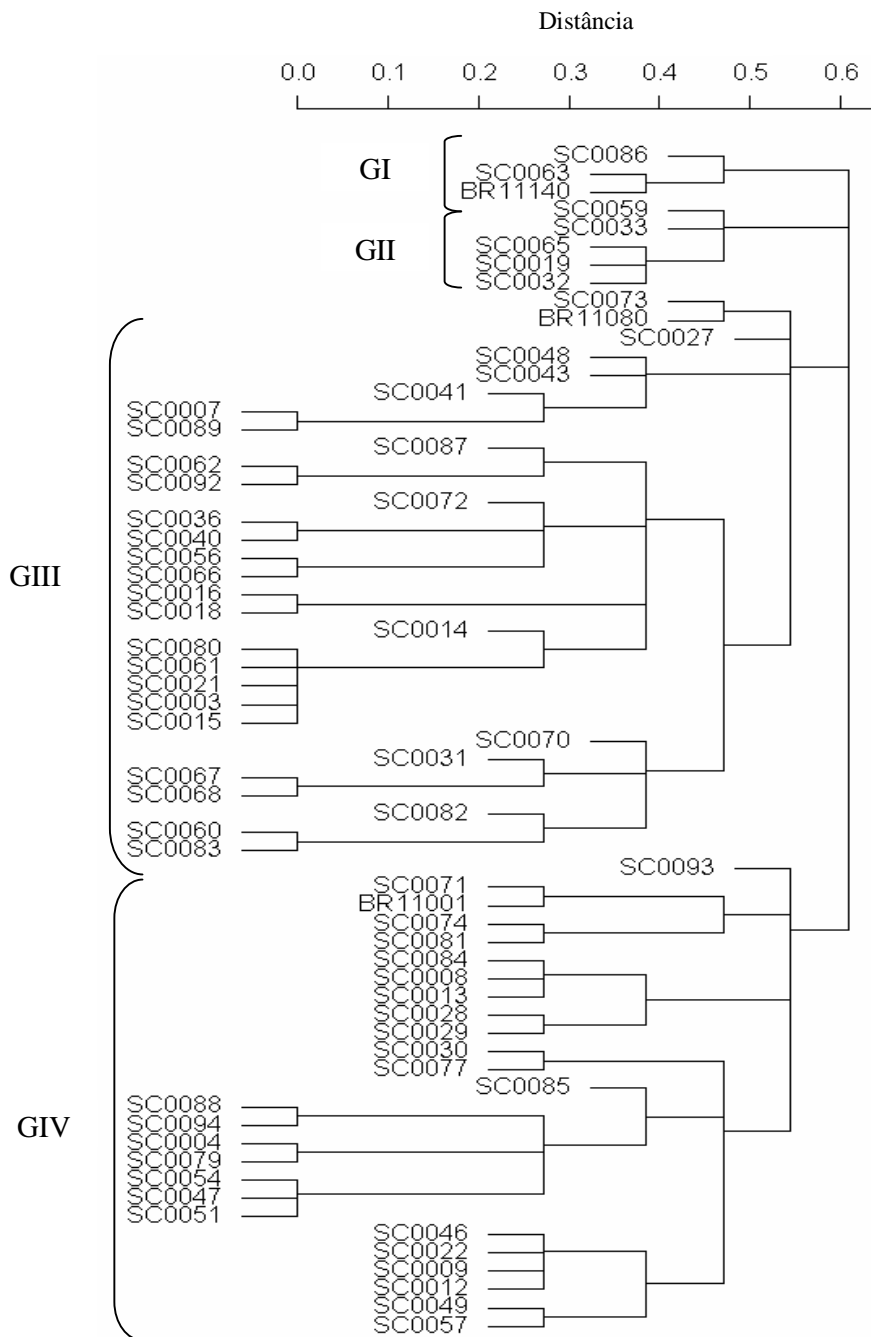


Figura 8 - Distância entre isolados bacterianos do gênero *Azospirillum* spp. oriundos de raízes e colmos de arroz irrigado, avaliada pelo coeficiente de Coincidência Simples (SOCKAL & MICHENER, 1958).

Durante a caracterização morfológica, o isolado SC0027, agrupado em GIII e isolado em meio NFb a partir de colmos de plantas coletadas na área Rodeio 2, apresentou uma

característica peculiar que não foi observada para os demais, pois em meio de cultura BDA as colônias produziram pigmento amarelo que alterou a coloração do meio levantando a hipótese de que SC0027 possa produzir algum metabólito secundário.

A grande diversidade fenotípica de isolados de *Azospirillum* na cultura do arroz irrigado no estado de Santa Catarina e sua alta similaridade tornam necessário que estes isolados também sejam analisados quanto a sua diversidade fisiológica e genética. Embora as características fenotípicas sejam importantes para o reconhecimento de alguns gêneros e espécies, individualmente elas não fornecem informações precisas para determinação de espécies de bactérias e, portanto precisam estar associadas a outras caracterizações para fins de taxonomia e de conhecimento do potencial biotecnológico desses isolados para utilização na agricultura.

3.6 CONCLUSÕES

Bactérias do gênero *Azospirillum* ocorrem em altas densidades populacionais em regiões produtoras de arroz irrigado no estado de Santa Catarina e colonizam endofiticamente tanto raízes quanto colmos.

A ocorrência de *Azospirillum* spp. em raízes e colmos de arroz irrigado não foi afetada pelos atributos químicos dos solos das áreas de coleta das plantas.

A maioria dos isolados obtidos (62,9%) foram isolados em meio LGI para isolamento de *A. amazonense* e 59,7% são oriundos de raízes desinfestadas.

Os isolados de *Azospirillum* spp. tiveram similaridade fenotípica superior a 94% e se agruparam aos padrões BR11140 (*A. amazonense*), BR11080 (*A. lipoferum*) e BR11001 (*A. brasilense*).

Os isolados utilizados nesse estudo devem ser caracterizados fisiologicamente e geneticamente para fins de taxonomia e conhecimento do seu potencial biotecnológico.

4 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Azospirillum* spp. ORIUNDOS DE PLANTAS DE ARROZ IRRIGADO

4.1 RESUMO

O gênero *Azospirillum* envolve espécies de bactérias endofíticas facultativas com alto grau de diversidade genética e fisiológica que podem atuar como promotoras de crescimento vegetal na cultura do arroz através da biodisponibilização de nutrientes e produção de fitohormônios. O objetivo deste trabalho foi caracterizar 25 isolados de *Azospirillum* spp. oriundos de raízes e colmos de arroz irrigado quanto a sua diversidade genética e fisiológica. Os isolados foram caracterizados geneticamente através da amplificação do DNA por rep-PCR utilizando o primer BOX A1R e sua similaridade estimada através do coeficiente de Jaccard e do algoritmo UPGMA. A caracterização fisiológica envolveu estudos *in vitro* da capacidade de produção de ácido indol-acético (AIA), fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos pelos isolados. A amplificação do DNA por rep-PCR indicou que os isolados tiveram similaridade genética superior a 55%. A maioria dos isolados (64%) produziram AIA em meio de cultura e os isolados mais eficientes foram SC0049, SC0029, SC0040 e SC0014 que produziram quantidades superiores a 83 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$. Treze isolados apresentaram capacidade de fixação biológica de N e os valores de N total em meio de cultura variaram entre 5,18 e 22,8 $\mu\text{g N mL}^{-1}$. Somente quatro isolados foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro*. Dos 25 isolados avaliados, 84% apresentaram potencial promotor de crescimento em pelo menos uma característica fisiológica avaliada indicando alta diversidade fisiológica entre os isolados.

Palavras-chave: Rep-PCR. Promoção de crescimento vegetal. Ácido indol acético.

4.2 ABSTRACT

Azospirillum spp. are facultative endophytic bacteria with high degree of genetic and physiologic diversity that can act as plant growth promotion bacteria in the rice culture by

enhancing nutrient availability and producing phytohormones. The aim of this work was to characterize 25 strains of *Azospirillum* spp. isolated from roots and stems of lowland rice plants considering their physiological and genetic diversity. The strains were characterized genetically by rep-PCR DNA amplification using the primer BOXA1R and their similarity was estimated using Jaccard coefficient and the UPGMA algorithm. Physiological characterization consisted of studying the *in vitro* ability of indol-acetic acid (IAA) production, biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by the strains. DNA amplification by rep-PCR showed a genetic similarity between the strains superior to 55%. Most of the strains (64%) were able to produce IAA in culture broth and the strains SC0049, SC0029, SC0040 and SC0014 were the most efficient producing more than 83 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$. Thirteen strains showed nitrogen fixation ability and N total content in culture broth varied from 5.18 to 22.8 $\mu\text{g N mL}^{-1}$. Only four strains could solubilize calcium phosphate. Eighty four percent of the 25 strains showed plant growth promotion ability in at least one of the physiological characteristics evaluated indicating high diversity between the strains.

Keywords: rep-PCR. Plant growth promotion. Indol-acetic acid.

4.3 INTRODUÇÃO

O gênero *Azospirillum* é formado por bactérias heterotróficas que podem se associar e colonizar endofiticamente várias espécies de gramíneas. No Brasil as espécies de maior ocorrência na cultura do arroz e mais estudadas atualmente são *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense* (BALDANI & BALDANI, 2005).

A identificação de espécies do gênero *Azospirillum* somente foi possível a partir da utilização de técnicas acuradas de biologia molecular que permitem a extração do DNA e do RNA dessas bactérias, e a análise e seqüenciamento das informações presentes em seu genoma. Essas informações aliadas aos resultados de estudos de caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica, têm possibilitado a taxonomia e a avaliação da biodiversidade dessas bactérias (HOLGUIN et al. 1999; ROSADO et al., 1997; SCHMID & HARTMANN, 2007).

Várias ferramentas moleculares podem ser utilizadas para análise da diversidade genética de *Azospirillum* spp e identificação de espécies do gênero. Aquelas que envolvem o DNA e o seqüenciamento da região 16S do RNA ribossômico, ambas em conjunto com a reação de polimerização em cadeia (PCR), têm sido as mais adotadas (GUIMARÃES, & SÁ, 2002; REIS JÚNIOR et al., 2002; ROSADO et al., 1997). No entanto, para o estudo da

diversidade dessas bactérias existe também a técnica de rep-PCR (*repetitive extragenic palindromic* PCR), que se baseia na utilização de *primers* que amplificam seqüências repetitivas e conservadas do DNA bacteriano, e que tem sido utilizada com sucesso para o estudo de outros diazotróficos, principalmente simbioses do gênero *Rhizobium* (REIS JÚNIOR et al., 2002; ROSADO et al., 1997; STOCCO et al., 2008).

Além da variabilidade genética presente entre as espécies do gênero *Azospirillum* e até mesmo entre estirpes dentro de uma mesma espécie, uma ampla diversidade fisiológica pode ser encontrada. Alguns isolados são capazes de promover o crescimento de plantas através da biodisponibilização de nutrientes pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) e solubilização de fosfatos, e da produção de fitohormônios, características que tornam as bactérias do gênero *Azospirillum* visadas como potenciais biofertilizantes e bioestimulantes para utilização na agricultura (CHOUDHURY & KENNEDY, 2004; LADHA & REDDY, 2003; SESHADRY et al., 2000).

A capacidade de FBN por *Azospirillum* varia em função do isolado e até mesmo de sua origem, sendo que em testes *in vitro* podem ser encontrados isolados com capacidade de fixação de N assim como isolados não fixadores (HAN & NEW, 1998; KUSS et al., 2007). Rodrigues et al. (2008) avaliaram a atividade fixadora de N₂ por isolados de *A. amazonense* através da técnica de redução do acetileno e de acordo com os resultados obtidos agruparam os isolados como estirpes de baixo (até 48,4 nmol C₂H₄ mg protein⁻¹ h⁻¹), médio (57 a 123,9 nmol C₂H₄ mg protein⁻¹ h⁻¹) e alto (maior que 155,7 nmol C₂H₄ mg protein⁻¹ h⁻¹) potencial de FBN. A mesma variação de resultados pode ser observada em relação à produção de hormônios de crescimento vegetal, principalmente auxinas (AIA), e também ao potencial de solubilização de fosfatos por *Azospirillum* spp. Boro et al. (2004) estudando a produção de AIA por *Azospirillum* da rizosfera de plantas de arroz, observaram isolados que produziram de 2,0 a 10,5 ppm de AIA. El-Kommy (2004) avaliou a eficiência de solubilização de fosfato de cálcio por *A. brasilense* e *A. lipoferum* e somente os isolados de *A. lipoferum* apresentaram atividade solubilizadora.

Devido ao seu metabolismo microaerófilo e aos benefícios que podem proporcionar, as espécies do gênero *Azospirillum* são foco de pesquisa para futuras aplicações na cultura do arroz irrigado que oferece condições ideais de concentração e difusão O₂ para o crescimento, desenvolvimento e atividade desses organismos (VAHL & SOUZA, 2004). No entanto, para que seja possível selecionar isolados de *Azospirillum* spp. com potencial biotecnológico satisfatório, os estudos de caracterização genética e fisiológica tornam-se extremamente importantes. Por isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade genética de 25

isolados de *Azospirillum* spp. oriundos de raízes e colmos de arroz irrigado do Estado de Santa Catarina e caracterizá-los quanto ao seu potencial de fixação biológica de nitrogênio, produção de auxinas e solubilização de fosfatos.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Isolados utilizados nos experimentos

Para os testes que envolveram o estudo da diversidade genética e fisiológica de *Azospirillum* spp. foram selecionados 25 isolados oriundos de plantas de arroz irrigado coletadas em Santa Catarina e que fazem parte da Coleção de bactérias diazotróficas do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC), em Lages. A descrição dos isolados quanto à sua origem, área de coleta e meio de isolamento é apresentada na tabela 8.

4.4.2 Caracterização genética de isolados de *Azospirillum*

Os procedimentos que envolveram o estudo da diversidade genética dos 25 isolados de *Azospirillum* spp. (Tabela 8) foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja – CNPSo, em Londrina – PR, durante os meses de agosto e setembro de 2008.

4.4.2.1 Extração do DNA

Os isolados armazenados em tubos de ensaio foram repicados em frascos contendo 10 mL de meio Dygs líquido (VIDEIRA et al., 2007) e incubados a 32 °C sob agitação a 100 rpm por 72 horas até atingir a fase exponencial de crescimento. Após incubação, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado três vezes com solução salina (NaCl 0,85%) e após a terceira lavagem o precipitado foi dissolvido em 1 mL de solução salina e a concentração ajustada para 10^9 células.mL⁻¹. Então 1500 µL da solução bacteriana foram transferidos para tubos tipo eppendorf e centrifugados a temperatura ambiente por 5 minutos, a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 400 µL de TE 50/20, 50 µL de SDS 10%, 10 µL de proteinase K (10 mg.mL⁻¹), 10 µL de lisozima (5 mg.mL⁻¹) e 2 µL de RNase (10 mg.mL⁻¹) ao precipitado. O material foi incubado em banho-maria a aproximadamente 37 °C

até clarear. Posteriormente, a viscosidade foi tirada cuidadosamente e foram acrescentados 30 μL NaCl 5M para concentração final de 250 mM, 70 μL AcONa 3M para concentração final de 300 mM e 28 μL de água Milli Q. O material foi homogeneizado por inversão e armazenado na geladeira por 1 hora.

Tabela 8 - Descrição de isolados de *Azospirillum* spp. oriundos de raízes e colmos de arroz irrigado coletado em SC utilizados para estudos de caracterização genética e fisiológica.

ISOLADO	ORIGEM	ÁREA DE COLETA	MEIO DE ISOLAMENTO
SC0003	Raiz	Agronômica	NFb*
SC0004	Raiz	Agronômica	LGI
SC0009	Colmo	Massaranduba	LGI
SC0014	Colmo	Rodeio 1	LGI
SC0015	Colmo	Rio do Sul	LGI
SC0018	Colmo	Guaramirim 2	LGI
SC0019	Colmo	Guaramirim 1	LGI
SC0027	Colmo	Rodeio 2	LGI
SC0029	Raiz	Rodeio 2	NFb
SC0032	Colmo	Guaramirim 1	LGI
SC0040	Raiz	Pouso Redondo 1	NFb
SC0046	Colmo	Rodeio 1	LGI
SC0049	Raiz	Agronômica	LGI
SC0051	Raiz	Rodeio 2	NFb
SC0056	Raiz	Agronômica	LGI
SC0057	Colmo	Agronômica	NFb
SC0059	Raiz	Pouso Redondo 1	LGI
SC0061	Raiz	Agronômica	NFb
SC0065	Raiz	Rodeio 1	LGI
SC0066	Raiz	Rodeio 1	LGI
SC0068	Raiz	Pouso Redondo 1	LGI
SC0081	Colmo	Pouso Redondo 1	LGI
SC0083	Raiz	Rio do Sul	LGI
SC0084	Raiz	Rodeio 1	LGI
SC0085	Raiz	Rio do Sul	NFb

*Meio NFb semi-seletivo a *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense*, e meio LGI semi-seletivo a *A. amazonense* (DÖBEREINER et al., 1995)

Após o armazenamento em geladeira, os tubos eppendorf foram centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm e uma alíquota de 300 μL foi retirada do sobrenadante e transferida para outro eppendorf ao qual foram adicionados 600 μL de etanol 95% gelado. Os tubos foram homogeneizados lentamente por inversão e deixados no freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma noite. No

dia seguinte os tubos foram centrifugados a temperatura ambiente (15 minutos a 12000 rpm), o etanol descartado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado para retirada dos sais. Procedeu-se mais uma centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm, então o etanol foi descartado e os tubos deixados secar em estufa (15 minutos a 37 °C). O DNA foi ressuscitado em 50 μL de TE 10/1 e quantificado mini-gel de agarose de 10 x 11 cm a 1,0%, por 30 minutos a 70 V. A concentração foi verificada após a coloração do gel com brometo de etídio e visualização em transluminador TFX-35-M de emissão de luz ultravioleta de comprimento de onda curta. Para comparação das bandas foi utilizado o padrão LambdaTM (InvitrogenTM) (50 ng μL^{-1}). A concentração do DNA de cada isolado foi ajustada para 50 ng μL^{-1} , utilizando água Milli Q como diluente quando necessário.

4.4.2.2 Amplificação do DNA de isolados de *Azospirillum* por rep-PCR utilizando o primer BOX AIR

Os DNAs extraídos foram amplificados por rep-PCR com o uso do primer BOX AIR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (54 pb). Para a reação foram utilizados 5,0 μL de dNTPs (1,5 mM), 2,5 μL de tampão 10X, 1,5 μL de MgCl_2 (50 mM), 1,0 μL do primer (50 pmol μL^{-1}), 0,2 μL de Taq polimerase (5 U μL^{-1}), 1 μL de DNA (50 ng μL^{-1}), e 13,8 μL de água Milli Q esterilizada para um volume final de 25 μL . Os ciclos de amplificação foram: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C (7 min); 30 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 53°C) e extensão (8 min a 65°C); 1 ciclo de extensão final a 65°C (16 min) e manutenção a 4°C. Após a reação de amplificação, os produtos foram transferidos para microplacas, homogeneizados com 5 μL de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose) e armazenados em congelador até o dia seguinte. Então o volume total do produto de amplificação (30 μL) foi aplicado em gel de agarose 20 X 25 cm (1,5%). Nas extremidades e no centro do gel, foram aplicados 5 μL do padrão de peso molecular de 1 kb plus DNA LadderTM (InvitrogenTM). O gel foi submetido à eletroforese horizontal por 7 horas a 120 V e posteriormente corado com brometo de etídio, observado em um transluminador TFX-35-M com lâmpada UV de comprimento de onda curto, e fotografado em uma câmera Kodak Digital Science 120.

Os perfis de BOX obtidos foram analisados com o uso do software Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica versão 5.1) e a similaridade estimada através de análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*) e o coeficiente de Jaccard com tolerância de 5%.

4.4.3 Caracterização fisiológica de isolados do gênero *Azospirillum* spp.

Os isolados descritos na tabela 8 e as estirpes-padrão BR11080 (*A. lipoferum*), BR11001 (*A. brasilense*) (TARRAND et al., 1978) e BR11140 (*A. amazonense*) (MAGALHÃES et al., 1983), cedidas pela Embrapa Agrobiologia, foram avaliados quanto a sua diversidade fisiológica considerando a capacidade de produção de auxinas, fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos. Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC).

4.4.3.1 Preparo do pré-inóculo

Os três ensaios partiram de um pré-inóculo de cada isolado. Para obtenção do pré-inóculo, as bactérias foram inoculadas em frascos de vidro contendo 20 mL de meio Dygs (pH 6,8) (VIDEIRA et al., 2007) e incubados em agitador orbital até a fase exponencial de crescimento (48 h, 32 °C, 45 rpm). As suspensões bacterianas foram transferidas para tubos tipo “Falcon” com capacidade para 50 mL e centrifugadas (10000 rpm, 15 min, 4 °C). Então o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas em 5 mL de solução salina (NaCl 0,85%). O número de células por mL de solução foi estimado em Câmara de Neubauer melhorada (Brand[®]) (0,0025 mm² e 0,100 mm de profundidade) e a concentração da suspensão bacteriana ajustada para 10⁸ células mL⁻¹ acrescentando solução salina como diluente quando necessário.

4.4.3.2 Avaliação da produção de ácido indol acético (AIA) *in vitro*

Para a avaliação da capacidade de produção de AIA pelos isolados, estabeleceu-se ensaio *in vitro* seguindo a metodologia proposta por Asghar et al. (2002) modificada. Alíquotas de 500 µL do pré-inóculo (10⁸ células mL⁻¹), foram inoculadas em frascos contendo 10 mL de meio Dygs acrescido de 100 µg mL⁻¹ de L-triptofano (Sigma[®]). Os frascos foram incubados no escuro por 48 h a 30 °C em agitação (45 rpm). Após o tempo de incubação, as culturas foram homogeneizadas, transferidas para tubos tipo Falcon e centrifugadas (12000 rpm, 15 min, 4 °C). Então, alíquotas de 3 mL do sobrenadante foram colocadas em potes pretos de filme fotográfico (três repetições por isolado), nos quais foram acrescentados 2 mL

do reagente de Salkowski (1 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M em 50 mL de HClO_4 35%) (GORDON & WERBER, 1951). Os potes foram tampados e as soluções deixadas em reação por 30 minutos. A presença de AIA na solução é observada pela mudança de coloração da solução que se torna rosa mais intensa quanto maior a quantidade de auxinas presente. A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro UV-visível com comprimento de onda de 530 nm. A concentração de AIA nas soluções foi estimada utilizando curva preparada com meio Dygs estéril e não inoculado, e quantidades conhecidas de AIA sintético (Sigma[®]) (0, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) a partir de uma solução padrão de 300 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$.

4.4.3.3 Avaliação da capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) *in vitro*

O ensaio de capacidade de FBN *in vitro* seguiu metodologia descrita por Soares et al. (2006). Alíquotas de 500 μL do pré-inóculo (10^8 células. mL^{-1}) de cada isolado e das estirpes-padrão foram inoculadas em frascos de penicilina contendo meio NFb ou LGI semi-sólido (3 repetições por isolado), de acordo com o meio de isolamento original de cada isolado (Tabela 8), e incubados a 32° C por sete dias. Como controle foram utilizados frascos com meio NFb e LGI sem inoculação. O método segue o princípio de que o meio de cultura em que as bactérias foram incubadas é livre de nitrogênio e, portanto, o N presente no meio provém da sua fixação. Os frascos com crescimento foram armazenados em congelador até o momento da análise e então as células foram rompidas através do aquecimento dos frascos em forno microondas (1 minuto por frasco). A solução resultante do aquecimento foi transferida para tubos de digestão. Para determinação do teor de nitrogênio total da solução, procedeu-se a digestão sulfúrica, seguida de destilação com hidróxido de sódio (NaOH) 10 M pelo método semi-micro Kjeldhal e titulação das amostras com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,0025 M (TEDESCO et al., 1995). Os resultados foram apresentados na forma de N total fixado mL^{-1} de meio de cultura.

4.4.3.4 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio *in vitro*

Neste último ensaio, o potencial dos isolados de *Azospirillum* spp. em solubilizar fosfatos foi avaliado em placas de Petri. As placas foram preparadas com meio GL (glicose, 10 g; extrato de levedura, 2g; ágar-ágar, 15 g L^{-1}) ao qual foram adicionados 100 mL de CaCl_2 (10%) e 50 mL de K_2HPO_4 (10%) L^{-1} (preparados e esterilizados separadamente), para formação de fosfato de cálcio (CaHPO_4 , 10%) deixando o meio com coloração opaca

(SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). Então, alíquotas de 20 µL do pré-inóculo (10^8 células mL⁻¹) foram transferidas para as placas de Petri. Foram feitas quatro repetições por placa. Após a absorção da solução pelo meio de cultura, as placas foram invertidas e incubadas, no escuro, a 32 °C por sete dias. Ao final do tempo de incubação, os isolados foram avaliados qualitativamente como positivos ou negativos quanto à formação do halo de solubilização transparente ao redor das colônias. Os isolados positivos tiveram a eficiência de solubilização (ES) calculada pela fórmula proposta por Nguyen et al. (1992):

$$ES = \frac{\text{diâmetro de solubilização (mm)} \times 100}{\text{diâmetro da colônia (mm)}}$$

4.4.3.5 Análise estatística dos dados

Os dados de produção de auxinas, fixação biológica de nitrogênio e eficiência de solubilização de fosfatos foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas foram comparadas através do teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software computacional estatístico SAS[®] (Statistical Analysis System) (SAS INSTITUTE INC[®], 2003).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Diversidade genética de isolados de *Azospirillum* spp.

A análise de agrupamento dos produtos de amplificação por rep-PCR utilizando o *primer* BOX A1R agrupou os 25 isolados de *Azospirillum* spp. oriundos de raízes e colmos de arroz irrigado, a um nível de 68% de similaridade (Figura 9), com exceção do isolado SC0068 que não se agrupou a nenhum outro e sua similaridade em relação aos demais grupos foi de 55%.

Considerando um nível de similaridade igual a 78% pode-se observar a formação de três grupos (GI, GII e GIII). Os isolados dos grupos GI, GII e GIII tiveram similaridade igual a 78%, 80% e 83%, respectivamente. GI se agrupou a GII com 76% de similaridade. O isolado SC0046 agrupou-se a GI e GII ao nível de similaridade próximo a 74%. O grupo GIII se agrupou a GI, GII e SC0046 com 68% de similaridade.

Os isolados SC0049 e SC0003 (GI) apresentaram perfis idênticos. O mesmo foi observado para SC0040 e SC0029 (GII). Quando essa similaridade é relacionada à origem, local de coleta das plantas de arroz irrigado e meio de isolamento, observa-se que SC0049 e

SC0003 são originados de raízes desinfetadas e de mesma área de coleta (Agronômica), e SC0040 e SC0029 também são oriundos de raízes desinfetadas e ambos foram isolados em meio NFb.

A amplificação do DNA por rep-PCR permitiu observar que existe grande variabilidade genética entre os isolados, já que dos 25 isolados analisados foram gerados 23 perfis diferentes, portanto é importante que essas bactérias continuem sendo caracterizadas e que o gene ribossomal 16S e outros genes “housekeeping” sejam seqüenciados para fins de confirmação de espécie.

4.5.2 Diversidade fisiológica de isolados de *Azospirillum* spp.

Os resultados dos ensaios *in vitro* que objetivaram avaliar a capacidade de produção de auxinas (AIA), de fixação biológica de nitrogênio e de solubilização de fosfato de isolados de *Azospirillum* spp. oriundos de plantas de arroz irrigado coletadas em Santa Catarina apresentaram grande variabilidade (Tabela 9). Os quadros de análise de variância de cada experimento são apresentados no ANEXO D.

A maioria dos isolados testados (64%) e os padrões BR11001 (*A. brasilense*) e BR1140 (*A. amazonense*) foram capazes de produzir AIA em meio de cultura suplementado com 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de L-triptofano (Tabela 9). Os valores de AIA detectados em meio de cultura variaram entre 5,67 e 119,72 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$ e de acordo com esses valores os isolados foram agrupados como de baixa (até 23,11 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$), média (de 33,4 a 65,48 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) e alta (acima de 83,09 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) capacidade de produção de AIA. Dentre os isolados mais eficientes na biossíntese de AIA na presença de triptofano, SC0049, SC0029, SC0040, SC0014 e SC0085 se destacaram como isolados de alta capacidade de produção de AIA. Os padrões BR11001 (*A. brasilense*) e BR1140 (*A. amazonense*) se agruparam entre os isolados de média (40,11 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) e baixa capacidade (13,82 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) de síntese de AIA em meio de cultura, respectivamente. O padrão BR11080 (*A. lipoferum*) não foi capaz de sintetizar AIA.

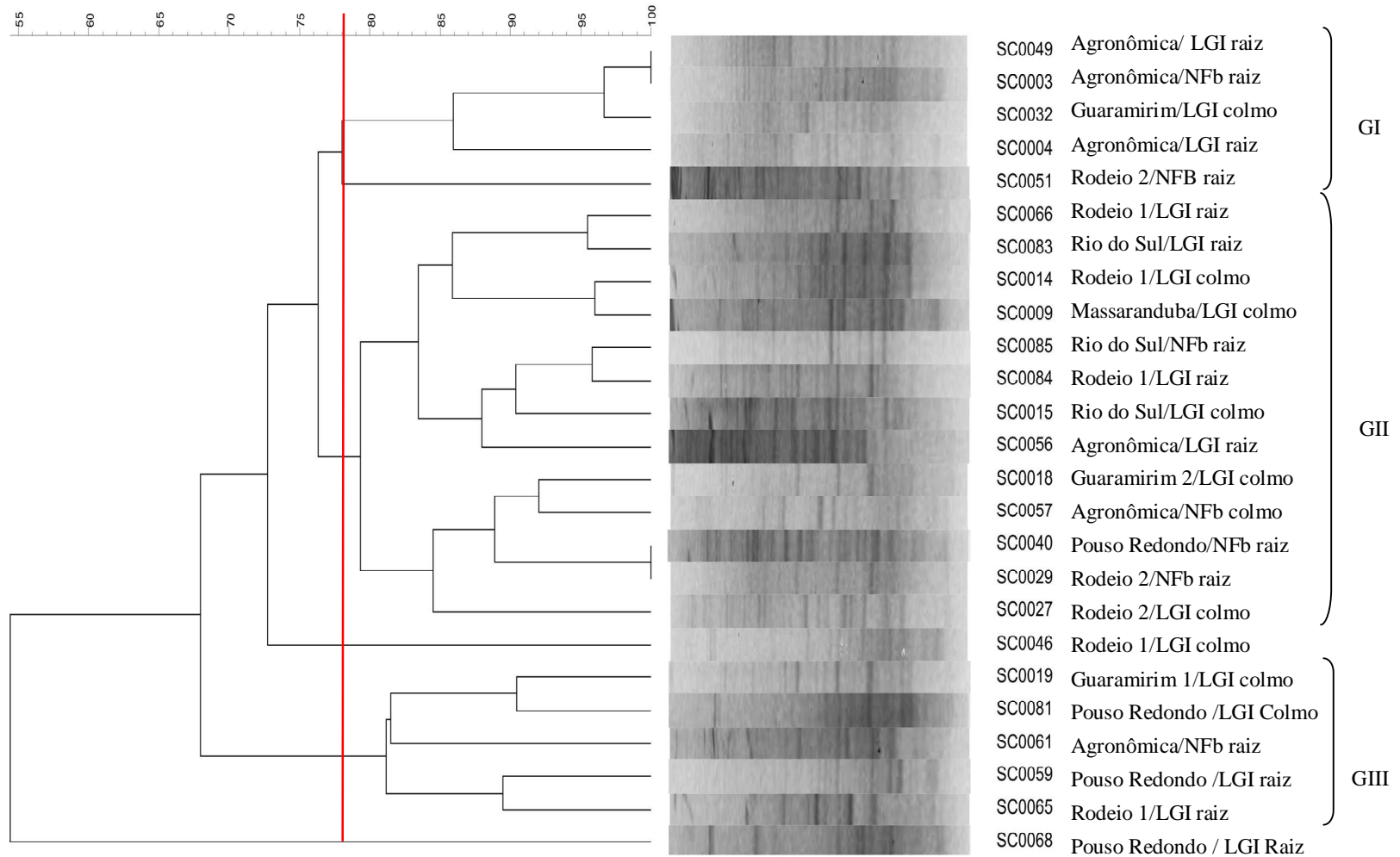


Figura 9 - Similaridade genética dos produtos de amplificação por rep-PCR (*primer* BOX A1R) de isolados de *Azospirillum* spp. estimada através do coeficiente de Jaccard e do algoritmo UPGMA.

Segundo Lambrecht et al. (2000), o gênero *Azospirillum* possui três rotas metabólicas de produção de AIA das quais duas são dependentes da presença de triptofano. Radwan et al. (2004) observaram que o aumento da concentração de triptofano no meio gera uma resposta linear na capacidade de produção de compostos indólicos por *Azospirillum*, portanto a adição desse precursor no meio de cultura pode ter estimulado a biossíntese de AIA pelos isolados testados neste ensaio.

Kuss et al. (2007) avaliaram a produção de AIA por *Azospirillum* spp. pela rota metabólica independente de triptofano e obtiveram valores menores que $5,5 \mu\text{g AIA mL}^{-1}$, no entanto, não observaram produção de AIA por BR11080. De acordo com Hartmann et al. (1983), a atividade de *A. lipoferum* é mais sensível à presença de triptofano no meio, o que pode explicar o fato de BR11080 não ter sido capaz de produzir AIA nas condições experimentais testadas neste ensaio.

Treze isolados (52%) apresentaram capacidade de FBN estimada pelos teores de N total fixado em meio NFb e LGI semi-sólidos, livres de N, sob condições microaerófilas (Tabela 9). Os valores de N total fixado *in vitro* variaram entre $5,18$ e $22,8 \mu\text{g N mL}^{-1}$ e assim como no estudo de produção de AIA, os isolados foram agrupados de acordo com seu potencial de fixação de N em meio de cultura. Os isolados agrupados como de baixo potencial de FBN fixaram até $8,64 \mu\text{g N mL}^{-1}$, os de médio potencial de FBN fixaram entre 10 e $18,66 \mu\text{g N mL}^{-1}$ e os isolados considerados com alto potencial de FBN fixaram valores de N total acima de $21,26 \mu\text{g N mL}^{-1}$ de meio de cultura.

Os isolados SC0059 ($22,81 \mu\text{g N mL}^{-1}$), SC0057 ($22,45 \mu\text{g N mL}^{-1}$) e SC0014 ($21,26 \mu\text{g N mL}^{-1}$) apresentaram alta capacidade de fixação de N total em meio de cultura (Tabela 9). Hipoteticamente, se forem excluídos todos os outros fatores que envolvem a interação solo-planta-microrganismo, e considerar-se somente o potencial de fixação de N total em meio de cultura do isolado SC0059 ($22,81 \mu\text{g N mL}^{-1}$), para estimar a sua contribuição a uma lavoura de arroz irrigado cultivado sob uma lâmina d'água de 10 cm ($1000 \text{ m}^3 \text{ água ha}^{-1}$), ter-se-ia um incremento de 23 kg N ha^{-1} . Os padrões BR11001 ($13,13 \mu\text{g N mL}^{-1}$) e BR11080 ($10,85 \mu\text{g N mL}^{-1}$) foram agrupados entre os isolados com médio potencial de FBN, e BR11140 apresentou baixa capacidade de FBN fixando $7,26 \mu\text{g N mL}^{-1}$ nas condições testadas. Os isolados SC0061, SC0009, SC0019, SC0049 e SC0046 se agruparam na faixa de médio potencial de FBN e os demais tiveram baixa capacidade de FBN *in vitro*. Kuss et al. (2007) avaliaram o potencial de fixação de N total em meio de cultura por isolados oriundos de raízes de arroz irrigado cultivado no Rio Grande do Sul e observaram uma faixa de valores de N

total fixado pelos isolados que variou entre 5,56 e 13 $\mu\text{g N mL}^{-1}$. No entanto, detectaram valores de N total fixado por BR11001 e BR11080 superiores a 40 $\mu\text{g N mL}^{-1}$.

Tabela 9 - Produção de auxinas em meio de cultura (AIA) e fixação biológica de nitrogênio *in vitro* por isolados de *Azospirillum* spp.

Isolado	Origem	Área de coleta	Concentração de AIA($\mu\text{g mL}^{-1}$)	N total fixado <i>in vitro</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
BR11001			40,11 d*	13,13 bcde
BR11080			nd	10,85 cde
BR11140			13,82 f	7,26 e
SC0003	Raiz	Agronômica	nd	nd
SC0004	Raiz	Agronômica	13,93 f	nd
SC0009	Colmo	Massaranduba	23,11 def	17,11 abcd
SC0014	Colmo	Rodeio 1	83,09 bc	21,26 ab
SC0015	Colmo	Rio do Sul	19,87 ef	nd
SC0018	Colmo	Guaramirim 2	nd	nd
SC0019	Colmo	Guaramirim 1	34,06 de	13,48 bcde
SC0027	Colmo	Rodeio 2	nd	7,26 e
SC0029	Raiz	Rodeio 2	112,08 a	8,29 de
SC0032	Colmo	Guaramirim 1	nd	8,64 de
SC0040	Raiz	Pouso Redondo 1	86,82 b	7,77 e
SC0046	Colmo	Rodeio 1	nd	10,02 cde
SC0049	Raiz	Agronômica	119,72 a	10,85 cde
SC0051	Raiz	Rodeio 2	nd	nd
SC0056	Raiz	Agronômica	nd	nd
SC0057	Colmo	Agronômica	5,67 f	22,45 a
SC0059	Raiz	Pouso Redondo 1	33,40 de	22,81 a
SC0061	Raiz	Agronômica	9,06 f	18,66 abc
SC0065	Raiz	Rodeio 1	17,45 ef	nd
SC0066	Raiz	Rodeio 1	21,08 ef	nd
SC0068	Raiz	Pouso Redondo 1	nd	nd
SC0081	Colmo	Pouso Redondo 1	nd	nd
SC0083	Raiz	Rio do Sul	34,09 de	nd
SC0084	Raiz	Rodeio 1	13,49 f	5,18 e
SC0085	Raiz	Rio do Sul	65,48 c	nd
CV(%)			14,63	22,46
R^2			0,98	0,84

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. nd = crescimento bacteriano presente, porém atividade não detectada.

Quanto ao potencial de solubilização de fosfato de cálcio dos isolados de *Azospirillum*, somente quatro isolados apresentaram o halo transparente ao redor das colônias, indicando a solubilização de fosfato insolúvel em placa. A eficiência de solubilização desses isolados (ES)

foi igual a 167, 221, 229 e 244 para SC0059, SC0066, SC0004 e SC0029 respectivamente. As estirpes-padrão não foram capazes de solubilizar fosfato *in vitro* (Tabela 9). A capacidade de solubilização de fosfato por algumas estirpes de *Azospirillum* também foi relatada por outros autores. Seshadri et al. (2000) avaliaram a eficiência de solubilização de fosfato de cálcio em placas de Petri pelos isolados LMG7107, LMG7108 e LMG7109 (*A. halopraeferans*) que apresentaram ES entre 150 e 152. El-Komy (2005) estudou a eficiência de solubilização de fosfatos *in vitro* por estirpes de *A. lipoferum* (Z1, R1, R3 e R5) e *A. brasilense* (Z2, Z5 e R2) isoladas da rizosfera de plantas de milho e arroz, no Egito. O autor reportou que todas as estirpes de *A. lipoferum* testadas tiveram habilidade de solubilização de fosfato de cálcio em placas e o maior valor de ES observado foi 185 para a estirpe R3, enquanto as estirpes de *A. brasilense* não demonstraram potencial de solubilização.

Sob uma visão geral, dentre os 25 isolados testados, 21 (84%) deles apresentaram potencial promotor de crescimento em pelo menos uma característica avaliada. Somente SC0029 e SC0059 tiveram resultados positivos nas três avaliações sendo capazes de produzir auxinas, fixar N e solubilizar fosfato de cálcio em condições *in vitro*. Nenhuma atividade fisiológica testada foi detectada em SC0003, SC0018, SC0056 e SC0081, o que indica que a presença da bactéria colonizando a planta nem sempre significa que ela esteja atuando como promotora de crescimento vegetal.

Considerando que os processos de produção de AIA, solubilização de fosfatos e FBN são resultados de reações fisiológicas e bioquímicas, e dependentes da expressão do potencial genético das bactérias e da planta colonizada (HOLGUIN et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2003; SESHADRI et al., 2000; SIQUEIRA & FRANCO, 1988), é importante que os isolados que apresentaram resultados promissores nos testes *in vitro* realizados nesse trabalho, sejam avaliados em testes de inoculação quanto ao seu estabelecimento a campo e sua interação com diferentes genótipos afim de confirmar o seu potencial biotecnológico para recomendação e aplicação em cultivos de arroz irrigado no estado de Santa Catarina. Além disso, a variação dos resultados encontrados nos ensaios *in vitro* mostra a ampla diversidade fisiológica de bactérias do gênero *Azospirillum* encontradas em associação com plantas de arroz irrigado e sugere que esses isolados também sejam testados em ensaios de co-inoculação para avaliação da associação de estirpes com diferentes potenciais de promoção de crescimento, visando a máxima contribuição para a cultura do arroz e também outras culturas de importância econômica para a região.

4.6 CONCLUSÕES

Isolados de *Azospirillum* spp. oriundos de plantas de arroz irrigado coletadas em regiões produtoras do estado de Santa Catarina têm similaridade genética maior que 55% e grande diversidade fisiológica.

Dentre os 25 isolados de *Azospirillum* spp. avaliados, 52% são capazes de fixar nitrogênio em meio de cultura e 64% produzem auxinas. Os isolados SC0004, SC0029, SC0059 e SC0066 solubilizam fosfato de cálcio em condições *in vitro*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Bactérias do gênero *Azospirillum* são encontradas em altas populações colonizando raízes endofiticamente raízes e colmos de plantas de arroz cultivado sob sistema irrigado em Santa Catarina e a partir desse estudo, 62 isolados de *Azospirillum* spp. foram obtidos e atualmente fazem parte da Coleção de Bactérias Diazotróficas Promotoras de Crescimento Vegetal do CAV/UEDESC em parceria com a “Rede Centro-Sul para a manutenção, bioprospecção e caracterização da biodiversidade de coleção de culturas e de genes de bactérias de importância agroindustrial: diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas”, sob coordenação da Embrapa Soja. Morfologicamente, os isolados têm alto grau de similaridade (acima de 94%) e a amplificação do DNA de 25 destes através de rep-PCR mostrou perfis com grande diversidade genética. Do ponto de vista biotecnológico, a maioria dos isolados caracterizados geneticamente (84%) apresentou potencial promotor de crescimento vegetal seja pela capacidade de produção de auxinas ou pela fixação biológica de nitrogênio, em condições *in vitro*. Esses isolados sintetizaram quantidades de AIA que chegaram a 119,72 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$ e fixaram até 22,8 $\mu\text{g N mL}^{-1}$, e quatro deles (4) foram capazes de solubilizar fosfatos

É importante que os demais isolados obtidos nesse estudo também sejam caracterizados fisiologicamente e que outras pesquisas complementares como a avaliação da produção de sideróforos e antibióticos sejam realizadas envolvendo todos os isolados. Vale ressaltar que a caracterização genética dos isolados é de suma importância e que já estão em andamento os trabalhos de seqüenciamento de seus genomas para fins de confirmação das espécies. Além disso, testes de inoculação e co-inoculação em casa-de-vegetação e a campo envolvendo os isolados que se destacaram na caracterização fisiológica são indispensáveis para que se conheça a interação desses isolados com o sistema solo-planta, e como seu potencial biotecnológico se expressa em condições adversas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONÇO, A. dos S.; SANTOS, A. B. dos; GOMES, A. da S. et al. Importância econômica, agrícola e alimentar do arroz. In: PEREIRA, D. P.; BANDEIRA, D L.; QUINCOZES, E. da R. F. (Ed). **Cultivo do arroz irrigado no Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, nov. 2005. (EMBRAPA - CPACT. Sistema de produção, 3). Disponível em: < <http://sistemas.deproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoBrasil/cap01.htm> > Acesso em: 22 out. 2008.

ARAÚJO, S. C, de. Realidade e perspectivas para o uso de *Azospirillum* na cultura do milho. **Informações agronômicas**, n. 122, p. 4-6, jun. 2008.

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

AZAMBUJA, I. H. V.; VERNETTI JÚNIOR, F. de J.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de. Aspectos socioeconômicos da produção do arroz. In: GOMES, A. da S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de (Ed) **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 889 p., p. 23-44.

AZEVEDO, M. S. **Influência do solo e da planta hospedeira sobre a diversidade gênica de isolados de *Azospirillum amazonense* associados às raízes de arroz, milho e sorgo**. 1998. 179 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1998.

BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

_____; AZEVEDO, M. S. de; REIS, V. M. et al. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S; LOPES, A. S. et al. (Ed) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. 818 p., p. 577-595.

BALDANI, V. L. Protocolo para a análise da qualidade e eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas não leguminosas. In: CAMPO, R. J. & HUNGRIA, M. (Org.) **XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE)**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 212 p. (Documentos – Embrapa Soja, n. 290).

BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Can. J. Microbiol.**, n. 43, p. 103-121, 1997.

BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo**. 2006. 83 p. Dissertação (Mestrado-Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal Rural do Rio Grande do Sul, 2006.

BORO R. C.; GOSWAMI C.; THAKURIA D.; MODI M. K.; TALUKDAR N. C. Molecular and functional characteristics, growth promoting effect and persistence of selected parent isolates and streptomycin resistant derivatives of rice rhizobacteria. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, n. 12, p. 1186-1194, 2004.

BRASIL, M. S. **Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz**. 2005. 105 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2005.

_____ ; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 29, n. 2, p. 179-190, 2005.

BURDMAN, S.; JURKEVITHC, E.; SCHWARTSBURD, B. et al. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. **Microbiology**, n. 144, p. 1989-1999, 1998.

CAMPOS, D. V. B. de; RESENDE, A. S. de; ALVES, B. J. R. et al. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura de arroz sob inundação. UFRRJ: **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 41-46, 2003.

CARDOSO, E. J. B.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992. 306 p.

CHOUDHURY, A. T. M. A. & KENNEDY, I. R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. **Bio Fertil Soils**, v. 39, p. 219-277, 2004.

CONAB. **Indicadores da agropecuária**. Ano 8, n. 07, jul. 2008. 66 p. Disponível em < <http://www.conab.gov.br> > Acesso em: 01 set. 2008.

CONAB. **Indicadores da agropecuária**. Ano 8, n. 07, jul. 2008. 66 p. Disponível em < <http://www.conab.gov.br> > Acesso em: 01 set. 2008.

DEKHIL, S. B.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largimobilis* subsp. *largimobilis* to the Genus *Azospirillum* as *Azospirillum largimobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largimobilis* subsp. *Parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 20, p. 72-77, 1997.

DIDONET, A. D.; MARTIN-DIDONET, C. G.; GOMES, G. F. **Avaliação de linhagens de arroz de terras altas inoculadas com *Azospirillum lipoferum* Sp59b e *A. brasilense* Sp245**. Santo Antonio de Goiás: EMBRAPA – CNPAF, 2003. 4 p. (EMBRAPA – CNPAF. Comunicado Técnico, 69).

DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica do nitrogênio no Brasil. São Paulo: **Estud. av.**, v. 4, n. 8, p. 144-152, 1990.

_____. & DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and nitrogen fixing sites. In: NEWTON, W. E. & NYMAN, C. J. (Ed) **Nitrogen fixation: proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington State University, v. 2, p. 518-538. 1975.

_____. & RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Ver. Biol.**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 261-272, 1958.

_____.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA – SPI; Itaguaí: EMBRAPA – CNPAB, 1995. 60 p.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G. et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 51, p. 17-26, 2001.

EL-KHAWAS, H. & ADASHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biol Fertil Soils**, n. 28, p. 377-381, 1999.

EL-KOMY, H. M. A. Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 43, n. 1, p. 19-27, 2005.

EMBRAPA AGROBIOLOGIA. **Empresas vão começar a produzir o inoculante para cana.** Disponível em: < <http://www.cnpab.embrapa.br/destaques/empresa-inoculo.html> > Acesso em: 17 nov. 2008.

_____. **Banco de Germoplasma de bactérias diazotróficas e actinomicetos.** Disponível em: < <http://www.cnpab.embrapa.br/pesquisas/projetos/022000446.html> > Acesso em: 18 nov. 2008.

EMBRAPA SOJA. **Embrapa Soja coordena o primeiro banco de microorganismos virtual do país.** Disponível em: < http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=488 > Acesso em: 17 nov. 2008.

FAGERIA, N. K. & BARBOSA FILHO, M. P. **Identificação e correção de deficiências nutricionais na cultura do arroz.** Santo Antonio de Goiás: EMBRAPA – CNPAF, 2006. 8 p. (EMBRAPA – CNPAF. Circular Técnica, 75).

FAGERIA, N. K.; SANTOS, A. B. dos; STONE, L. F. **Manejo de nitrogênio em arroz irrigado.** Santo Antonio de Goiás: EMBRAPA – CNPAF, 2003. 4 p. (EMBRAPA – CNPAF. Circular Técnica 58).

FAO. **FAO Rice Information.** Volume 2, jan. 2000. Disponível em: < <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPC/doc/riceinfo/Riceinfo.htm> > Acesso em: 08 out. 2007.

FAOSTAT. **World rice statistics.** FAOSTAT Database, 2008. Disponível em: < http://beta.irri.org/statistics/index.php?option=com_frontpage&Itemid=1 > Acesso em: 10 nov. 2008.

FERREIRA, J. S. **Seleção e avaliação de veículos para inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz inundado.** 2004. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2004.

FRANCO, A. A. & BALEIRO, F. de C. Fixação biológica de nitrogênio: alternativa aos fertilizantes nitrogenados. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S. et al. (Ed) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. 818 p., p. 577-595.

FREITAS, S. S. & VILDOSO, C. I. A. Rizobactérias e promoção de crescimento de plantas cítricas. **Rev. Bras. Ciên. Solo**, v. 28, p. 987-994, 2004.

GOMES, G. F. **Resposta de diferentes cultivares de arroz de terras altas (*Oryza sativa* L.) à inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum***. 2006. 47 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, 2006.

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

GUARNATO, L.; ADACHI, K.; SENBOKU, T. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. from a subtropical island, and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. **Biol Fertil Soils**, n. 28, p. 129-135, 1999.

GUIMARÃES, P. M. & SÁ, M. de F. G. de. O uso de PCR na diagnose e caracterização de microrganismos. In: MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L. et al. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento: microrganismos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. 743 p., p. 129-147.

HANN, S. O.; NEW, P. B. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. **Microbial Ecology**, n. 36, p. 193-201, 1998.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMÜLLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indol acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 916-923, 1983.

HOLGUIN, G.; PATTEN, C. L., GLICK, B. R. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. **Biol Fertil Soils**, v. 29, p. 10-23, 1999.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field crops research**, n. 65, p. 197-209, 2000.

KAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D. et al. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, Paris, v. 140, p. 679-693, 1989.

KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Bio. Biochem.**, v. 29, n. 5/6, p. 853-862, 1997.

KNOBLAUCH, R. e REIS, M. S. Arroz irrigado em sistema de cultivo pré-germinado. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 25, n. 222, p. 44-51, 2004.

KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. 2006. 109 p. Tese (Doutorado-Ciência do Solo) – Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

_____; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesq. Agropec. bras.**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, out. 2007.

LADHA, J. K. & REDDY, P. M. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant and Soil**, v. 252, p. 151-167, 2003.

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

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M. et al. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **An Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

MALIK, K. A.; BILAL, R.; MENHAZ, S. et al. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant and soil**, n. 194, p. 37-44, 1997.

MARTINELLI, L. A. Os caminhos do nitrogênio: do fertilizante ao poluente. **Informações agronômicas**, n.118, p. 6-10, jun. 2007.

MATTOS, M. L. T. A cultura do arroz irrigado e o meio ambiente. In: GOMES, A. da S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de (Ed) **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 889 p., p. 861-899.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, p. 620-624, 2007.

MONSALUD, R. G. Harsening microbial resources for sustainable crop production: the Philippine experience. **Journal of the Faculty of Agriculture Shinshu University**, v. 44, n. 1, p. 29-33, 2008.

MOREIRA, F.S.M. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626p.

NELSON, L. M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. **Crop Management**, Online, mar. 2004. Disponível em: < <http://www.plantmanagementnet.work.org/pub/cm/review/2004/rhizobacteria/>> Acesso em: 10 out. 2008.

NGUYEN, C.; YAN, W.; LE TACON, F.; LAPEYRIE, F. Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire). **Plant Soil**, n. 143, p. 193-199, 1992.

NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **R. Bras. Ci. Solo**, n. 28, p. 269-279, 2004.

NOLDIN, J. A.; EBERHARDT, D. S.; KNOBLAUCH, R. et al. Produção agroecológica de arroz irrigado. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 25, n. 222, p. 77-83, 2004.

OLIVEIRA, A. L. M. de; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: CNPAB, ago. 2003. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).

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

PAVEI, N. 2000. A lenta agonia e morte dos rios e lagoas do sul. *Diário Catarinense*, Florianópolis, p. 2. In: NOLDIN, J. A.; EBERHARDT, D. S.; KNOBLAUCH, R.; PRANDO, H. F.; SATO, G. Produção agroecológica de arroz irrigado. 2004. **Informe Agropecuário**, v. 25, n. 222, p. 77-83.

PEDRAZA, R. O.; BELLONE, C. H.; BELLONE, S. C. de et al. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **Eur. J. Soil Biol.**, Online, 2008. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com> > Acesso em: 29 out. 2008.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; et al. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, p. 1263-1271, 2006.

PERIN, L.; SILVA, M. F. da; FERREIRA, J. S. et al. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 47-53, 2003.

PERRIG, D.; BOIERO, M. L.; MASCIARELLI, O. A. et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 75, p. 1143–1150, 2007.

PITTNER, E.; SANTA, O. R. D.; MOURA, M. O. et al. Flutuação populacional de bactérias do gênero *Azospirillum* em solo cultivado com milho e em campo nativo. **Ambiência**, v. 3, n. 2, p. 243-252, mai/ago 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2008. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em <http://www.R-project.org>

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesq. agropec. bras.**, v. 40, n. 10, p. 997-1004, 2005.

_____ ; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesq. agropec. bras.**, v.39, n.10, p.987-994, out. 2004.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbial Ecol**, v. 62, p. 142-160, 2007.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; et al. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunt.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 43-51, 1987.

REIS JÚNIOR, F. B. dos; MENDES, I. de C.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; REIS, V. M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina: Embrapa Cerrados, dez. 2002. 33 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 51).

REIS, V. M. & TEIXEIRA, K. R. dos S. Fixação biológica do nitrogênio – Estado da arte. In: AQUINO, A. M. de & ASSIS, R. L. de (Ed.) **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 368 p.

RODRIGUES, E. P. **Caracterização fisiológica de estirpes de *Azospirillum amazonense* e avaliação dos efeitos da inoculação em plantas de arroz inundado (*Oryza sativa* L.)**. 2004. 66 p. Dissertação (Mestrado-Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2004.

_____ ; RODRIGUES, L. S.; OLIVEIRA, A. L. M. de et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Soil**, n. 302, p. 249-261, 2008.

ROESCH, L. F. W.; QUADROS, P. D. de; CAMARGO, F. A. O.; TRIPLETT, E. W. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World J Microbiol Biotechnol**, n. 23, p. 1377-1383, 2007.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. A moderna microbiologia do solo: aplicação de técnicas de biologia molecular. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S; LOPES, A. S. et al. (Ed) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. 818 p. p. 429-448.

_____ ; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 135-147, 1997.

SABINO, D. C. C. **Interação planta-bactéria diazotrófica na cultura do arroz**. 2007. 71 p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2004.

SAS INSTITUTE INC[®]. **SAS Version 9.1.3**. SAS Institute Inc.: Cary, NC, USA. 2003.

SCHMIDT, M. & HARTMANN, A. Molecular phylogeny and ecology of root associated diazotrophic α - and β -proteobacteria. In: ELMERICH, C. & NEWTON, W. E. (Ed.) **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**. Springer, 2007. 342 p., p. 21-40. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/t27hxv30ktq475ln/>> Acesso em: 16 out. 2008.

SESHADRI, S.; MUTHUKUMARASAMY, R.; LAKSHMINARASIMHAN, C.; IGNACI MUTHU, S. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. **Current science**, v. 79, n. 5, p. 565-567, sep. 2000.

SILVA, L. R. **Produção experimental de inoculantes agrícolas á base de *Azospirillum* spp. para fixação biológica de nitrogênio em gramíneas e forrageiras.** 2006. 137 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Estado de São Paulo, São Paulo, 2006

SIQUEIRA, J. O. & FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas.** Brasília: MEC, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236 p.

SOARES, R.A.; ROESCH, L. F. R.; ZANATTA, G. et al. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. **Appl Soil Ecol**, v. 33, p. 221-234, 2006.

SOKAL, R.R. & MICHENER, C.D. Statistical method for evaluating systematic relationships. **University of Kansas science bulletin**, v. 38, p.1409--1438, 1958.

SOUSA, R. O.; CAMARGO, F. A. O.; VAHL, L. C. Solos alagados. In: MEURER, E. J. (Org). **Fundamentos de química do solo.** Porto Alegre: GENESIS, 2000. 174p., p. 126-149.

STEENHOUDT, O. & VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetical, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 24, p. 487-506, 2000.

STOCCO, P.; SANTOS, J. C. P. dos; VARGAS, V. P.; HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 32, p. 1107-1120, 2008.

STOLTZFUS, J. R.; SO, R.; MALARVITHI, P. P. et al. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**, n. 194, p. 25-36, 1997.

SWIFT, M. J. Towards the second paradigm: integrated biological management of soil. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S; LOPES, A. S. et al. (Ed) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas.** Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. 818 p., p. 11-24.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S. et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum* *lipoferum* group, with the descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species

Azospirillum lipoferum (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can. J. Microbiol.**, n. 24, p. 967–980, 1978.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A. et al. Análises de solo, plantas e outros materiais. Boletim Técnico nº 5, Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS. Porto Alegre, 1995. 174 p.

TEIXEIRA, K. R. dos S. **Bases moleculares da fixação biológica do nitrogênio.** Seropédica: Embrapa – CNPAB, 1997. 26 p. (Embrapa – CNPAB. Documentos, 32).

VAHL, L. C. & SOUZA, R. O. de. Aspectos físico-químicos de solos alagados. In: GOMES, A. da S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de (Ed) **Arroz irrigado no Sul do Brasil.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 889 p., p. 97-118.

VERSALOVIC, J.; BRUIJN, F. J. de; LUPSKI, J. R. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In: BRUIJN, F. J. de.; LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. **Bacterial genomes: physical, structure and analysis.** Springer, 1998. 793 p., p. 437-454. Disponível em < <http://books.google.com> > Acesso em 16 out. 2008.

VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D.. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômica de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 74 p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 234).

XIE, C. H. & YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 55, p. 1435-1438, 2005.

YANO, D. M. Y.; ATTILI, D. S.; GATTI, M. S. V. et al. **Técnicas de microbiologia em controle de qualidade.** Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1991.

ZAKHAROVA, E. A.; SHCHERBAKOV, A. A.; BRUDNIK, V. V. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: insights for quantum chemistry. **Eur. J. Biochem.**, n. 259, p. 572-576, 1999.

ZHULIN, I. B.; BESPALOV, V. A.; MARK, S. J. et al. Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. **Journal of bacteriology**, v.178, n. 17, p. 5199-5204, sept. 1996.

ANEXOS

ANEXO A – Características morfológicas observadas para a caracterização fenotípica de colônias puras de *Azospirillum* spp.

ANEXO B – Quadro de Análise de Componentes Principais (ACP) apresentando a proporção de variação dos e os coeficientes de correlação das variáveis originais dos componentes principais de acordo com dados de ocorrência de *Azospirillum* spp. em raízes (RA) e colmos (CO) de arroz irrigado, coletados em Santa Catarina, isolados de meio NFb (NFbRA e NFbCO) e LGI (LGIRA e LGICO).

ANEXO C – Quadro de Análise de Componentes Principais (ACP) apresentando a proporção de variação e os coeficientes de correlação dos componentes principais considerando os atributos químicos dos solos: pH, NH_4^+ (NH_4), $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ($\text{NO}_3.\text{NO}_2$) e P disponível (P_{total}), de áreas de coleta de plantas de arroz irrigado em Santa Catarina.

ANEXO D – Quadros de análise de variância de dados referentes à capacidade de produção de auxinas, fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos de cálcio *in vitro* por isolados de *Azospirillum* spp. oriundos de raízes e colmos de plantas de arroz irrigado coletadas em Santa Catarina.

ANEXO A – Características morfológicas observadas para a caracterização fenotípica de colônias puras de *Azospirillum* spp.

CARACTERÍSTICA MORFOLÓGICA DA COLÔNIA	CLASSIFICAÇÃO
Bordo	Liso
	Lobado
	Ondulado
	Erodido
Elevação	Plana
	Convexa
	Ondulada
	Umbilicada
	Umbonada
	Pulvinada
Diâmetro	Elevada
	< 1 mm
	1-2 mm
	2-3 mm
	> 3 mm
Coloração	Creme
	Creme com centro claro
	Creme com centro escuro
	Branca opaca
	Branca translúcida
	Rosa
	Amarelo claro
	Amarelo escuro
Marrom	
Consistência	Mole
	Média
	Dura/quebradiça

Fonte: Adaptado de Nóbrega et al. (2004)

ANEXO B – Quadro de Análise de Componentes Principais (ACP) apresentando a proporção de variação dos e os coeficientes de correlação das variáveis originais dos componentes principais de acordo com dados de ocorrência de *Azospirillum* spp. em raízes (RA) e colmos (CO) de arroz irrigado, coletados em Santa Catarina, isolados de meio NFb (NFbRA e NFbCO) e LGI (LGIRA e LGICO).

	COMPONENTES			
	Comp1	Comp2	Comp3	Comp4
Proporção de Variância	0,3205435	0,2674604	0,2307443	0,1812518
Proporção Cumulativa	0,3205435	0,5880039	0,8187482	1,0000000
	COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO			
	Comp1	Comp2	Comp3	Comp4
NFbRA	0,699	0,090	0,029	0,709
NFbCO	-0,119	-0,732	0,646	0,184
LGIRA	-0,175	0,674	0,715	0,058
LGICO	0,683	-0,047	0,266	-0,678

ANEXO C – Quadro de Análise de Componentes Principais (ACP) apresentando a proporção de variação e os coeficientes de correlação dos componentes principais considerando os atributos químicos dos solos: pH, NH_4^+ (NH4), $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ (NO3.NO2) e P disponível (Ptotal), de áreas de coleta de plantas de arroz irrigado em Santa Catarina.

	COMPONENTES			
	Comp1	Comp2	Comp3	Comp4
Proporção de Variância	0,5244911	0,298469	0,1521950	0,02484494
Proporção Cumulativa	0,5244911	0,822960	0,9751551	1,0000000
	COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO			
	Comp1	Comp2	Comp3	Comp4
pH	0,3699	0,607	-0,592	-0,348
NH4	-0,640	0,230	0,216	-0,701
NO3.NO2	0,409	0,493	0,767	0,024
Ptotal	-0,513	0,579	-0,118	0,622

ANEXO D – Quadros de análise de variância de dados referentes à capacidade de produção de auxinas, fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos de cálcio *in vitro* por isolados de *Azospirillum* spp. oriundos de raízes e colmos de plantas de arroz irrigado coletadas em Santa Catarina.

PRODUÇÃO DE AUXINAS EM MEIO DE CULTURA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados médios	Valor de F	Pr > F
Tratamentos	17	66257,04890	3897,47346	105,92	<,0001
Erro	36	1324,64694	36,79575	-	-
Total	53	67581,69584	-	-	-

FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL <i>IN VITRO</i>					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados médios	Valor de F	Pr > F
Tratamentos	16	1557,530756	97,345672	11,94	<,0001
Erro	34	277,244662	8,154255	-	-
Total	50	1834,775418	-	-	-

SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados médios	Valor de F	Pr > F
Tratamentos	3	1686,00000	562,00000	0,24	0,8685
Erro	12	28399,00000	2366,58333	-	-
Total	15	30085,00000	-	-	-