

JAMES RODRIGO SMANIOTTO

**CONTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO
CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO DE GENOTIPOS DE ARROZ DE
SEQUEIRO**

Tese apresentada ao Curso de pós-graduação em Manejo do Solo, no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Manejo do Solo.

Orientador: Dr. Osmar Klauberg Filho
Co-orientadores: Dr. Júlio César Pires Santos
Dr. Clóvis Arruda de Souza

LAGES, SC

2013

S635c Smaniotto, James Rodrigo

Contribuição de bactérias endofíticas no crescimento e nutrição de genótipos de arroz de sequeiro / James Rodrigo Smaniotto. - 2013.

127 p. : il. ; 21 cm

Orientador: Osmar Klauberg Filho

Coorientador: Júlio César Pires Santos

Coorientador: Clóvis Arruda de Souza

Bibliografia: p. 92-97

Tese (doutorado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveteinárias, Programa de Pós-Graduação em Manejo do Solo, Lages, 2013.

1. Fósforo. 2. Promoção de crescimento. 3. Nitrogênio.

I. Smaniotto, James Rodrigo. II. Klauberg Filho, Osmar. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Manejo do Solo. IV. Título

CDD: 631.85 - 20.ed.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do
CAV/UDESC

JAMES RODRIGO SMANIOTTO

CONTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO DE GENÓTIPOS DE ARROZ DE SEQUEIRO

Tese de Doutorado em Manejo do Solo do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora

Orientador:

Prof. Dr. Osmar Klauberg Filho
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Co-orientador:

Prof. Dr. Julio Cesar Pires Santos
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Co-orientador:

Prof. Dr. Clóvis Arruda de Souza
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membros:

Dr. Murilo Dalla Costa
Epagri - Estação Experimental de Lages

Dr. Ronaldir Knoblauch
Epagri – Estação Experimental de Itajaí

Lages, SC, 30/08/2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho e acreditaram na minha capacidade e potencial.

Agradeço ao Professor Dr. Osmar Klauberg Filho pelos anos de orientação, companheirismo no decorrer do trabalho.

Aos Professores Dr. Clóvis Arruda de Souza e Dr. Júlio César Pires Santos, pela co-orientação, e apoio no desenvolvimento dos trabalhos.

Ao Professor Dr. David José Miquelutti, pelo desenvolvimento das análises estatística do estudo.

A Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) em especial ao centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), pela oportunidade de realização do curso de Doutorado em Manejo do solo.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante os primeiros 18 meses do Curso de Doutorado em Manejo do Solo.

A toda equipe do Laboratório de Biologia e Fauna do Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina, em especial a bolsista de Iniciação Científica Sabrina Trento, pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos e nas analise laboratoriais.

A toda minha família, meus pais, irmão e em especial a minha esposa Kathilce Martins Amorim e minha enteada Ana Carolina, pelo incentivo, apoio e confiança no decorrer de meu trabalho.

E, acima de tudo, A Deus por dar-me força e perseverança para continuar os trabalhos nos momentos de maior dificuldade.

**CONTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO
CRESCEMENTO E NUTRIÇÃO DE GENOTIPOS DE ARROZ DE
SEQUEIRO**

RESUMO

SMANIOTTO, James Rodrigo. **Contribuição de bactérias endofíticas no crescimento e nutrição de genótipos de arroz de sequeiro.** 2013. 120 f. Tese (Doutorado em Manejo do Solo) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. Lages, SC. 2013.

A aplicação de altas doses de N nas lavouras de arroz promove perdas, além do alto custo do adubo nitrogenado. A associação com bactérias fixadoras de N pode contribuir com o suprimento de N da cultura, além de promover o crescimento do sistema radicular. Este trabalho foi conduzido objetivando estudar o efeito da inoculação de isolados de bactérias *diazotróficas endofíticas* em genótipos *crioulos* de arroz de sequeiro. Foi conduzido dois experimentos em casa de vegetação e um a campo em três anos agrícolas (2010/11, 2011/12 e 2012/13). O experimento 1, conduzido em casa de vegetação para a avaliação da resposta na FBN e promoção de crescimento em virtude da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em genótipos crioulos de arroz de sequeiro, conduzidos em casa de vegetação. O experimento 2 avaliou a contribuição efetiva da inoculação das bactérias do experimento anterior, avaliados com o uso de nitrogênio marcado (¹⁵N) pela técnica de diluição isotópica e abundância natural de ¹⁵N em casa de vegetação. O ultimo experimento foi realizado a campo com o objetivo de avaliar o uso de um inoculante comercial a base de bactérias endofíticas, Abv5/Abv6, em condições de campo sobre a absorção de N e P e o acumulo de massa seca pela planta. Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise estatística através do sistema estatístico SAS. A variedade de arroz de sequeiro amarelão mostrou-se promissora quando inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum* sp., apresentando maiores índices de crescimento vegetal. O uso da técnica de diluição isotópica de ¹⁵N foi eficiente na determinação do teor de N no grão, no entanto não foram verificadas diferenças entre os isolados avaliados. A inoculação de arroz de sequeiro com inoculante a

base de bactérias do gênero *Azospirillum*, Abv5/abv6 não apresentou efeito entre as variáveis avaliadas no estudo realizado em condições de campo.

Palavras chaves: Fósforo. Promoção de crescimento. Nitrogênio.

ABSTRACT

SMANIOTTO, James Rodrigo. **Contribution of endophytic bacteria on growth and nutrition upland rice genotypes.** 2013. 120 f. Thesis (Doctorate in Soil Management) – Santa Catarina State University. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. Lages, SC. 2013.

The application of high doses in rice fields promotes losses, besides the high cost of fertilizer. The association with N-fixing bacteria may contribute to the N supply of culture, and to promote the growth of the root system. This work will be conducted to study the effect of inoculation of isolates of endophytic diazotrophs in upland rice genotypes Creoles. Experiments will be conducted, two in the greenhouse and the field in three crop years (2010/11, 2011/12 and 2012/13). The first experiment will be conducted in a greenhouse to evaluate the response in the BNF and growth promotion due to the inoculation of diazotrophic bacteria in creole genotypes of upland rice, conducted in the greenhouse. Experiment 2 evaluates the effective contribution of inoculation of bacteria from the previous experiment, evaluated with the use of labeled nitrogen (^{15}N) by isotope dilution and ^{15}N natural abundance in the greenhouse. The last experiment is carried out with the objective to evaluate the use of a commercial inoculant base growth promoting rhizobacteria under field conditions on N and P uptake and dry matter accumulation by the plant. The data obtained in the experiments are analyzed statistically using the SAS statistical system. A variety of upland rice - amarelão showed promise when inoculated with bacteria of the Azospirillum sp., Showing higher rates of plant growth. The use of isotopic dilution of ^{15}N was effective in determining the N content in the grain, however were not observed differences between the isolates. Inoculation with upland rice-based inoculant Azospirillum bacteria, Abv5/abv6 no effect among the variables evaluated in the study conducted under field conditions.

Key words: Phosphorus. Growth promotion. Nitrogen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Altura de plantas de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N66
- Figura 2 - Massa Seca de Parte Aérea em genótipos de arroz de sequeiro em tratamento não inoculado (A), inoculados com Ai27 (B), Fe27 (C) e Fe34 (D) em diferentes doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N69
- Figura 3 - Teor de nitrogênio no grão de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N70
- Figura 4 - Teor de ^{15}N no grão de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N73
- Figura 5 - Teor de ^{15}N no grão de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N74
- Figura 6 - Teor de ^{15}N no grão de genótipos de arroz de sequeiro com tratamentos, não inoculado (A), inoculados com AI27 (B), com Fe27 (C) e com Fe34 (D) em diferentes doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N76
- Figura 7 - Teor de nitrogênio no grão em genótipo de arroz de sequeiro, variedade amarelão, inoculado com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio nos tratamentos com adição de ^{15}N e sem adição de ^{15}N78
- Figura 8 - Abundância natural de ^{15}N em grãos de genótipo de arroz de sequeiro, variedade, amarelão, inoculado com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio, sem adição de ^{15}N79

Figura 9 -	Teor de isótopos estáveis de ^{15}N em grãos de genótipo de arroz de sequeiro, variedade amarelão, inoculado com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas diferentes doses de nitrogênio, com adição de ^{15}N	80
Figura 10 -	Teor de isótopos estáveis de ^{15}N em grãos de genótipo de arroz de sequeiro, variedade amarelão, com os tratamentos: não inoculado (A), inoculados com bactérias diazotróficas endofíticas, Ai27 (B), Fe27 (C) e Fe34 (D) em diferentes doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N e sem adição de ^{15}N	83
Figura 11 -	Teor de nitrogênio em folha bandeira de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise de variância e fontes de variação em genótipos crioulos de arroz de sequeiro inoculados com bactérias diazotróficas endofíticas.....	40
Tabela 2 -	Massa Seca de Parte Aérea, Massa Seca de Raiz e Relação Parte aérea/Raiz de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas.....	42
Tabela 3 -	Teor de fósforo no tecido vegetal de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas do gênero <i>Azospirillum</i> sp. (Ai27), <i>Pseudomonas</i> sp. (Fe27), <i>Rhizobium</i> sp. (Fe34) e inoculante comercial (<i>Azospirillum</i> sp. (Abv5/abv6)).....	49
Tabela 4 -	Teor de nitrogênio no tecido vegetal de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas do gênero <i>Azospirillum</i> sp. (Ai27), <i>Pseudomonas</i> sp. (Fe27), <i>Rhizobium</i> sp. (Fe34) e inoculante comercial (<i>Azospirillum</i> sp. (Abv5/abv6)).....	49
Tabela 5 -	Análise de variância e fontes de variação em genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em três doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N	65
Tabela 6 -	Análise de variância e fontes de variação em genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas com doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N	70
Tabela 7 -	Análise de variância e fontes de variação em genótipo de arroz de sequeiro da variedade amarelão inoculado com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas com doses de nitrogênio e adição de ^{15}N	77
Tabela 8 -	Análise de variância e fontes de variação em genótipos de arroz de sequeiro inoculado com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e com doses de nitrogênio.....	101

Tabela 9 -	Produtividade de genótipos de arroz de sequeiro inoculado com inoculante comercial com bactérias do gênero <i>Azospirillum</i> sp. – estirpe Abv5/abv6 em diferentes doses de nitrogênio.....	103
Tabela 10 -	Teor de fósforo em folha bandeira de genótipos de arroz de sequeiro inoculado com inoculante comercial com bactérias do gênero <i>Azospirillum</i> sp. – estirpe Abv5/abv6 em diferentes doses de nitrogênio.....	106
Tabela 11 -	Teor de nitrogênio no grão de genótipos de arroz de sequeiro inoculado com inoculante comercial com bactérias do gênero <i>Azospirillum</i> sp. – estirpe Abv5/abv6 em diferentes doses de nitrogênio...106	
Tabela 12 -	Teor de fósforo no grão de genótipos de arroz de sequeiro inoculado com inoculante comercial com bactérias do gênero <i>Azospirillum</i> sp. – estirpe Abv5/abv6 em diferentes doses de nitrogênio...109	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1.1 HIPOTESE.....	21
1.2 OBJETIVOS GERAIS.....	22
1.2.1 Objetivos específicos.....	22
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1 ORIGEM DO ARROZ.....	22
2.2 ASPECTOS NUTRICIONAIS.....	24
2.3 DILUIÇÃO ISOTÓPICA DE ^{15}N	27
3. CAPITULO 1 - INOCULAÇÃO DE ARROZ DE SEQUEIRO COM ISOLADOS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	30
3.1 INTRODUÇÃO.....	33
3.2 MATERIAL E METODOS.....	37
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
3.4 CONCLUSÕES.....	52
3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	53
4. CAPITULO 2 – DILUIÇÃO ISOTÓPICA DE ^{15}N EM ARROZ DE SEQUEIRO INOCULADOS COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS SOB DIFERENTES NIVEIS DE NITROGÊNIO.....	57
4.1 INTRODUÇÃO.....	60
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
4.4 CONCLUSÕES.....	84
4.5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	85
5. CAPITULO 3 – INOCULAÇÃO DE ARROZ DE SEQUEIRO COM BACTÉRIAS DO GENERO <i>Azospirillum</i> - ESTIRPE Abv5/abv6 SOB DIFERENTES NIVEIS DE NITROGÊNIO EM CONDIÇÃO DE CAMPO.....	93
5.1 INTRODUÇÃO.....	97
5.2 MATERIAL E METODOS.....	99
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	100
5.4 CONCLUSÕES.....	110
5.5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	111
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117

1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz é utilizado como principal alimento por mais de um terço da população mundial, além de ser considerado, dentre os cereais de importância econômica, o mais importante do terceiro mundo (BODDEY *et al.* 1997). Sendo o arroz cultivado em solos inundados responsável por cerca de 86% de toda a produção de grãos deste cereal (LADHA *et al.* 1997). Entretanto, o cultivo do arroz, nos últimos anos, tem se expandido para terras altas ou de sequeiro, principalmente no Brasil, onde existem cerca de 2,4 milhões de hectares plantados com a cultura nestas condições (URQUIAGA & ZAPATA, 2000).

Na região Serrana de Santa Catarina com predomínio de pequenas propriedades que utilizam mão-de-obra estritamente familiar, onde há predomínio da produção de subsistência, baseada no uso sementes crioulas, ou seja, produzidas na própria propriedade. Com isso o uso de variedades crioulas representa papel fundamental no aspecto socioeconômico da pequena propriedade rural. Entretanto o uso anual da mesma variedade pode com o passar dos anos reduzirem sua variabilidade genética e com isso apresentar produtividades menores do que as comerciais. Mesmo assim seu uso apresenta aspectos positivos no que se refere a sua rusticidade às adversidades de manejo nutricional e hídrico, conseguindo produzir sob condições de estresses. Dessa forma, alternativas como o uso de bactérias endofíticas e de FMAs pode representar um passo importante na potencialização da produção dos genótipos crioulos quando inoculados com esses microrganismos, reduzindo os estresses nutricionais e hídricos e melhorando o desempenho da cultura sem elevar os custos de produção dos pequenos produtores. No entanto, recentemente o cultivo de arroz de terras altas ou sequeiro tem se expandido, principalmente no Brasil, onde se estima que há 2,4 milhões de hectares cultivados nesta condição. Hoje, no Brasil, ao redor de um terço da produção de grãos de arroz é originada de lavouras cultivadas no ecossistema de terras altas. Essas áreas, no entanto, correspondem a dois terços da área total cultivada com o cereal, tendo o sistema de sequeiro como principal modalidade (CRUSCIOL, *et al.*,2005). Sendo uma cultura adaptada para o

cultivo em condições de inundação e, portanto, sensível à seca, quando é cultivado na condição de sequeiro, pode vir a sofrer estresse hídrico e nutricional, o que pode provocar perdas significativas na produtividade.

O estado do Rio Grande do Sul se destaca como o maior produtor nacional, seguido por Santa Catarina, Maranhão e Mato Grosso, com 61, 8,4, 5,8 e 5,7%, respectivamente, sendo RS e SC os detentores de maior produtividade devido ao fato do predomínio do sistema de arroz irrigado. Dados da Conab (janeiro de 2009) mostram uma produção na safra 2008/09 de 12177,1 mil t, e um consumo de 12900,00 mil t, o que reflete uma necessidade de importação que nesta mesma safra chegou a cerca de 1000,00 mil t, demonstrando dessa forma que o País ainda não é autosuficiente na produção de grãos de arroz para o consumo interno. Em Santa Catarina a cultura do arroz de sequeiro tanto a área plantada quanto a produção decresceram quando comparados às safras 2007/08 e 2008/09, com redução da área plantada de 3081 para 2465 ha representando 19,99% de redução, já a produção reduziu de 5048 na safra 2007/08 para 3586 na safra 2008/09, representando uma redução de 28,96%, que segundo expectativas iniciais pode ocorrer perdas de produtividade e consequente diminuição da produção de grãos devido ao excesso de chuvas, entre final de 2008 e inicio de 2009, quedas de temperatura, principalmente quando se considera a produção do arroz de sequeiro que é mais sensível às intempéries naturais, visto que praticamente não há uso de sistemas de irrigação nas lavouras da região serrana de Santa Catarina. Entretanto, segundo a Conab em seu 6º levantamento de fevereiro de 2009, estima que a produção estadual deva aumentar em aproximadamente 0,4% em comparação a safra de 2007/08, totalizando cerca de 1,021 milhão de toneladas, considerando para isso a participação do arroz irrigado.

Na cultura do arroz de sequeiro, o nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes para a obtenção de alta produtividade, uma vez que sua demanda pela planta é alta. Depois da água o nitrogênio é o fator mais critico para o crescimento e para a produção de arroz de sequeiro. Sua disponibilidade é um dos fatores limitante para a produtividade, pois este nutriente contribui para o aumento da área foliar da planta que implica em melhor aproveitamento da radiação solar,

maior produção de energia, pela fotossíntese e, consequentemente, melhores produtividades (FAREGIA & BARBOSA FILHO, 2006). Nos últimos anos o arroz tornou-se altamente dependente dos fertilizantes nitrogenados, com isso, aumentando os custos de produção, haja vista que para se produzir industrialmente 1 kg de fertilizante nitrogenado consomem-se seis vezes mais energia que para a produção de 1 kg de fósforo ou potássio.

Desse modo, a sua baixa disponibilidade no solo limita o potencial produtivo da cultura, o que o torna um problema para cerca de 90% das regiões da América Tropical. Em plantas leguminosas, que possuem o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), ela desempenha importante papel para a produção agrícola, pois reduz o uso de fertilizantes nitrogenados. Entretanto, este processo também pode ser de fundamental importância em plantas não-leguminosas, tendo em vista que nos últimos anos ensaios utilizando o método da diluição isotópica de ^{15}N demonstraram o potencial da FBN em várias culturas não-leguminosas, dentre elas a do arroz (URQUIAGA et al., 1991). Do mesmo modo, segundo Canuto et al. (2003) Uma lavoura de cana-de-açúcar com produtividade de 100 t.ha $^{-1}$ de colmos, acumula entre 180 e 250 kg. ha $^{-1}$ de N, no primeiro ciclo, enquanto que nos ciclos seguintes, acumula de 120 a 180 kg.ha $^{-1}$ de N. Esta cultura, que demanda grande quantidade de N, apresenta uma baixa resposta à adubação nitrogenada, o que sugere que a interação de alguns microrganismos diazotróficos endofíticos com as plantas seja um sistema natural de reposição do N exportado anualmente dos solos pela colheita. Os estudos sobre a fixação biológica de nitrogênio (FBN) associada à cana-de-açúcar têm se intensificado nos últimos anos e várias bactérias fixadoras de N $_2$ foram isoladas de tecidos de diversas partes da planta (Baldani et al., 2002). Os dados de literatura mostram que a contribuição de FBN associada às plantas de cana-de-açúcar cultivadas no campo e sem inoculação varia de zero a 70%, conforme demonstrado através da técnica de abundância natural de ^{15}N e da técnica de diluição isotópica de ^{15}N (Polidoro et al, 2002). Também estudos recentes de inoculação de plantas micropagadas de cana-de-açúcar com uma mistura de 5 estirpes de espécies diferentes mostraram contribuições ao redor de 30% (Oliveira et al., 2002). Desta

forma, a seleção de bactérias diazotróficas endofíticas com alto potencial de associação e contribuição para a FBN, pode ser um fator diferencial para diminuir a dependência da cultura pelo N derivado do solo ou da adubação nitrogenada sem que haja perda de produção. Desta forma, a seleção de bactérias diazotróficas endofíticas com alto potencial de associação e contribuição para a FBN, pode ser um fator diferencial para diminuir a dependência da cultura pelo N derivado do solo ou da adubação nitrogenada sem que haja perda de produção.

O grande interesse na fixação biológica em gramíneas é devido à maior facilidade de aproveitamento de água das mesmas em relação às leguminosas, pela maior efetividade fotossintética. As gramíneas apresentam um sistema radicular fasciculado, tendo vantagens sobre o sistema pivotante das leguminosas para extrair água e nutrientes do solo; e por serem as gramíneas largamente utilizadas como alimento pelo homem. Por isso, mesmo que apenas uma parte do N pudesse ser fornecida pela associação com bactérias fixadoras, a economia em adubos nitrogenados seria igual ou superior àquela verificada com as leguminosas que podem ser auto-suficientes em nitrogênio (DÖBEREINER, 1992). Os efeitos positivos da inoculação de algumas estirpes de bactérias no crescimento das plantas podem estar associados ao processo de FBN, à síntese de hormônios de crescimento produzidos pelas bactérias ou mesmo a um efeito sinérgistico destes fatores atuando em diferentes estádios de desenvolvimento da planta.

Apesar de importantes inovações tecnológicas, a pesquisa agronômica brasileira possui muitos desafios no que se refere à produção de arroz de sequeiro e à busca de soluções para os problemas da cultura. Em termos gerais, o maior desafio encontrado é a consolidação da produção sustentável na agricultura familiar. Uma vez que a FBN em gramíneas tem sido objeto de constante estudo nos últimos anos, porém ainda é necessário maior conhecimento sobre a associação planta/bactéria, visando explorar o potencial da interação em benefício do desenvolvimento da planta e consequente aumento de produção.

Quando se trata de microrganismos diazotróficos associativos, nem sempre são observadas diferenças entre aqueles tratamentos inoculados quando comparados com as

aplicações de fertilizantes nitrogenados. Entretanto, alguns trabalhos têm apresentado resultados bastante promissores, principalmente no incremento de massa seca em plantas de arroz, provenientes da inoculação com *H. seropediae* (FERREIRA et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2010). De modo geral a inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz, bem como em plantas da família Poaceae (gramíneas), pode substituir a aplicação em média de 40 kg de N ha⁻¹, dependendo da variedade de arroz utilizada (BALDANI et al., 2000; FERREIRA et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2010). Existe grande variação na quantidade de N₂ fixado por todas as espécies de leguminosas. Por exemplo, no trevo branco (*Trifolium repens*), esta quantidade de N pode chegar a mais de 500 kg ha ano⁻¹. Contudo, a quantidade usual de fixação de N no consórcio gramínea-trevos na Nova Zelândia varia de 85 a 350 kg/ha de N (CARADUS, 1990; LEDGARD et al., 1990).

A biologia do solo oferece várias alternativas para o desenvolvimento de biotecnologias capazes de aumentar a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, reduzindo a aplicação de fertilizantes químicos (DOBEREINER, 1990). Dentre essas alternativas, está o uso de bactérias diazotróficas capazes de suprir o nitrogênio através da fixação biológica do nitrogênio atmosférico e com efeitos na promoção de crescimento vegetal. Como exemplo, podem ser citadas as bactérias do gênero *Azospirillum* que estão associadas às gramíneas colonizando essas plantas endofiticamente (REIS & TEIXEIRA, 2005). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) contribui muito para o desenvolvimento e nutrição da planta. Entretanto, a aplicação excessiva de adubos nitrogenados, pode afetar negativamente a colonização e atividade biológica desses microrganismos.

Muitos estudos indicam a possibilidade de se utilizar bactérias endofíticas como insumo biológico, disponibilizando nutrientes e promovendo crescimento de plantas. Porém, o comportamento dos microrganismos aplicados no campo é influenciado pela competição com outros microorganismos indígenos e pelas características deste solo. Desta forma, são necessárias pesquisas que avaliem as condições próprias de cada região, bem como a interação planta-microorganismo. A utilização de bactérias endofíticas como insumo biológico para a

produção de grãos pode contribuir para a produção de arroz de sequeiro, aumentando a sustentabilidade sistema de produção.

Com base nisso, busca-se inovações tecnológicas que minimizem os efeitos de estresses causados por fatores bióticos e abióticos, principalmente no arroz de sequeiro, que é mais vulnerável às questões de adubação do solo e nutrição nitrogenada e fosfatada da planta principalmente nos solos de baixa fertilidade natural geralmente encontrado na região serrana de Santa Catarina, assim como o fornecimento de água, manejo de pragas e plantas invasoras. Diante disso, o uso de microrganismos promotores de crescimento como bactérias endofíticas e FMA's pode representar papel de grande importância no que se refere ao aumento da produção e produtividade de arroz de sequeiro, haja vista seu potencial para a produção de fitormonios e FBN (rizobactérias promotoras de crescimento em plantas) e para o aumento do potencial de absorção de fósforo. O uso de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP) promove melhora no estado nutricional da planta, consequentemente aumentando sua produtividade e em contrapartida reduz a necessidade de uso de fertilizantes nitrogenados e fosfatados industrializados, reduzindo assim os custos de adubação e os possíveis riscos ambientais causados pelo uso excessivo desses fertilizantes.

Considerando que as bactérias diazotróficas endofíticas atuam na promoção do crescimento radicular e da parte aérea de arroz através da fixação biológica de nitrogênio e da produção de fitormonios vegetais, foi realizados estudos com base na diversidade de bactérias endofíticas para o desenvolvimento e/ou melhoria de sistemas de produção em pequenas propriedades rurais cultivadas com arroz-de-sequeiro, além de avaliar o efeito destes microrganismos no crescimento e nutrição fosfatada e nitrogenada de genótipos crioulos de arroz-de-sequeiro no Planalto Serrano de Santa Catarina. Apresentando o principal objetivo de buscar alternativas que reduzam os custos de produção e aumentem os índices de produtividade dos agricultores da região com o uso de microrganismos que auxiliem e maximizem o potencial produtivo da cultura e consequentemente os maiores ganhos econômicos dos pequenos produtores rurais, onde a característica principal é o uso de mão de obra familiar em pequenas propriedades. Sendo

também caracterizada pelo baixo nível de tecnologia utilizado nestes sistemas de produção, refletindo em uso de adubação inadequada, manejo e tratos culturais sem o uso mecanização avançadas.

Desse modo foram realizados três estudos, divididos em três capítulos, com o intuito de elucidar o papel das bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas na cultura de arroz de sequeiro. No capítulo 1 foi estudado o efeito da inoculação de 3 inoculantes provenientes de estirpes de bactérias isoladas pelo laboratório de microbiologia do solo do CAV/UDESC e um inoculante comercial com estirpes de Azospirillum – Abv5/abv6, provenientes da empresa Total biotecnologia. Onde foram avaliados a capacidade das bactérias na promoção de crescimento vegetal através das determinações de massa seca de raiz e de parte aérea, além dos teores de nitrogênio e fósforo no tecido vegetal de três diferentes genótipos de arroz de sequeiro e uma variedade melhorada de arroz irrigado.

No capítulo 2 o estudo foi realizado para avaliar o potencial de fixação biológica de nitrogênio atmosférico de três estirpes de bactérias provenientes do Laboratório de Microbiologia do Solo do CAV/UDESC em diferentes doses de nitrogênio através do uso do marcador isotópico ^{15}N , pela técnica da diluição isotópica e da abundância natural de ^{15}N .

O uso de inoculante comercial em condições de campo foi estudado no capítulo 3, onde dois genótipos crioulos de arroz de sequeiro e uma variedade comercial de arroz irrigado foram inoculados com estirpes azospirillum Abv5/abv6 provenientes da empresa Total Biotecnologia. Foram utilizados três doses de nitrogênio. Ao final do ciclo foram avaliados a produtividade e os teores de nitrogênio e fósforo na folha bandeira e no grão.

1.1 HIPOTESE

Bactérias endofíticas atuam na promoção do crescimento radicular e da parte aérea de genótipo crioulos utilizados na agricultura familiar.

1.2 OBJETIVO GERAL

O trabalho desenvolvido tem por objetivo estudar as interações entre microrganismos promotores de crescimento vegetal, com base na diversidade de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* para o desenvolvimento e/ou melhoria de sistemas de produção em pequenas propriedades rurais cultivadas com arroz de sequeiro; e avaliar o efeito destes microrganismos relacionados ao crescimento e nutrição fosfatada e nitrogenada de genótipos crioulos de arroz de sequeiro.

1.2.1 Objetivos específicos

Avaliar a eficiência agronômica e características de produção do arroz-de-sequeiro inoculado com bactérias endofíticas e com FMAs.

Buscar alternativas de manejo de adubação para produção de arroz-de-sequeiro, por meio do uso de adubação nitrogenada e fosfatada; Inoculação com rizobactérias promotoras de crescimento e fixadoras de nitrogênio.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ORIGEM DO ARROZ

O arroz teve origem a partir de duas formas silvestres: a espécie *Oryza rufipogon*, procedente da Ásia, originando a espécie *Oryza sativa*. A segunda forma é a espécie *Oryza barthii* (*Oryza breviligulata*), oriunda da África Ocidental, dando origem à espécie *Oryza glaberrima*. O gênero *Oryza* é o mais rico e importante da tribo *Oryzeae* e engloba cerca de 23 espécies, as

quais estão dispersas espontaneamente nas regiões tropicais da Ásia, África e Américas. A espécie *O. sativa* deu origem a maioria das cultivares de arroz do mundo, sendo cultivada, inclusive no Brasil (EMBRAPA, 2005). Mesmo antes dos relatos históricos terem sido evidenciados, o arroz foi, provavelmente, o principal alimento e a primeira planta cultivada na Ásia. Há cerca de 5.000 anos, a literatura chinesa já mencionava as mais antigas referências ao arroz. Sendo seu uso também muito antigo na Índia, onde é citado em todas as escrituras hindus, onde variedades especiais eram usadas como oferendas em cerimônias religiosas. Algumas diferenças entre as formas de arroz cultivadas na Índia e sua classificação em grupos, de acordo com ciclo, exigência hídrica e valor nutritivo, foram mencionadas a cerca de 1.000 a.C. (EMBRAPA, 2005).

No cenário mundial, dados da safra 2008/09 colocam a China como maior produtor, sendo responsável por 30,8%, seguido pela Índia, com 22,2%; Indonésia, com 8,3%; Vietnã, com 5,4%; Tailândia, com 4,4%; Filipinas, com 2,4% e o Brasil, com 1,9%. Quando considerado apenas o Mercosul, o Brasil se destaca como maior produtor, participando com cerca de 81,8% das 14,741 milhões de toneladas produzidas na safra 2007/08, seguidos pelo Uruguai, com 8,8%; Argentina, com 8,5% e Paraguai, com 0,9%. O Brasil apresenta também o maior consumo per capita do Mercosul, com consumo de 36kg hab ano⁻¹, seguidos por Paraguai, Uruguai e Argentina com 11, 10 e 4 kg hab ano⁻¹ respectivamente (FAO). Dados da Conab estimam para a safra 2008/09 um volume total de 12,519 mil toneladas, com área plantada de 2,893 mil hectares e rendimento médio de 4.326 kg ha⁻¹.

No Brasil, o arroz é produzido em sistema de várzeas (terras baixas) e de sequeiro (terras altas). O sistema de várzeas apresenta condições ótimas para o desenvolvimento da cultura quanto à disponibilidade de água, predominando a irrigação controlada, onde alguns genótipos podem atingir produtividades de até 12 toneladas por hectare (PINHEIRO, 1999). O método de cultivo de várzeas responde com cerca de 40 % da área total cultivada com arroz, contribuindo com 68 % da produção nacional (CONAB, 2005) e com 86% de toda a produção de grãos deste cereal no mundo (LADHA et al. 1997). Já no sistema de sequeiro ou terras altas, as plantas tornam-se altamente

dependentes das chuvas para a realização de todos os processos fisiológicos que determinam a produção, e mesmo em condições favoráveis, a produtividade não ultrapassa 6 t.ha⁻¹ (PINHEIRO, 1999).

Alguns autores consideram que o arroz de sequeiro evoluiu a partir do arroz irrigado em função do deslocamento do homem de áreas baixas para locais mais elevados (CHANG & BARDENAS, 1965; O'TOOLE & CHANG, 1979). No entanto, YOSHIDA & HASEGAWA (1982), relataram que a pressão natural de seleção que é exercida no ecossistema de sequeiro induziu as alterações e adaptações sofridas pelas plantas, principalmente no sistema radicular, apresentando raízes longas e espessas. Apesar da redução na área plantada com arroz de sequeiro e as baixas produtividades, as pesquisas têm mostrado que, com a introdução das chamadas cultivares modernas (com porte baixo e folhas eretas), ocorre melhor aproveitamento dos nutrientes e aumento da capacidade fotossintética, refletindo numa maior produção de grãos (PINHEIRO, 1999).

2.2 ASPECTOS NUTRICIONAIS

A adubação nitrogenada foi identificada como o fator de maior índice de consumo de energia para produção agrícola (Ma & Dwyer, 1998). O desenvolvimento de estratégias de aplicação e reciclagem de N é importante para melhorar a eficiência de uso do elemento e aumentar as taxas de lucro de produtores sem provocar contaminações ambientais. Desse modo a aplicação racional de N deve equilibrar a eficiência energética e a proteção ambiental enquanto aumenta a lucratividade e a qualidade alimentar (Schröder et al., 2000).

Além do manejo do solo, em países de clima tropical como o Brasil, o nitrogênio é o elemento mineral mais importante para a produção das culturas. Embora presente em abundância na atmosfera (78%), na forma de N₂, este elemento não está prontamente disponível para as plantas, uma vez que a ligação tripla e covalente de sua molécula não pode ser rompida pelas plantas. Entre os processos que podem romper esta molécula,

tornando-a assimilável pelas plantas, o da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é o mais estudado em culturas de plantas leguminosas.

A partir da década de 70 é que os estudos envolvendo a associação de bactérias diazotróficas com as gramíneas se intensificaram. Esta época coincidiu também com a crise do petróleo, fazendo com que e o interesse por alternativas biológicas ao uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura fosse despertado (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Sendo assim, o maior potencial de fixação de nitrogênio nas gramíneas foi atribuído às bactérias diazotróficas de caráter microaerófilo. Estes microrganismos possuem a capacidade de mover-se no meio de cultura semi-sólido (DÖBEREINER et al., 1995) para sítios onde a difusão de O₂ está em equilíbrio com as necessidades respiratórias, uma vez que a enzima nitrogenase é extremamente sensível ao O₂. A presença da película desenvolvida na subsuperfície desses meios evidencia a habilidade que esses microrganismos têm de crescer na profundidade onde a pressão parcial do oxigênio é favorável (HUBBEL & GASKINS, 1984).

A eficiência do processo da FBN em plantas de leguminosas é facilmente visualizada na cultura da soja, onde até 94% do N requerido pelas cultivares mais produtivas pode ser fornecido pela FBN (HUNGRIA et al., 2006), colocando o Brasil entre os maiores produtores mundiais desta cultura. Por outro lado em plantas não-leguminosas, o processo da FBN não é tão eficiente quanto na cultura da soja, embora bactérias capazes de fixar nitrogênio atmosférico, como os gêneros *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Azospirillum*, tenham sido isoladas de plantas como arroz, trigo, milho, sorgo, cana de açúcar e *Brachiaria* spp. (ELBELTAGY et al., 2001; PERIN et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006; REIS JUNIOR et al., 2000; 2004) em vários experimentos.

O estabelecimento endofítico, quando comparado ao ambiente rizosférico, é considerado um processo importante, uma vez que por as bactérias podem influenciar de forma positiva o crescimento do hospedeiro; quando no interior do vegetal encontram um nicho com menor competição microbiana e menos sujeito a oscilações ambientais e a interface de troca de metabólitos é mais direta do que a encontrada no ambiente

rizosférico. Entre as bactérias há grande variabilidade inter e intraespecífica na capacidade de estabelecimento endofítico.

Algumas dessas espécies também são capazes de sobreviver tanto na planta quanto no solo. Em função disso, BALDANI et al., (1997) propuseram que o termo endofítico fosse subdividido em endofítico obrigatório e facultativo, possibilitando assim, a diferenciação dessas bactérias. Logo, as bactérias capazes de sobreviver no solo e de se estabelecer nas raízes das plantas foram denominadas de endofíticas facultativas, como é o caso do *Azospirillum*. Já aquelas que têm baixa capacidade de sobrevivência no solo e que colonizam raízes e parte aérea das plantas, foram chamadas de endofíticas obrigatórias.

Diversas gramíneas de interesse econômico, como milho, arroz e trigo, podem estar associadas com bactérias do gênero *Azospirillum*, *Burkholderia* e *Herbaspirillum*. Outro exemplo importante seria a associação de bactérias do gênero *Gluconacetobacter* com cana-de-açúcar. Nesta associação não ocorre a formação de uma estrutura especializada para a fixação do nitrogênio (nódulos) e as bactérias podem invadir ou não o tecido da planta através de ferimentos na epiderme, pontos de emissão de raízes secundárias e estômatos, sendo distribuída para o restante da planta via vasos condutores (REIS et al., 2006). Os produtos da fotossíntese são liberados pela planta, e absorvidos pelas bactérias que estão na rizosfera ou no interior da planta. As bactérias fixam o nitrogênio e transferem o NH_4^+ para a planta. Esta associação não é tão eficiente quanto à simbiose leguminosas-rizóbio e o mecanismo de liberação NH_4^+ da bactéria para a planta, ainda não está elucidado, já que não se sabe se a bactéria libera o N_2 fixado ou se este é liberado após a morte e lise da célula bacteriana. Além do que, devido à ausência de estruturas especializadas e a ampla distribuição em diferentes partes da planta, é difícil precisar o nicho da fixação.

As bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum*, fixadoras de nitrogênio atmosférico, que associadas à rizosfera das plantas podem, possivelmente, contribuir com a nutrição nitrogenada (BODDEY e DÖBEREINER, 1995). Conforme Cavalett et al. (2000), o efeito da bactéria *Azospirillum* spp. no desenvolvimento do milho e em outras gramíneas, tem sido pesquisado nos últimos anos, não somente quanto ao rendimento das culturas, mas também, com relação às causas

fisiológicas que, possivelmente, aumentam esse rendimento. Segundo Didonet et al. (1996), são muitas as evidências de que a inoculação das sementes de milho com *A. brasiliense* seja responsável pelo aumento da taxa de acúmulo de matéria seca, o que parece estar relacionado com o aumento da atividade das enzimas fotossintéticas e de assimilação de nitrogênio. Além do efeito sobre a cultura, a bactéria possui ainda os seguintes benefícios como inoculante: a bactéria é endofítica, ou seja, penetra na raiz das plantas; apresenta antagonismo a agentes patogênicos; produz fitormônios; não é muito sensível às variações de temperatura e ocorre em todos os tipos de solo e clima (ARAUJO, 2008).

2.3 DILUIÇÃO ISOTÓPICA DE ^{15}N

Nos estudos sobre a dinâmica do nitrogênio no sistema solo-planta, muitas vezes, é difícil quantificar a origem deste nutriente. As análises com isótopos estáveis têm sido uma ferramenta ecológica que dentre outras aplicações, pode ser utilizada no estudo da dinâmica dos nutrientes no sistema solo-planta (FIGUEIREDO et al., 2005). O uso de uma fonte marcada com ^{15}N constitui-se no método que permite quantificar com maior precisão a eficiência de utilização deste nutriente e a fonte originária, seja solo, fertilizantes orgânicos ou inorgânicos, imprescindível ao desenvolvimento de estratégias de manejo que aumentem o seu aproveitamento pelas culturas (SILVA et al., 2006). Vários estudos já foram conduzidos para testar os efeitos de fungos micorrízicos arbusculares sobre a absorção de nutrientes pelas plantas. Entretanto, revisões de literatura sugerem que a função do FMA na aquisição de N pela planta é variável. Enquanto alguns pesquisadores consideraram a contribuição do FMA pouco significativa na absorção deste elemento, outros acreditavam que as associações micorrízicas podem ser importantes na nutrição de N das plantas. Segundo Faquin (1988), parece que a absorção de N do solo pelas hifas dos FMAs não é suficiente para atender às exigências das plantas. Contudo, Johansen et al. (1994) verificaram, em trabalho

desenvolvido com pepino e com o fungo micorrízico *Glomus intraradices*, a capacidade das hifas de transportar N em quantidade suficiente para aumentar, significativamente, o crescimento das plantas.

O uso de uma fonte marcada com ^{15}N constitui-se no método que permite quantificar com maior precisão, comparado ao método da diferença, a utilização deste nutriente. Além disso, possibilita distinguir a fonte originária, seja solo ou fertilizante (LARA CABEZAS et al., 2000; SILVA et al., 2006b), podendo contribuir para a tomada de decisão quanto ao manejo da adubação nitrogenada (DUETE, 2008).

Atualmente a técnica disponível mais aceita no meio científico para quantificar a FBN numa cultura é a da diluição isotópica de ^{15}N (BODDEY e URQUIAGA, 1992). Esta técnica tem a vantagem de permitir quantificar a contribuição da FBN no ciclo da cultura, do plantio até a colheita, e de se avaliar o N fixado que foi incorporado dentro da planta. Por esta técnica então, pode-se medir o benefício da FBN durante o crescimento das plantas (PEOPLES et al., 1989). A técnica É baseada na alteração da proporção natural entre os isótopos ^{15}N e ^{14}N , acrescentando-se ao substrato das plantas a serem testadas adubos nitrogenados artificialmente enriquecidos (at.% $^{15}\text{N} > 0,3663$) em proporção conhecida, ou seja, adubos com nitrogênio marcados. Neste caso plantas que obtenham nitrogênio de um solo onde foi adicionado nitrogênio marcado possuirão um enriquecimento em ^{15}N semelhante ao do solo. Por outro lado, plantas que obtenham além do N marcado proveniente do solo, N atmosférico (não marcado), sofrem uma diluição no seu enriquecimento em ^{15}N (XAVIER, 2006). Quanto maior a magnitude da diluição, maior a quantidade de N atmosférico incorporado e, por conseguinte, maior a contribuição da FBN.

A técnica de diluição isotópica de ^{15}N depende de um fator básico: plantas fixadoras e testemunha devem absorver nitrogênio do solo com a mesma marcação. Além disso, outras entradas de nitrogênio no sistema solo-planta como água de irrigação, chuvas, agroquímicos, fertilizantes nitrogenados devam ser de magnitudes desprezíveis, ou iguais tanto para a planta fixadora de N_2 como para a planta testemunha. A planta testemunha não deve fixar nenhum “nitrogênio atmosférico”, ou a

quantidade de nitrogênio fixado deve ser desprezível em relação à quantidade fixada pela planta teste. As estimativas da fixação biológica de nitrogênio usando-se a técnica de diluição isotópica de ^{15}N com espécies não leguminosas são relativamente recentes. Em gramíneas, a técnica tem sido aplicada em forrageiras (BODDEY e VICTORIA, 1986), cana-de-açúcar (LIMA, 1987) e arroz (OLIVEIRA, 1994; CAMPOS, 1999).

Do mesmo modo, nos últimos anos a técnica da abundância natural de ^{15}N vem ganhando destaque em nível de campo baseando-se no fato de que geralmente, o N do solo é levemente enriquecido com o isótopo ^{15}N em comparação ao N atmosférico (SHEARER e KOHL, 1986). Na atmosfera o nitrogênio possui ao redor de 0,3663% de ^{15}N e o 99,6337% de ^{14}N (JUNK et al., 1958, citados por Alves, 1996). No entanto, devido a discriminação isotópica que ocorre durante as transformações do nitrogênio no sistema solo-planta, ambos podem apresentar valores de ^{15}N um pouco maiores que os encontrados na atmosfera (SHEARER e KOHL, 1986).

3. CAPITULO I

INOCULAÇÃO DE ARROZ DE SEQUEIRO COM ISOLADOS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM CASA DE VEGETAÇÃO

RESUMO

A cultura do arroz é altamente exigente em nutrientes, necessitando que estejam prontamente disponíveis para uso não prejudicando o crescimento vegetal da cultura. Fertilizantes nitrogenados são utilizados em grande quantidade na produção agrícola mundial e demandam grande consumo energético para sua produção industrial. Na maior parte das áreas agrícolas onde o arroz é cultivado, o nitrogênio é o principal fator limitante a produtividade, constituindo a maior fração do custo de produção. A seleção e o uso de genótipos de arroz com maior eficiência na absorção de nitrogênio devem ser priorizados nos atuais sistemas produtivos, visando diminuir custos de produção e aumentar a produtividade de grãos e reduzir os impactos negativos do uso excessivo de fertilizantes nitrogenados sobre o ambiente. Com o objetivo de avaliar o potencial de inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento em genótipos crioulos de arroz de sequeiro. Foi montado um experimento em casa de vegetação com quatro genótipos de arroz de sequeiro sendo um genótipo proveniente da Estação Experimental de Itajaí – Epagri (variedade SCS115CL – cultivada no sistema irrigado), dois genótipos provenientes do município de São José do Cerrito/SC (variedade amarelão e agulhinha) e um genótipo proveniente da Estação Experimental de Lages – Epagri (variedade amarelão – ARA2); quatro rizobactérias promotoras de crescimento (Ai27 – gênero Azospirillum, Fe27 – gênero Pseudomonas, Fe34 – gênero Rizobium, ambas provenientes da coleção de bactérias endofíticas do LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA E FAUNA DO SOLO, CAV/UDESC e um inoculante comercial - Abv5/Abv6 a base de bactérias do gênero azospirillum); e com a condição

não inoculada. Por ocasião da colheita foram coletadas a parte aérea das plantas para a determinação de matéria seca e o teor de N e P, e coletado raízes para determinação de matéria seca e para a relação Raiz/Parte Aérea. O inoculante Fe27 (*Pseudomonas sp.*) foi mais eficiente em acumular fósforo no tecido vegetal de arroz de sequeiro comparado aos outros inoculantes e ao controle sem inoculação. Os genótipos crioulos foram mais eficientes do que a variedade de arroz irrigada na absorção e acumulo de nitrogênio no tecido vegetal.

Palavras-chave: Rizobactérias promotoras de crescimento. Fixação biológica de nitrogênio. Nitrogênio.

INOCULATION OF UPLAND RICE WITH ENDOPHYTIC BACTERIA IN GREENHOUSE

ABSTRACT

Rice cultivation is highly demanding in nutrients, necessitating that are readily available for use does not impair plant growth culture. In most agricultural areas where rice is grown, nitrogen is the main limiting factor productivity, constituting the largest fraction of the cost of production. The selection and use of rice genotypes with greater efficiency in the absorption of nitrogen should be prioritized in current production systems in order to reduce production costs and increase yield and reduce the negative impacts of excessive use of nitrogen fertilizers on the environment. An experiment was set in a greenhouse with four genotypes of upland rice being a genotype from the Experimental Station of Itajai - Epagri (SCS115CL variety - grown in irrigated system), two genotypes from the city of São José do Cerrito / SC (variety yellowing and Agulhinha) and a genotype from the Experimental Station Lages - Epagri (yellowing variety - ARA2), four growth promoting rhizobacteria (Ai27 - Azospirillum, Fe27 - Pseudomonas, Fe34 - genus Rhizobium, both from the collection of endophytic bacteria the LAB MICROBIOLOGY AND SOIL FAUNA, CAV / UDESC and inoculant - Abv5/Abv6 the basis of Azospirillum bacteria) and not inoculated with the condition. At harvest were collected aerial parts of the plants for the determination of dry matter and N and P, and roots collected for determination of dry matter and the ratio of root / shoot. The inoculant Fe27 (Pseudomonas sp.) was more efficient in accumulating phosphorus in plant tissue in upland rice compared to other inoculant and the uninoculated controls. Genotypes Creoles were more efficient than the variety of irrigated rice in the absorption and accumulation of nitrogen in plant tissue.

Key words: Growth promoting rhizobacteria. Biological nitrogen fixation. Nitrogen.

3.1 INTRODUÇÃO

A cultura do arroz é altamente exigente em nutrientes, necessitando que estejam prontamente disponíveis para uso não prejudicando o crescimento vegetal da cultura. Fertilizantes nitrogenados são utilizados em grande quantidade na produção agrícola mundial e demandam grande consumo energético para sua produção industrial. Na maior parte das áreas agrícolas onde o arroz é cultivado, o nitrogênio é o principal fator limitante a produtividade, constituindo a maior fração do custo de produção. Depois do potássio, o nitrogênio é o nutriente que a planta de arroz mais demanda e acumula. Desse modo o uso racional do nitrogênio se torna de extrema importância para o aumento da produtividade do arroz, além da sustentabilidade do sistema produtivo. O nitrogênio está presente na clorofila, com expressiva participação no aumento da área foliar da planta, a qual aumenta a eficiência na interceptação da radiação solar e a taxa fotossintética e, consequentemente, a produtividade de grãos (FIDELIS et al.. 2012).

A seleção e o uso de genótipos de arroz com maior eficiência na absorção de nitrogênio devem ser priorizados nos atuais sistemas produtivos, visando diminuir custos de produção e aumentar a produtividade de grãos e reduzir os impactos negativos do uso excessivo de fertilizantes nitrogenados sobre o ambiente. Com a necessidade de aumento da produção de alimento para a população mundial é indispensável que a eficiência na utilização desses fertilizantes seja alta e que seja mantido o equilíbrio ecológico do ambiente produtivo. O uso de rizobactérias promotoras de crescimento em planta (RPCP) possui grande potencial. Essas bactérias possuem a capacidade de colonizar raízes e outros tecidos internos da planta, sendo consideradas promotoras de crescimento vegetal, além de outros efeitos benéficos, como no aumento da disponibilidade de nutrientes às plantas, ou seja, pela solubilização de fosfatos inorgânicos, ou pela fixação biológica de nitrogênio, promovendo o incremento no crescimento de raízes, favorecendo a absorção de nutrientes e água.

Na ultima década, pesquisas tem demonstrado que o estabelecimento endofítico de bactérias desempenha um

importante papel fisiológico no crescimento da planta hospedeira, como: biocontrole de fitopatógenos, supressão de doenças por indução de resistência localizada e/ou sistêmica, melhoria da nutrição nitrogenada via FBN e promoção de crescimento (MIRZA et al., 2001). Microrganismos endofíticos, definidos como aqueles que passam pelo menos parte de seu ciclo de vida dentro do tecido vegetal da planta hospedeira, sem que a planta apresente sintomas de doenças. A presença destas bactérias nas plantas tem sido associadas à promoção de crescimento de varias culturas, como batata (STURTZ, 1995), batata doce (REITER et al., 2003) milho (HINTON e BACON, 1995), arroz (VERMA, et al., 2001). Por se tratar de microrganismos, as rizobactérias adicionadas ao solo podem apresentar comportamento diferenciado em virtude das condições do ambiente, do clima e dos níveis de nutrientes do solo, influenciando a estabilidade, a sobrevivência e a sua atuação, podendo não gerar os efeitos benéficos esperados da interação bactéria-planta.

Para as gramíneas, as maiores contribuições da FBN foram atribuídas às bactérias que possuem a capacidade de estabelecer-se de forma endofítica. Isso quer dizer que, uma vez dentro da planta, não causam danos nem induzem sintomas. Além disso, podem ser isoladas de tecidos vegetais superficialmente desinfestados ou extraídas do interior da planta (KLOEPER et al., 1997). Essa bactérias diazotróficas endofíticas podem associar-se à cana-de-açúcar naturalmente ou podem também ser inoculadas para promover efeitos benéficos. Oliveira et al. (2006) avaliaram o efeito da inoculação de misturas bacterianas em material micropropagado de duas variedades de cana-de-açúcar e verificaram resposta positiva sobre a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), com contribuição média de aproximadamente 30% do nitrogênio acumulado. Esses resultados indicam que a combinação de espécies bacterianas no inoculante é uma estratégia viável para melhorar a FBN e a produtividade da cultura.

A produção de fitormonios por bactérias é um dos fatores responsáveis pelo efeito estimulatório observado no crescimento de plantas, como encontrado em estudo com inoculação de estirpes de *Azospirillum*. O principal hormônio produzido por estirpes desse gênero é uma auxina, o ácido 3-indolacético

(AIA), além de outros compostos indólicos e de citoquininas e giberelinas. Há pelo menos três vias biossintéticas descritas para a produção de AIA em *Azospirillum*, sendo 2 dependentes de triptofano, como a via índole-3-acetamida (IAM) e a indole-3-piruvato (IpyA), e uma independente de triptofano (Lambrecht et al., 2000).

Bactérias diazotróficas com caráter microaerófilico apresentam grande potencial para fixação do nitrogênio atmosférico, como exemplos têm as dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Glucanobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus*, sendo colonizadoras de partes internas de raízes e parte aérea dessas gramíneas. Esses microrganismos associadas às gramíneas apresentam penetração passiva na planta, conseguindo acessar o interior vegetal através de ferimentos, de sítios de emergência das raízes, coifa e estômatos nas folhas, espalhando-se pelos tecidos radiculares via apoplasto, colonizando os espaços intercelulares das células da hipoderme, córtex radicular e parede do aerênquima (PERIN, et al., 2003).

Na agricultura dos trópicos, onde se encontra solos com baixa fertilidade natural, onde os solos são deficientes em nutrientes principalmente N e P e em países desenvolvidos onde se busca uma agricultura mais sustentável ecologicamente, ocorre à busca de alternativas para a redução do uso descontrolado de fertilizantes químicos industrializados que elevam os custos de produção e agredem ao meio ambiente. A alternativa é baseada no estudo de microrganismos que utilizem nutrientes do solo e da atmosfera e o disponibilizem para as plantas. A produção de soja no Brasil é um exemplo claro de que a utilização de microrganismos na agricultura é benéfica, onde a fixação biológica de nitrogênio (FBN) apresenta incremento quando inoculadas com bactérias do gênero *Rizobium* sp, fixando o nitrogênio necessário para todo o ciclo da cultura, mantendo o mesmo nível de produtividade do sistema com adição de fertilizante nitrogenado.

Com a intenção de obter incremento no crescimento e no rendimento de plantas é utilizado rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP), onde os microrganismos fornecem à planta compostos sintetizados utilizados para seu crescimento, além de facilitarem a captação de nutrientes do solo. As RPCP atuam direta e indiretamente no crescimento das

plantas. Podem fixar nitrogênio atmosférico, produzir hormônios e ou solubilizar minerais como o fósforo disponibilizando para as plantas, além de ações indiretas como a supressão de doenças (CERIGIOLI, 2005). O processo de promoção de crescimento vegetal por bactérias é complexo, podendo ser influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos. Desse modo, os estudos sobre ecologia microbiana que buscam contribuir para o conhecimento sobre os processos interativos no ambiente podem auxiliar o entendimento dos mecanismos envolvidos.

No uso de *Azospirillum* foram encontradas respostas positivas à inoculação em plantas, mesmo quando cultivadas com altos níveis de nitrogênio, indicando que a resposta da planta não ocorre apenas em razão do N fixado, mas, também, da produção de outras substâncias (DOBBELAERE et al., 2003). As auxinas estão entre as substâncias promotoras de crescimento produzidas pelo azospirillim, dentre as quais o ácido indolacético (AIA) é a mais ativa e caracterizada, sendo conhecido por produzir aumento da elongação celular e diferenciação celular. Também há evidências que isolados de microrganismos rizossféricos são capazes de sintetizar reguladores de crescimento vegetal in vitro e que isolados de diferentes plantas associados às raízes são mais eficientes na produção de auxina do que os não associados às plantas. Bactérias do gênero *Azospirillum* contribuem para o desenvolvimento vegetal por meio da FBN e produção de substâncias reguladora de crescimento vegetal. A promoção de crescimento se dá pelo aumento do tamanho e da superfície radicular, com consequente incremento na eficiência de absorção de água e nutrientes do solo (BASHAN et al., 2004). Segundo Gomes et al., a inoculação de sementes de arroz de sequeiro com estirpes de *Azospirillum lipoferum* Sp 59 e *Azospirillum brasiliense* Sp 245 influencio positivamente no comprimento de raízes e numero de raízes secundárias do arroz de sequeiro, havendo incremento no comprimento radicular em resposta a inoculação.

Experimentos com inoculação de *Herbaspirillum* spp. em solo não estéril em casa de vegetação, mostram que estes microrganismos podem ser introduzidos no interior da planta de arroz via aplicação de inoculantes nas sementes antes da germinação. Dobereiner & Baldani (1995) observaram que

estirpes de *Herbaspirillum* spp. quando inoculados em plântulas de arroz cultivados em solução com nitrogênio marcado, contribuíram com aumentos de 40% no N-total acumulado na plântula. No entanto quando realizado em casa de vegetação os aumentos foram de 17 e 19% do N incorporado na planta pela FBN, quando inoculados com estirpes de *H. seropediae* e *B. brasiliensis* (BALDANI et al., 2000).

Rodrigues et al. (2008) analisaram o efeito da inoculação de sementes de arroz com estirpes de *Azospirillum amazonense* isoladas de planta de arroz irrigado, cultivadas em casa de vegetação. Os tratamentos inoculados com *A. amazonense* apresentaram maior número de panículas por vaso em comparação com os tratamentos controles não inoculados e adubados com nitrogênio. 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 a capacidade de promoção de crescimento de 03 isolados do gênero *azospirillum* 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 nos tratamentos sem aplicação de N aumentou o peso seco de parte aérea das plântulas em até 14,8% em comparação ao tratamento controle.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido em casa-de-vegetação, no Centro de Ciências Agrárias-CAV, da Universidade do Estado de Santa Catarina no período de 06/02/2011 a 06/05/2011, seguindo um arranjo fatorial (5x4), onde foram testados 5 tratamentos de inoculação com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (não-inoculado – NI; isolado de *Azospirillum* spp - Ai27, de *Pseudomonas* spp. - Fe27, de *Rhizobium* spp. – Fe34 e inoculante comercial a base de *Azospirillum* –Abv5/abv6 em quatro genótipos de arroz de sequeiro, sendo um genótipo proveniente da Estação Experimental de Itajaí – Epagri

(variedade SCS115CL – cultivada no sistema irrigado), dois genótipos provenientes do município de São José do Cerrito-SC (variedade amarelão e agulhinha) e um genótipo proveniente da Estação Experimental de Lages – Epagri (variedade amarelão – ARA2).

O delineamento utilizado foi completamente casualizados com 05 repetições. Os isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (Ai27, Fe27 e Fe34) são provenientes da coleção de rizobactérias do laboratório de microbiologia e fauna do solo, onde o isolado Ai27 foi isolado e purificado no trabalho de Cardoso (2008) sobre seu estudo de diversidade e ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* na cultura do arroz irrigado e por Blanchet (2012), avaliando a disponibilidade de N em função da inoculação de bactérias promotoras de crescimento na cultura do arroz irrigado. Os isolados Fe27 e Fe34 foram estudados por Sei (2012) em seu trabalho de diversidade de rizobactérias em feijoeiro. O inoculante a base de bactérias do gênero *Azospirillum*, estirpes Abv5/abv6 foi fornecido pela empresa produtora de inoculantes Novozymes, produtora e comercializador de inoculantes comerciais.

Entre os genótipos utilizados no experimento, o SCS115CL é utilizado na produção de arroz irrigado, sendo uma variedade melhorada. Os genótipos amarelão e agulhinha provenientes do município de São José do Cerrito-SC são produzidos por agricultores familiares em um sistema de produção para subsistência, onde parte é destinada ao consumo próprio e parte para a produção de sementes para a próxima safra. O genótipo ARA2 – amarelão é um genótipo crioulo proveniente do banco de sementes da Estação experimental da Epagri de Lages-SC.

Na execução do estudo foi produzido os inoculantes das estirpes Ai27, Fe27 e Fe34 no laboratório de microbiologia do solo no Centro de Ciências Agrarias – CAV em meio de cultura tipo “DYGS”, e após, sua concentração foi ajustada para 10^9 UFC ml⁻¹ com solução de sacarose. As sementes foram pré-germinadas antes da semeadura e após a germinação foram inoculadas com os inoculantes específicos por um período de 30 minutos e plantadas em seguida.

O plantio foi realizado com 05 sementes pré-germinadas e inoculadas e após o estabelecimento das mudas foi realizado o

desbaste das plantas com menor desenvolvimento, deixando-se 03 plantas equidistantes até o momento da coleta dos dados. As plantas foram crescidas em vasos de 04 kg, contendo uma mistura de solo e areia (2:1; v/v). O solo utilizado foi um Nitossolo vermelho, coletado no município de Capão Alto - SC, nas coordenadas 27°53'50,73"S e 50°25'44,04"O, apresentando teor de argila de 79 % e 0,9 % de matéria orgânica, com pH natural de 4,9, teor de P de 0,9 mg dm⁻³, teor de K de 89 mg dm⁻³ e CTC efetiva de 5,4 cmolc dm⁻³. O solo foi peneirado e o seu pH foi corrigido para 5,8 com a adição de carbonato de cálcio.

A adubação com N, P e K foi realizada de acordo com o Manual de Adubação e Calagem para o RS e SC, 2004, para uma produtividade média de 2000 kg ha⁻¹. Foi utilizado solução de uréia, fosfato de potássio e cloreto de potássio correspondente a uma dose de 40 kg ha⁻¹ de N, 60 kg ha⁻¹ de K e 100 kg ha⁻¹ de P antes da semeadura.

Por ocasião da colheita, 90 dias após a semeadura, foram coletadas a parte aérea das plantas e o sistema radicular para a determinação da massa seca. Foram determinados os teores de N e P na massa seca da parte aérea, extraídos segundo as metodologias descritas em Tedesco et al. (1995) e a determinação de N pelo método Kjeldahl e o P segundo Gatiboni (2003). Com base na massa seca da parte aérea e das raízes determinou-se a relação Parte aérea/Raiz.

Os dados foram submetidos à análise de variância fatorial e as médias das variáveis foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de significância quando necessário.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com base na análise de variância das variáveis de resposta estudadas (Tabela 1) verificou-se interação entre os tratamentos de inoculação e os genótipos de arroz testados para Massa seca da parte aérea (MSPA), Massa seca de raízes (MSR), e para a relação Parte aérea/raiz (PA/R). Quanto aos teores de P nas plantas verificaram-se diferenças apenas entre os tratamentos de inoculação. Para os teores de N na parte

aérea foram observados efeitos apenas entre os genótipos utilizados no estudo.

Tabela 1: Análise de variância e fontes de variação em genótipos crioulos de arroz de sequeiro inoculados com bactérias diazotróficas endofíticas.

Fontes de Variação	MSPA (g vaso ⁻¹)	MSR (g vaso ⁻¹)	PA/R	Teor de P (%)	Teor de N (%)
Genótipo	*	*	ns	ns	*
Inoculante	*	Ns	*	*	ns
Genot*Inoc.	*	*	*	ns	ns

Fonte: Produção do próprio autor.

Com base na MSPA (Tabela 2) observou-se que nos genótipos de arroz Agulhinha e Amarelão a inoculação com os isolados testados não promoveu o crescimento das plantas em relação ao tratamento não inoculado (controle). O mesmo comportamento foi observado na MSR destes genótipos (Tabela 2). No genótipo amarelão-ARA2, a inoculação do isolado Ai27 promoveu maiores produções de fitomassa do arroz, tanto na parte aérea com nas raízes deste genótipo. Estes aumentos foram da ordem 383,33% para MSPA e 985,71% para MSR em relação ao tratamento controle. Na variedade de arroz SCS115CL observou-se uma tendência de maior produção de MSPA com a inoculação do isolado Fe27, com aumentos de 129,54% em relação ao controle.

Os tratamentos foram submetidos à adubação com N, P e K de acordo com o recomendado para a cultura, não sendo realizados tratamentos com doses específicas para a adubação nitrogenada. Fato este reflete os dados obtidos na Tabela 2, onde se verificou que ao avaliarmos os 04 inoculantes com o tratamento sem inoculação, obtiveram-se valores médios muito próximos a este último em todos os genótipos de arroz de sequeiro, com exceção ao genótipo crioulo Amarelão-ARA2. Para este genótipo o tratamento que se destacou sobre os demais foi o inoculante produzido com bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Azospirillum sp.* (Ai27) com 1,15 g vaso⁻¹ de MSPA contra 0,30 g vaso⁻¹ para o tratamento sem inoculação,

isso pode evidenciar o potencial do uso de bactérias do gênero *Azospirillum* na cultura do arroz de sequeiro mesmo com a utilização de nitrogênio. Corroborando com Araújo et al. (2013) que estudando a inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento em variedades de arroz de sequeiro verificou um incremento de massa seca de 48, 28 e 21% em três genótipos de arroz de sequeiro crescidos em condições gnotobioticas e inoculadas com *Azospirillum amazonense*, estirpe AR3122 comparadas com o tratamento controle, também observou nesse experimento que a resposta a inoculação com as diferentes estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas foram dependentes das variedades de arroz de sequeiro utilizadas, assim com a Tabela 2 mostra as diferenças entre os genótipos avaliados em cada tratamento de inoculação.

Outro fato que pode ser evidenciado na analise dos dados presentes na Tabela 2 diz respeito ao potencial do uso de bactérias diazotróficas endofíticas e o uso de adubação nitrogenada, uma vez que os dados mostram que os valores de MSPA não diferiram entre si quando comparados os inoculantes e o tratamento sem inoculação. Além do fato de que não houve uso de doses de N diferenciadas entre os tratamentos de inoculação, sugerindo desse modo que o uso de adubação nitrogenada recomendada no caso do arroz de sequeiro pode alterar o potencial de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a produção de fitormônios de crescimento das bactérias diazotróficas endofíticas. Assim como Rodrigues et al. (2008), que trabalhando com inoculação de estirpes de *Azospirillum amazonense* na cultura de arroz, observou aumentos de 16% na matéria seca do arroz quando foi inoculado com estirpe *A. Brasilense* e a matéria seca de grãos tambem apresentou efeito positivo da inoculação com *A. Amazonense* estirpes BR 11833 e BR11752 em até 10%; observou tambem redução de 10 e 11,5% para matéria seca no uso de isolados BR11741 e da estirpe CD em 10 e 11,5% da matéria seca dos grãos respectivamente. Os valores de massa seca de raiz (MSR) nos genótipos de arroz de sequeiro estudados variaram de 0,21 g vaso⁻¹ no genótipo crioulo amarelão-ARA2 sem inoculação a 2,73 g vaso⁻¹ para o genótipo crioulo amarelão inoculado com formulação de inoculante a base de bactérias do gênero *azospirillum* das estirpes abv5/abv6 (Tabela 2)

Tabela 2 - Massa Seca de Parte Aérea, Massa Seca de Raiz e Relação Parte aérea/Raiz de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas.

Genótipos	Massa Seca de Parte Aérea (g^{-1})					MÉDIA
	Sem inoculação	Ai27	Fe27	Fe34	Abv5/abv6	
Amarelão	1,43 aA*	0,63 bB	1,29 aA	0,74 aB	1,14 aA	1,05
Amarelão-ARA2	0,30 cC	1,15 aA	0,78 bB	0,64 aBC	0,48 bBC	0,67
Agulhinha	0,50 cA	0,75 bA	0,83 bA	0,49aA	0,67 bA	0,65
SCS115CL	0,88 bAB	0,94 abAB	1,14 abA	0,79 aAB	0,72 bB	0,89
MÉDIA	0,77	0,86	1,01	0,66	0,75	
Massa Seca de Raiz (g^{-1})						
Amarelão	2,12 aAB	0,65 bC	1,57 aBC	0,93 aC	2,73 aA	1,60
Amarelão-ARA2	0,21 bC	2,07 aA	1,26 aAB	0,79 aBC	0,84 bBC	1,20
Agulhinha	0,76 bA	1,07 bA	1,31 aA	0,52 aA	0,89 bA	0,91
SCS115CL	0,77 bA	1,17 bA	1,32 aA	1,24 aA	0,94 bA	1,09
MÉDIA	0,96	1,24	1,36	0,87	1,35	
Relação PA/R						
Amarelão	1,47 aB	1,03 bB	1,13 aB	1,23 aB	2,33 AA	1,44
Amarelão-ARA2	0,65 bB	1,80 aA	1,73 aA	1,18 aAB	1,30 bA	1,33
Agulhinha	1,28 abA	1,38 abA	1,58 aA	1,08 aA	1,30 bA	1,32
SCS115CL	0,88 ab A	1,23 abA	1,15 aA	1,58 aA	1,23 bA	1,21
MÉDIA	1,07	1,36	1,39	1,26	1,54	

Fonte: Produção do próprio autor. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância

Para o genótipo irrigado – SCS115CL e o genótipo crioulo agulhinha a MSR não mostrou diferença significativa entre os tratamentos de inoculação, ou seja, a inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas não promoveu incremento de MSR a esses genótipos quando comparados ao tratamento sem inoculação. Esse fato deve ser devido ao efeito inibitório da aplicação da dose de nitrogênio recomendada para a cultura na semeadura e em cobertura. No caso dos genótipos crioulos, amarelão e amarelão-ARA2, a MSR mostrada na Tabela 2 apresentou variação entre os inoculantes avaliados, sendo que para o genótipo amarelão o peso de MSR foi de 0,65; 0,93 e 1,57 g vaso⁻¹ para os inoculantes dos gêneros *Azospirillum* (Ai27), *Rhizobium* (Fe34) e *Pseudomonas* (Fe27), respectivamente, diferindo dos 2,12 e 2,73 g vaso⁻¹ nos tratamentos sem inoculação e inoculados com estirpes de *Azospirillum* abv5/abv6, evidenciando um efeito negativo do uso da adubação nitrogenada recomendada sobre o potencial de promoção de crescimento dessas 03 bactérias para o genótipo crioulo. Em contrate, o genótipo crioulo amarelão-ARA2 (EEL-Epagri) apresentou comportamento distinto de seu similar (amarelão), onde a variação foi de 1,26 e 2,7 g vaso⁻¹ nos inoculantes Fe27 e Ai27 respectivamente, diferindo dos 0,84; 0,79 e 0,21 g vaso⁻¹ dos respectivos inoculantes abv5/abv6, Fe34 e sem inoculação. Mostrando desse modo o efeito dos genótipos sobre os inoculantes utilizados e o potencial do uso desses dois inoculantes sobre o crescimento do sistema radicular do genótipo amarelão-ARA2. No caso do inoculante Fe27 oriundo de estirpes de *Pseudomonas*, o efeito obtido pode ser devido à produção de fitormônios de crescimento e da solubilização de fosfatos como observado por Biari et al. (2008) que estudando a inoculação de sementes de milho com *Azospirillum lipoferum* s-21 e *Azotobacter chroococcum* s-5 observaram aumento no crescimento e rendimento de milho quando inoculados com as duas estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas, sendo o resultado explicado pela capacidade de FBN e solubilização de fosfatos pelas bactérias.

Egamberdiyeva (2007) estudando a inoculação de *Pseudomonas alcaligenes* PsA15, *Bacillus polymyxa* BcP26 e *Mycobacterium phlei* MbP18 na cultura do milho, observou que a inoculação com essa bactéria aumentou a MSPA (17 a 30%) e

MSR (19 a 52%) respectivamente para *P. alcaligenes* e *B. polymyxa* em um calcisol quando comparado com o tratamento controle e o *M. phlei* foi mais efetivo na estimulação do crescimento, aumentando em 38% a matéria seca total do milho.

No caso do inoculante Ai27 os efeitos benéficos podem ser devidos também à produção de fitormônios de crescimento, além da FBN promovidas por bactérias do gênero *Azospirillum* como relatado por Biari et al. (2008) onde a inoculação de milho com estirpes de *azospirillum* e *Azotobacter* aumentaram significativamente o teor de N e P nos grão de milho, indicando uma maior absorção de N e P pela planta, indicando a habilidade de FBN, solubilização de fosfato e promoção de crescimento dessas bactérias (DOBBELAERE et al. 2001). Além de que as diferenças evidenciadas também podem apontar para uma maior especificidade entre genótipos crioulos e bactérias diazotróficas endofíticas e do fato do genótipo amarelão-ARA2, mesmo sendo crioulo, já ter passado por um processo de produção e purificação de sementes, diferindo do que ocorre nas propriedades dos pequenos produtores rurais da região serrana de Santa Catarina.

Do mesmo modo Didonet et al. (2003) estudando a inoculação de bactérias da estirpe de *Azospirillum lipoferum* Sp 59 e de *Azospirillum brasilense* Sp 245, e um tratamento controle sem a presença das bactérias em 10 variedades de arroz de terras altas ou de sequeiro, evidenciou o incremento no comprimento radicular, em resposta à inoculação para as variedades de arroz de terras altas avaliadas. Assim como plântulas de arroz das variedades BRS Aimoré e BRS Bonança inoculadas com *A. brasilense* Sp 245 apresentaram significativo aumento do número de raízes secundárias quando comparadas às inoculadas com *A. lipoferum* Sp 59 e ao controle. Plantas das variedades Caiapó e BRS Talento, entretanto, não foram influenciadas pela inoculação quanto ao número de raízes secundárias. Ainda em relação a este parâmetro, as demais variedades responderam positivamente à inoculação, sem apresentar diferença estatisticamente significativa para as duas estirpes de *Azospirillum*. Assim com já foram observados vários efeitos na morfologia das raízes, como aumento no comprimento, no número e na superfície, aumento na absorção de nutrientes, que podem estar relacionados com substâncias promotoras de

crescimento secretadas pela bactéria (Martin et al., 1989). Dobbelaere et al. (1999) verificaram aumento nos pêlos radiculares de plantas de trigo decorrente de auxinas secretadas por *Azospirillum* sp. Além disso, Bhattacharai & Hess (1998) concluíram que, ao lado da FBN, o efeito de estimulação do crescimento pela bactéria no desenvolvimento das raízes, nos primeiros estádios de crescimento da planta, pode ser responsável pelo impacto positivo da inoculação em trigo.

A relação parte aérea/raiz (Tabela 2) reflete a capacidade genética de algumas plantas em desenvolver um sistema radicular adaptado a condições de estresse ou com características favoráveis à absorção de água e de sais minerais, evidenciando que a absorção e utilização de dado elemento não dependem apenas dos parâmetros fisiológicos, mas também de parâmetros morfológicos. Assim como reportado por diversos autores (Baptista et al., 2000; Horn et al., 2006), a determinação da relação parte aérea/raiz auxilia na compreensão de possíveis diferenças entre cultivares de arroz quanto à absorção de nutrientes.

Os inoculantes avaliados apresentaram diferenças significativas entre os genótipos de arroz de sequeiro, mostrando haver genótipos mais responsivos ao uso de bactérias diazotróficas endofíticas, que devem ser considerados e avaliados de modo a maximizar esse efeito e aumentar os rendimentos produtivos para a cultura e um maior ganho econômico para os produtores rurais. O genótipo Agulhinha e SCS115CL-irrigado não apresentaram diferenças significativas para a variável relação PA/R em relação aos inoculantes avaliados conforme pode ser observado na Tabela 4, variando de 0,88 na variedade SCS115CL a 1,58 para o genótipo Agulhinha e a variedade SCS115CL (Tabela 2). O genótipo crioulo amarelão apresentou o maior valor de relação PA/R (2,33) quando inoculados com as estirpes Abv5/abv6, comparado com os outros inoculantes que apresentaram valores de 1,03 para o Ai27, 1,13 no Fe27, 1,23 para Fe34 e 1,47 no tratamento sem inoculação (Tabela 2). Estes valores podem refletir a maior especificidade e eficiência na interação entre o genótipo crioulo amarelão e o inoculante Abv5/abv6 quando comparado aos outros tratamentos. Outro caso do efeito positivo da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas pode ser verificado com o

genótipo crioulo amarelão-ARA2 (Tabela 2) que apresentou valores de 1,80 no tratamento com Ai27; 1,73 com Fe27, 1,63 com Abv5/abv6 e 1,18 com Fe34 contra 0,65 no tratamento sem inoculação. O maior valor obtido na relação PA/R mostra que a planta produziu maior massa seca de raiz em relação à massa seca de parte aérea, caracterizando desse modo uma maior capacidade de exploração do solo no que se refere a absorção de água nutrientes para o desenvolvimento da cultura. O fato de os maiores valores observados serem obtidos com os tratamentos com inoculação evidencia o potencial de uso das bactérias diazotróficas endofíticas, uma vez que os maiores valores são devidos provavelmente ao fato de que as estípites de bactérias utilizadas possuem a capacidade de produzirem substâncias promotoras de crescimento, capacidade de solubilização de fosfato além da capacidade de FBN. Também deve ser destacada a capacidade que os inoculantes apresentaram em contribuir para o maior crescimento, mesmo em condição adequada de fornecimento de nitrogênio no solo, uma vez que a adubação nitrogenada utilizada foi a recomendada para a cultura em todos os tratamentos utilizados.

Os maiores valores obtidos nos dois genótipos crioulos – amarelão e amarelão-ARA2 – representam de modo geral o grande potencial que existe no uso de inoculantes a base de bactérias diazotróficas endofíticas para a cultura do arroz de sequeiro nas propriedades de agricultores familiares que utilizam genótipos crioulos em seu sistema produtivo. Considerando a maior relação PA/R obtida quando inoculados com bactérias diazotróficas endofíticas, tem-se maior volume de solo explorado para o desenvolvimento da cultura. Além de se ter maior capacidade de resistir ao estresse hídrico e nutricional, e manter o potencial produtivo mesmo em condição de solo com baixa fertilidade natural e com uso reduzido de fertilizantes, visando a redução de custos e a busca de uma agricultura sustentável.

O teor de fósforo no tecido vegetal de genótipos crioulos de arroz de sequeiro apresentou diferenças significativas na comparação de medias entre as rizobactérias utilizadas como inoculantes (Tabela 3). Os teores médios de P no tecido vegetal oscilaram de 194,95 mg kg⁻¹ de P nos tratamentos sem inoculação a 801,05 mg kg⁻¹ de P no tratamento com o inoculante Fe27, sendo desse modo cerca de 4 vezes maior,

representando o potencial que as bactérias do gênero *Pseudomonas spp.* possuem para a nutrição fosfatada das plantas. Isto se deve possivelmente à capacidade de solubilização de fosfatos do solo e posterior liberação para o crescimento e desenvolvimento das plantas conforme relatado por Peix et al. (2001) que verificaram aumento na produtividade de ervilha, soja e feijão, respectivamente, quando inoculados com rizóbios solubilizadores de fosfatos. Corroborando com Barea et al. (2005) que relatam que na rizosfera há maior concentração de microrganismos solubilizadores de fosfato, sendo estes metabolicamente mais ativos que isolados de outros nichos. Uma vez que essa região contém intensa atividade bacteriana devido à presença de secreções exsudadas pelo sistema radicular das plantas, e assim, atuando como fonte de carbono prontamente disponível para os microrganismos do solo (ZILLI et al., 2003; TAURIAN et al., 2010).

O fósforo, um dos elementos mais importantes para o crescimento de plantas, não é um recurso renovável e assim sua futura utilização na agricultura, será impactado pela diminuição da disponibilidade e aumento de custo para sua aplicação na produção agrícola. Além disso, os microrganismos envolvidos na solubilização do fósforo podem melhorar o crescimento das plantas, aumentando a eficiência da fixação biológica de nitrogênio, assim como a disponibilidade de substâncias promotoras do crescimento de plantas. A persistência e sobrevivência na rizosfera e a presença endofítica de *P. Aurantiaca* foram anteriormente demonstradas para trigo e soja (ROSAS et al., 2005). A inoculação aumentou o rendimento da cultura, os valores obtidos foram semelhantes aos registrados para a adubação nitrogenada, que foi aplicada em uma dose reduzida (40 kg ha^{-1}) em relação ao que é usualmente empregue pelos agricultores ($80\text{-}100 \text{ kg ha}^{-1}$). Estudos anteriores mostraram que rizobactérias aumentam a capacidade de absorção radicular de gramíneas quando uma dose reduzida de fertilizante nitrogenado é adicionada ao solo (TRAN VAN et al., 2000; WHITMORE, 2000).

Também, avaliando a promoção de crescimento em trigo e milho pela inoculação co *Pseudomonas aurantiaca*, Rosas et al. (2008) observou que os resultados médios de peso seco da parte aérea para os tratamentos inoculados e/ou fertilizados

estavam acima do encontrado no tratamento controle.

A inoculação de trigo com *P. Aurantiaca* permitiu um melhor desenvolvimento do sistema radicular (57% e 23% de aumento em comparação com o controlo e o tratamento fertilizado, respectivamente). Ao considerar os componentes de produção, o efeito benéfico da inoculação foi reflectido no peso de grãos. Além disso, um aumento de 40% no número de grãos por espiga foi verificado quando combinado a fertilização com inoculação. Os valores médios para o rendimento de grãos (kg ha^{-1}) foram maiores no tratamento que foi inoculado com *P. Aurantiaca* e fertilizada (40 kg ha^{-1} de uréia e 30 kg ha^{-1} de fosfato de diamônio). No estudo com milho, o mesmo autor verificou que a massa seca do milho foi favorecida pela inoculação com *P. Aurantiaca*, assim como durante os estadios V2 e V5, o efeito benéfico de *P. Aurantiaca* foi evidenciado ao nível da raiz, onde o comprimento aumentou 28% em V2 e 32% em V5 no tratamento inoculado. Resultados semelhantes foram obtidos com o volume de raiz (42% e 36%, respectivamente). Este efeito benéfico foi também observado para os parâmetros de rendimento, onde o peso de mil grãos foi 11% maior e observou-se um aumento de 20% para produção de grãos em kg ha^{-1} .

No estudo de Hameeda et al (2008) sobre o uso de rizobactérias promotoras de crescimento e solubilizadoras de fosfato na cultura do milho, mostrou que a seleção de bactérias usando fosfato proveniente de rochas foram eficientes para aumentar o crescimento da planta e rendimento de grãos sob condições de casa de vegetação e campo através da solubilização de fosforo na rizosfera do milho. No estudo o aumento de massa seca aos 48 dias após a semeadura foi maior com o uso da bactéria *S. marcescens* (66%) e *Pseudomonas sp.* (51%), na fase de florescimento, o aumento do peso em seco (50%) com *S. Marcescens*. O tratamento de sementes com *S. marcescens* e *Pseudomonas sp.* aumentaram o rendimento de grãos campo de milho cultivado em 85% e 64% em relação ao controle não inoculado. Do mesmo modo que os dados de efeito positivos do uso de bactérias diazotróficas endofíticas sobre rendimento e crescimento em culturas com tomate, cana de açúcar e cevada, que podem ser explicados pela capacidade de FBN e solubilização de fosfato segundo Esitken et al. (2003).

Tabela 3 - Teor de fósforo no tecido vegetal de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Azospirillum* sp. (Ai27), *Pseudomonas* sp. (Fe27), *Rhizobium* sp. (Fe34) e inoculante comercial (*Azospirillum* sp. (Abv5/abv6)).

Genótipos	Teor de fósforo (mg kg ⁻¹)					
	Sem inoculação	Ai27	Fe27	Fe34	Abv5/abv6	MÉDIA
Amarelão	239,73	149,17	113,04	844,88	144,45	298,25
Amarelão-ARA2	154,07	1074,31	1133,16	402,51	162,24	585,26
Agulhinha	165,14	220,31	623,37	685,98	211,42	381,24
SCS115CL	220,86	114,69	334,64	304,70	293,26	253,63
MÉDIA	194,95 B	389,62 B	801,05 A	559,52 AB	202,84 B	

Tabela 4 - Teor de nitrogênio no tecido vegetal de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Azospirillum* sp. (Ai27), *Pseudomonas* sp. (Fe27), *Rhizobium* sp. (Fe34) e inoculante comercial (*Azospirillum* sp. (Abv5/abv6)).

Inoculantes	Teor de Nitrogênio (mg kg ⁻¹)				
	Amarelão	Amarelão-ARA2	Agulhinha	SCS115CL	MÉDIA
Sem inoculação	22051,64	18668,00	18667,39	20384,04	19942,77
Ai27	21757,36	20334,99	21708,31	18667,38	20617,01
Fe27	22247,83	21953,55	19501,19	17588,34	20322,73
Fe34	19942,61	16509,30	21463,08	16509,30	18606,07
Abv5/abv6	22051,64	20482,50	20138,80	15675,50	19587,11
MÉDIA	21610,22 A	20727,13 A	20295,75 A	17764,91 B	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância

Kumar et al. (2007), avaliando o efeito da inoculação das bactérias *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas corrugata* em três anos. O uso de *Pseudomonas corrugata* apresentou o melhor desempenho com aumento de até 144,9% de rendimento total, comparado com o tratamento controle. O peso seco de grão apresentou efeitos positivos em todos os inoculantes avaliados nos tratamentos, variando na *P. corrugata*, 194,3%; *B. subtilis*, 135,2%; *B. megaterium*, 122,4%. O índice de colheita na cultura foi significativamente maior em comparação ao tratamento controle. Os efeitos benéficos do uso de rhizobactérias promotoras de crescimento de plantas, particularmente os pertencentes aos géneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. Esta é uma contribuição de vários mecanismos, tais como, fornecimento de N fixado para a planta hospedeira, produção de fitormonios, solubilização de fosfato, produção de metabólitos, incluindo antibióticos e sideróforos (WHIPPS, 2001; COMPANT et al, 2005). O milho é conhecido como uma planta produtora de exsudado rico em diferentes açúcares, aminoácidos e hidratos de carbono. Estes compostos são disponibilizados para diferentes microorganismos e pode estimular o seu crescimento (BAUDOIN et al, 2001).

Segundo Mehnaz e Lazarovits (2006) estudando as estirpes *P. Putida*, *G. azotocaptans* e *A. lipoferum* inoculadas em milho sob a condição controlada em casa de vegetação, observaram que as estirpes avaliadas são altamente promissoras para uso na produção de milho. *P. putida* aumentou significativamente o peso de raiz e de parte aérea de variedades de milho. *Pseudomonas fluorescens* são colonizadores de raízes agressivas e são capazes de mover-se a partir das sementes para as raízes e de aumentar a produtividade vegetal em condições de campo (LIFSHITZ, 1987). Inicialmente, o mecanismo de promoção de crescimento para o genero *Pseudomonas* spp. era creditado ao antagonismo ou exclusão de patogenicidade e microorganismos deletérios da rizosfera.

Na avaliação do teor de nitrogênio em tecido vegetal (Tabela 04) observou-se apenas diferenças entre os genótipos, sendo que os genótipos oriundo de agricultores foram mais eficientes na absorção e incorporação do nitrogênio que a variedade comercial SCS115CL. Os valores médios dos teores de N foram maiores nos genótipos crioulos variando de 20138,8

mg kg⁻¹ de N (2,01%), 22051,64 mg kg⁻¹ de N (2,2%) e 20482 mg kg⁻¹ de N (2,05%) para os genótipos agulhinha, amarelão e Amarelão-ARA2 respectivamente, sendo estes maiores que 17764,91 mg kg⁻¹ de N (1,77%) encontrado no genótipo SCS115CL – variedade produzida no sistema irrigado.

Corroborando com Campos (1999), que avaliando o potencial de FBN em variedades de arroz, observou que algumas variedades de arroz são altamente eficientes quanto ao índice de colheita de N, contribuindo com até 60%, ressaltando assim que quanto maior o índice de colheita de N, maior é a proporção de N acumulado nos grão em relação à parte aérea.

Cardoso (2008) em seu estudo de ocorrência e diversidade de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* na cultura de arroz irrigado no estado de Santa Catarina encontrou resultados promissores, onde 52% dos isolados avaliados apresentaram capacidade de FBN estimada pelos teores de N total fixado em meio NFb e LGI semi-sólidos, livres de N. Desse modo, sendo excluídos alguns fatores que envolvem a interação solo-planta-microrganismo, e considerando o potencial de fixação de N total em meio de cultura é possível um incremento de cerca 23 kg N ha⁻¹.

De modo diferente, Guimarães et al. (2003) estudando o efeito da inoculação de arroz de sequeiro com bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Burkholderia brasiliensis* em condições de casa de vegetação e a campo, observaram que em relação ao acúmulo de nitrogênio, a bactéria *B. brasiliensis* contribuiu com 32% a mais que o tratamento controle. Já para as bactérias de *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* a contribuição foi de 35% e 59% acima do tratamento controle respectivamente. As bactérias *H. seropedicae*, promoveram aumento de até 15% no teor de N-total nos grão de arroz produzidos.

3.4 CONCLUSÕES

- 1.** O uso do inoculante Ai27, produzido com bactérias do gênero *Azospirillum sp.* favoreceu a promoção de crescimento na variedade Amarelão-ARA2, indicando especificidade entre os isolados e as variedades de arroz de sequeiro.
- 2.** O uso do gênero *Pseudomonas sp.* na cultura do arroz de sequeiro favoreceu a absorção e o acumulo de fósforo no tecido vegetal da cultura. Provavelmente pelo fato dessas bactérias serem capazes de solubilizar o fosfato presente no solo além da capacidade de promoção de crescimento.

3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ARAUJO, A. E. da S.; BALDANI, V. L. D.; GALISA, P. de S.; et al. **Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the Northeast region of Brazil.** Applied Soil Ecology. V. 64, p. 49-55, 2013.

BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A.. **Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments.** European Journal of Soil Biology, v. 37, p. 85–93, 2001.

BHATTARAI, T.; HESS, D. **Growth and yield responses of a Nepalese spring wheat cultivar to the inoculation with Nepalese *Azospirillum* spp. at various levels of N fertilization.** Biol. Fertil. Soils, v. 26, p. 72-77, 1998.

BIARI, A.; GHOLAMI, A.; RAHMANI, H. A. **Growth promotion and enhanced nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria in arid region of Iran.** Journal of Biological Sciences, v. 8 (6), p. 1015-1020, 2008.

CAMPOS, D. V-B. **Identificação de genótipos de arroz irrigado com potencial para fixação biológica do nitrogênio.** Seropédica, UFRRJ, 94p. 1999, Tese de Mestrado.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; et al.. **Use of Plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects.** Applied and Environmental Microbiology, v. 71, p. 4951–4959, 2005.

DIDONET, A.D., MARTIN-DIDONET, C.C.G., GOMES, G. F.. **Avaliação de Linhagens de arroz de terras altas inoculadas com Azospirillum lipoferum Sp59 e A brasiliense Sp245.** Bol. Pesq. C. Nac. Pesq. Arroz e Feijão (online) 69, 1–4, 2003.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHHS, A.; THYS, A.; et al.. **Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasiliense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat.** Plant Soil, v. 212, p. 155- 164, 1999.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHHS, A.; THYS, A. et al. **Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*.** Aust. J. Plant Physiol., v. 28, p. 871-879, 2001.

ESITKEN, A.; KARLIDAG, H.; ERCISLI, S. et al. **The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient element composition of leaves of apricot (*Prunus armeniaca L. cv. Hacihaliloglu*).** Aust. J. Agric. Res., v. 54, p. 377-380, 2003.

FIDELIS, R. R., et al.. **Eficiência do uso de nitrogênio em genótipos de arroz de terras altas.** Pesquisa Agropecuária Tropical. v. 42, n. 1, p. 124-128, jan/mar, 2012. Comunicação Científica.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro.** Agronomia, v. 37, nº2, p. 25 – 30, 2003.

HAMEEDAA, B.; HARINIB, G.; RUPELAB, O. P.; et al.. **Growth promotion of maize by phosphatesolubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna.** Microbiological Research, v. 163, p. 234—242, 2008.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. **Enterobacter cloacae is an endophytic symbiont of corn.** Mycopathologia, v. 129, p. 117 – 125, 1995.

KUMAR, B.; TRIVEDI, P.; PANDEY, A. **Pseudomonas corrugata: A suitable bacterial inoculant for maize grown under rainfed conditions of Himalayan region.** Soil Biology & Biochemistry, v. 39, p. 3093–3100, 2007.

MARTIN, P.; GLATZLE, A.; KOLB, W.; et al.. **N₂ fixing bacteria in the rizosphere: quantification and hormonal effects on root development.** Z. Pflanzenern Bodenkd, v. 152, p. 237-245, 1989.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. **Inoculation Effects of Pseudomonas putida, Gluconacetobacter azotocaptans, and Azospirillum lipoferum on Corn Plant Growth Under Greenhouse Conditions.** Southern Crop Protection and Food Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada. Online publication, v. 51, p. 326–335, 2006.

OLIVEIRA, M. A. de; et al.. **Composição química dos grãos de milho em resposta à adubação mineral e inoculação com rizobactérias.** Revista Ceres, Viçosa, v. 59, n. 5, p. 709-715, set/out, 2012.

OLIVEIRA, M. A. de; ZUCARELI, C.; SPOLAOR, L. T.; et al. **Desempenho agronômico do milho sob adubação mineral e inoculação das sementes com rizobactérias.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. v. 16, n. 10, p. 1040 – 1046, 2012, Campina Grande, PB, UAEA/UFCG.

- REITER, B.; BÜRGMANN, H.; BURG, K.; SESSITSCH, A. **endophytic nifH gene diversity in African sweet potato.** Canadian Journal of Microbiology, v. 49, p. 549 – 555, 2003.
- ROSAS, S. B.; AVANZINI, G.; CARLIER, E.; et al.. **Root colonization and growth promotion of wheat and maize by Pseudomonas aurantiaca SR1.** Soil Biology & Biochemistry, p. 1–5, 2008.
- SALA, V. M. R.; FREITAS, S. dos S.; DONZELI, V. P.; et al.. **Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 29, p. 345-352, 2005.
- SANES, F. S. M.; CASTILHOS, R. M. V.; SCIVITTARO, W. B.; et al. **Morfologia de raízes e cinética de absorção de potássio em genótipos de arroz irrigado.** Revista Brasileira de Ciências do Solo. V. 37, p. 688-697, 2013.
- STURZ, A. V. **The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization.** Plant and Soil, v. 175, p. 257 – 263, 1995.
- VERMA, S. C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. **Evaluation of planta growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice.** Journal of biotechnology, v. 91, p. 127-141, 2001.
- WHIPPS, J. M.. **Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere.** Journal of Experimental Botany, v. p. 52, 487–511, 2001.

4. CAPITULO II

DILUIÇÃO ISOTÓPICA DE ^{15}N EM ARROZ DE SEQUEIRO INOCULADOS COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS SOB DIFERENTES NIVEIS DE NITROGÊNIO

RESUMO

A aplicação adequada de nutrientes no solo é fator importante que interfere no rendimento da cultura, na atividade dos microrganismos e na melhoria da qualidade do solo. O N é um dos nutrientes absorvidos em maior quantidade pela cultura do milho por exemplo. A produção final no caso da cultura do arroz é definida em função da cultivar utilizada, da quantidade de insumos e das técnicas de manejo empregadas durante todo o ciclo produtivo. Entre os vários nutrientes, o nitrogênio tem a maior influência sobre o crescimento e a produção do arroz. Nos estudos sobre a dinâmica do N no sistema solo-planta, muitas vezes, é difícil quantificar a origem deste nutriente. As análises com isótopos estáveis têm sido uma ferramenta ecológica que dentre outras aplicações, pode ser utilizada no estudo da dinâmica dos nutrientes no sistema solo-planta. O uso de uma fonte marcada com ^{15}N constitui-se no método que permite quantificar com maior precisão a eficiência de utilização deste nutriente e a fonte originária, seja solo, fertilizantes orgânicos ou inorgânicos, imprescindível ao desenvolvimento de estratégias de manejo que aumentem o seu aproveitamento pelas culturas. Com o objetivo de determinar o potencial de inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento e arroz de sequeiro foi realizado um estudo utilizando dois genótipos crioulos de arroz de sequeiro, sendo uma variedade de amarelão e uma de agulhinha; três doses de nitrogênio (0, 50 e 100% do recomendado para a cultura); três rizobactérias promotoras de crescimento (Ai27 – gênero *Azospirillum*, Fe27 – gênero

Pseudomonas, Fe34 – gênero Rizobium, ambas provenientes da coleção de bactérias endofíticas do LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA E FAUNA DO SOLO, CAV/UDESC; e com a condição não inoculada; e a adição de nitrogênio marcado - SIGMA – ALDRICH – Ammonium – ^{15}N sulfate, 10 + atom % ^{15}N . ($^{15}\text{NH}_4\right)_2\text{SO}_4$; FW: 134,13; MP: 280°C; d: 1,77. Os tratamentos de inoculação com bactérias endofíticas não apresentaram efeito significativos na fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento quando avaliados pelo uso da técnica de diluição isotópica de nitrogênio.

Palavras-chave: Nitrogênio marcado. Rizobactérias promotoras de crescimento. Isótopos estáveis de nitrogênio.

ISOTOPE DILUTION OF ^{15}N IN UPLAND RICE WITH ENDOPHYTICA BACTERIA INOCULATED UNDER DIFFERENT LEVELS OF NITROGEN

ABSTRACT

The proper application of nutrients in the soil is an important factor that affects the crop yield in the activity of microorganisms and improving soil quality. N is one of the nutrients absorbed in greater quantity by corn for example. Among the various nutrients, nitrogen has the greatest influence on the growth and yield of rice. In studies on N dynamics in soil-plant system, it is often difficult to quantify the source of this nutrient. The stable isotope analyzes have been an ecological tool that among other applications, can be used to study the dynamics of nutrients in the soil-plant system. The use of ^{15}N labeled a source constitutes the method to quantify more precisely the efficiency of utilization of this nutrient and the original source is soil, organic or inorganic fertilizer, essential to the development of management strategies to increase their use by cultures. In order to determine the potential for inoculation of growth promoting rhizobacteria and upland rice a study was conducted using two genotypes Creoles upland rice, and a variety of yellowing and a Agulhinha, three nitrogen rates (0, 50 and 100% recommended for culture), three growth-promoting rhizobacteria (Ai27 - Azospirillum, Fe27 - Pseudomonas, Fe34 - genus Rhizobium, both from the collection of endophytic bacteria MICROBIOLOGY LABORATORY AND SOIL FAUNA, CAV / UDESC; and with the proviso uninoculated, and the marked nitrogen addition - Sigma - Aldrich - Ammonium - ^{15}N sulfate, 10 + atom% ^{15}N . $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, FW: 134.13, MP: 280 ° C, d: 1.77 . The inoculations with endophytic bacteria showed no significant effect on biological nitrogen fixation and growth promotion when assessed by the use of isotope dilution nitrogen.

Key words: Growth promoting rhizobacteria. Stable isotopes. Labeled Nitrogen.

4.1 INTRODUÇÃO

A aplicação adequada de nutrientes no solo é fator importante que interfere no rendimento da cultura, na atividade dos microrganismos e na melhoria da qualidade do solo. O N é um dos nutrientes absorvidos em maior quantidade pela cultura do milho, por exemplo. Contudo, é sabido que a recuperação do N dos fertilizantes nitrogenados pelas plantas é relativamente baixa, alcançando em muitos casos menos que 50 % (RAO et al., 1992). No entanto, quando as doses de N são maiores, a recuperação do N tende a diminuir, como observado por Melgar et al. (1991) e Grove et al. (1980), que obtiveram 36 e 40 % de recuperação do N aplicado na cultura do milho, na forma de ureia, nas doses de 120 e 140 kg ha⁻¹ de N, respectivamente. A baixa eficiência de recuperação do N do fertilizante tem sido atribuída, principalmente, às perdas gasosas do N (volatilização e desnitrificação).

A produção final no caso da cultura do arroz é definida em função da cultivar utilizada, da quantidade de insumos e das técnicas de manejo empregadas durante todo o ciclo produtivo. Entre os vários nutrientes, o nitrogênio tem a maior influência sobre o crescimento e a produção do arroz. Esse nutriente aumenta o número de perfilhos e, com isso, o número de panículas, além de promover maior número de espiguetas granadas e maior teor de proteínas nos grãos. Apesar da importância do nitrogênio, o emprego de altas doses induz à formação de grande número de perfilhos e folhas novas, provocando sombreamento, acamamento e criando condições favoráveis à ocorrência de doenças, refletindo em menor produtividade de grãos (BARBOSA FILHO, 1991). Dessa forma, a influência da adubação nitrogenada na produtividade de grãos é variável, podendo apresentar incremento com doses superiores a 100 kg ha⁻¹ de N (STONE et al., 1999; MICHELON et al., 2002; KUNZ et al., 2002) e, em determinadas situações, não afetar o rendimento.

No caso da cultura do milho, o nitrogênio é o nutriente aplicado em maior quantidade, o mais limitante para o crescimento e desenvolvimento da planta e o que mais onera o custo de produção (AMADO et al., 2002). Portanto, é de grande

importância o conhecimento de seu efeito residual no ano subsequente à sua aplicação, para auxiliar na tomada de decisão quanto a formas de manejo que, além de promoverem aumento da produtividade, resultem em redução de custos e minimizem riscos ambientais.

O nitrogênio pode ser encontrado na solução do solo principalmente nas formas de nitrato e amônio; porém, na maioria dos solos cultivados, em particular nos da região tropical, o nitrato é a principal forma de aquisição de N pelas plantas (DUETE, 2009). No caso do milho a absorção se dá tanto na forma nítrica como na amoniacial, embora a idade da planta tenha influência na escolha da forma nitrogenada. O íon amônio é utilizado, preferencialmente, nos primeiros estádios e o íon nitrato nos estádios finais (WARNCKE e BARBER, 1973). O N é elemento absorvido e exportado em maior quantidade pelo milho, o de maior dificuldade para avaliar sua disponibilidade no solo e o de manejo mais complexo, decorrente das múltiplas reações a que está sujeito, mediadas por microrganismos e afetadas por fatores climáticos de difícil previsão (CANTARELLA e DUARTE, 2004; SOUSA e LOBATO, 2004).

Perdas decorrentes da fertilização nitrogenada com uréia sempre foram bastante estudadas em razão de sua importância na produção agrícola de grãos. O fertilizante nitrogenado quando aplicado na superfície do solo sofre o processo de hidrólise, formando amônia (NH_3), dióxido de carbono (CO_2) e água. Dependendo das condições do meio, a amônia pode ser perdida ou retida no sistema. Em condições em que a retenção da amônia no solo não é favorecida, poderão ocorrer perdas significativas por volatilização (OLIVEIRA, et al., 2003).

Levando em conta as questões ambientais, deve-se considerar também a elevada demanda energética na fabricação de fertilizantes nitrogenados, na amplitude de 65 a 79,5 MJ kg⁻¹ N (WELLS, 2001), além do potencial de emissão de equivalente C, da ordem de 0,9 a 1,8 kg por kg de N (LAL, 2004). Assim, a importância de se aprimorarem os conhecimentos sobre a dinâmica do N do fertilizante em sistemas produtivos está na necessidade de garantir elevada rentabilidade ao mesmo tempo em que se precisa assegurar que os recursos e a qualidade do solo, da água e da atmosfera não sejam prejudicados pelas

práticas agrícolas, como a adubação nitrogenada utilizada na produção de grãos assim como em pastagens.

As práticas de manejo do solo, as condições climáticas, a época de aplicação do N e as características do solo são responsáveis pela dinâmica do N. Nesse contexto, Costa et al. (2004) avaliaram as perdas de N, na forma de amônia, provenientes da aplicação da ureia em três solos argilosos, submetidos a diferentes regimes de umidade e com diferentes características químicas e mineralógicas. Esses autores observaram que os solos apresentaram diferenças quanto às perdas de N-NH₃, em função da umidade inicial e da composição mineralógica da fração argila.

O N aplicado ao solo sob a forma de adubos verdes ou de fertilizantes minerais segue diferentes caminhos: uma parte é absorvida pelas plantas; outra, perdida do sistema solo-planta por processos de lixiviação, volatilização, erosão e desnitrificação (LARA CABEZAS et al., 2000), e o restante permanece no solo, predominantemente na forma orgânica (COELHO et al., 1991; SCIVITTARO et al., 2003). O conhecimento dos processos envolvidos na incorporação e transformação do N no sistema solo-planta-atmosfera é imprescindível ao desenvolvimento de estratégias de manejo que aumentem o seu aproveitamento pelas culturas. No caso do milho, no cultivo que recebeu a aplicação, o aproveitamento raramente ultrapassa 50 % do aplicado como fertilizante mineral (LARA CABEZAS et al., 2004) e 20 % do aplicado como adubos verdes (SCIVITTARO et al., 2000), permanecendo N residual no solo que poderia ser aproveitado por cultivos subseqüentes (HARRIS et al., 1994; AMADO et al., 1999). O aproveitamento baixo do N de fontes minerais e, principalmente, de fontes orgânicas, evidencia o efeito residual deste nutriente em cultivos nos anos agrícolas subseqüentes à sua aplicação (SCIVITTARO et al., 2000). Alguns estudos com adubos verdes marcados com ¹⁵N indicam que a maior proporção do N contido na sua matéria seca tem como destino o solo (HARRIS e HESTERMAN, 1990). O uso de uma fonte marcada com ¹⁵N permite quantificar, com maior precisão, o aproveitamento desse nutriente (LARA CABEZAS et al., 2000), comparado ao método da diferença ou indireto, bem como possibilita quantificar a contribuição do N proveniente do solo (MURAOKA et al., 2002).

Espécies capazes de obter do ar a maior parte do nitrogênio necessário para sua nutrição, apresentarão valores de ^{15}N bem próximos a zero, uma vez que a maior parte virá do N do ar que, é o padrão da técnica, e possui 0,3663 % de ^{15}N , ou seja, zero unidades de delta ^{15}N em excesso. Por outro lado, as espécies não fixadoras crescendo no mesmo solo, terão valores de ^{15}N mais elevados e próximos aos do solo, uma vez que todo ou a maior parte do nitrogênio necessário para o seu desenvolvimento será derivado do solo (XAVIER, 2006). Assim como as outras técnicas isotópicas, essa depende que as plantas fixadoras e as não-fixadoras, no mesmo solo, absorvam nitrogênio com a mesma marcação com ^{15}N . Além dessas dificuldades, devem-se considerar os valores de fracionamento isotópico das plantas fixadoras crescendo em meios livres de N. Ainda assim, o uso desta técnica com os devidos cuidados apresenta altas correlações com a técnica de diluição isotópica de ^{15}N com aplicação de fertilizante com adição de nitrogênio marcado do solo, que é atualmente, a técnica mais difundida e aceita para fins de quantificação da contribuição da FBN para as plantas (PEOPLES et al., 1989).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Entre o período de 12/01/2012 a 28/05/2012 foi desenvolvido um estudo utilizando bactérias diazotróficas endofíticas conduzido no CAV/UDESC – Lages/SC. O experimento apresenta um arranjo fatorial (2x3x4), utilizando dois genótipos crioulos de arroz de sequeiro, sendo uma variedade de amarelão e uma de agulhinha; três doses de nitrogênio (0, 20 e 40 kg ha⁻¹), correspondendo a 0, 50 e 100% da dose recomendada para a cultura do arroz de sequeiro, considerando uma produtividade de 2000 kg ha⁻¹. Foram utilizados três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (Ai27 – gênero *Azospirillum*, Fe27 – gênero *Pseudomonas*, Fe34 – gênero *Rhizobium*, provenientes da coleção de bactérias endofíticas do LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA E FAUNA DO SOLO, CAV/UDESC; e utilizadas no desenvolvimento do experimento

anterior, conforme descrito no Capítulo I, além da condição não inoculada; e a adição de nitrogênio marcado - SIGMA – ALDRICH – Ammonium – ^{15}N sulfate, 10 + atom % ^{15}N . ($^{15}\text{NH}_4\text{2SO}_4$; FW: 134,13; MP: 280°C; d: 1,77. Junto a esse arranjo foi realizado um controle negativo contendo um genótipo de arroz de sequeiro (amarelo), duas doses de nitrogênio (0 e 20 kg ha $^{-1}$) e todos os tratamentos de inoculação, excetuando-se neste caso a adição de solução de ^{15}N .

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, onde as plantas foram crescidas em vasos de 04 kg, contendo uma mistura de argila expandida - Perlite e areia (2:1; v/v). A adubação foi realizada semanalmente com 100 ml de solução nutritiva de Hoogland sem Nitrogênio, sendo a solução nitrogenada e a solução com ^{15}N adicionadas separadamente. As sementes foram pré-germinadas antes da semeadura e após foram inoculadas com as estípites de bactérias endofíticas em solução de sacarose com a concentração ajustada para 10 9 UFC mL $^{-1}$ por 30 minutos.

A partir da primeira semana, com as sementes já germinadas e a cultura estabelecida iniciou-se a adubação com solução nutritiva de Hoagland, respeitando as doses de N pré-estabelecidas (aplicado 100 ml de solução 1 vez por semana). A partir da segunda semana iniciou a adição de ^{15}N junto com a solução nutritiva, este funcionando como um elemento traço para posterior quantificação da fixação de nitrogênio. Os tratamentos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizados em seis repetições.

Por ocasião da colheita em 28 de maio de 2012, foi determinada a altura das plantas e coletadas a parte aérea das plantas para a determinação de matéria seca e grãos para a determinação de N e ^{15}N . Os grãos foram secos e triturados e acondicionados em recipiente fechado, após foram enviados para a análise de N e ^{15}N no Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA, Campus da USP em Piracicaba – SP.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos no estudo com genótipos crioulos de arroz de sequeiro inoculados com rizobactérias promotoras de crescimento sob diferentes doses de N e com adição de ^{15}N foram submetidos à análise de variância. A análise de variância para as variáveis altura e massa seca de parte aérea e para as fontes de variação são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Análise de variância e fontes de variação em genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em três doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N .

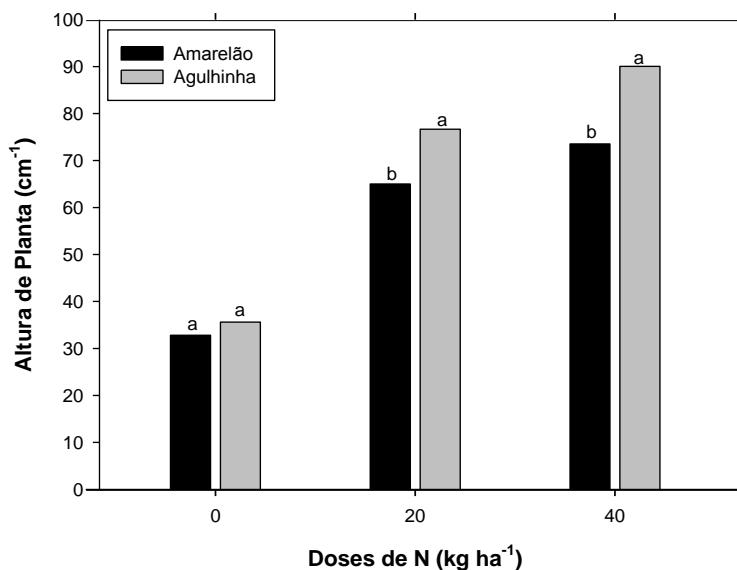
Fontes de Variação	Altura (cm vaso $^{-1}$)	MSPA (g vaso $^{-1}$)
Genótipo	*	*
Inoculante	ns	Ns
Dose	*	*
Genótipo*Inoculante	ns	Ns
Dose*Inoculante	ns	Ns
Genótipo*Dose	*	*
Genótipo*Dose*Inoculante	ns	*

Fonte: Produção do próprio autor.

Os genótipos, amarelão e agulhinha apresentaram incremento na variável altura de acordo com o aumento da dose de nitrogênio adicionada ao solo como verificado na figura 01. O genótipo crioulo agulhinha obteve um maior crescimento em altura para cada dose de N avaliada quando comparado ao genótipo amarelão. A adição e o aumento das doses de N ao solo favorecem o crescimento vegetal, fato este facilmente visualizado na Figura 1, onde verificamos que na dose 0 (sem adição de N ao solo) as médias de altura foram de 32,82 cm e 35,61 cm para agulhinha e amarelão respectivamente, não diferindo entre si. Na dose de 50% a variação foi de 65,02 cm para o genótipo amarelão e 76,68 cm no genótipo crioulo e na dose 100% (dose recomendada pelo manual de adubação e calagem) as médias variaram de 73,55 a 90,04 cm para

agulhinha e amarelão respectivamente. As médias de altura foram incrementadas conforme se aumentava as dose de N adicionadas ao solo, evidenciando comportamento de curva quadrático, com distinção de crescimento para cada genótipo estudado. O incremento em altura de acordo com as doses de N evidenciam a importância da adubação nitrogenada para a cultura do arroz de sequeiro. Este fato pode ser confirmado ao compararmos a diferença de crescimento obtida entre a dose 0% e 100% para cada genótipo, onde o incremento em altura na dose 100% foi 2,2 e 2,5 vezes maior que a dose 0% para os genótipos, amarelão e agulhinha, respectivamente.

Figura 1 - Altura de plantas de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N .



Fonte: Produção do próprio autor.

A variável massa seca de parte aérea (MSPA) dos genótipos crioulos de arroz de sequeiro apresentou interação entre as fontes de variação Genótipo x Dose x Inoculante (Tabela 5). Com o aumento das doses de N adicionadas ao solo o peso de MSPA aumentou em todos os tratamentos estudados (Figura 2). A MSPA dos tratamentos Fe27 e Fe34 (Bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Rhizobium*) apresentaram comportamento diferenciado quando inoculados nos genótipos, amarelão e agulhinha com 100% da dose de N adicionada (Figura 2). Esses dois inoculantes promoveram maior incremento de MSPA quando inoculados no genótipo crioulo agulhinha, mostrando ser esse genótipo mais responsivo a inoculação, mesmo com a adição de nitrogênio recomendada para a cultura. Outro fator que pode ser considerado diz respeito à especificidade das bactérias em relação aos genótipos de arroz utilizados. Assim como, a capacidade de solubilização de fosfato no caso do inoculante Fe27 (*Pseudomonas sp.*) e de produção de fitomônios de crescimento (Fe34 - *Rhizobium sp.*), que provavelmente influenciaram na produção de massa seca dos genótipos avaliados.

Os diferentes tratamentos de inoculação para o genótipo crioulo, amarelão, com adição de 100% da dose de N recomendada, diferiram significativamente. Sendo que o inoculante com estripes de *Rhizobium sp.* apresentou o menor peso de MSPA (8,07 g), diferindo dos demais inoculantes, que obtiveram, 9,07 g; 10,67 g e 10,80 g (Fe27 – *Pseudomonas sp.*, Ai27 – *Azospirillum sp.* e Sem inoculação, respectivamente). Desse modo é possível avaliar que a adição da dose de N recomendada para a cultura do arroz de sequeiro afetou de modo negativo o desenvolvimento e a eficiência das bactérias do gênero *Rhizobium sp.* quando inoculadas. Fato diferente ocorreu quando da inoculação das bactérias do gênero *Azospirillum* e *Pseudomonas* que apresentaram medias estatisticamente iguais ao tratamento sem inoculação.

As plantas podem se beneficiar com o nitrogênio fixado biologicamente em associação ou simbiose com microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico de modo direto, ou indiretamente após mineralização desses. Uma das interações mais bem estudadas é a simbiose entre rizóbios e leguminosas. Ao contrário, as culturas mais importantes do mundo, trigo, arroz

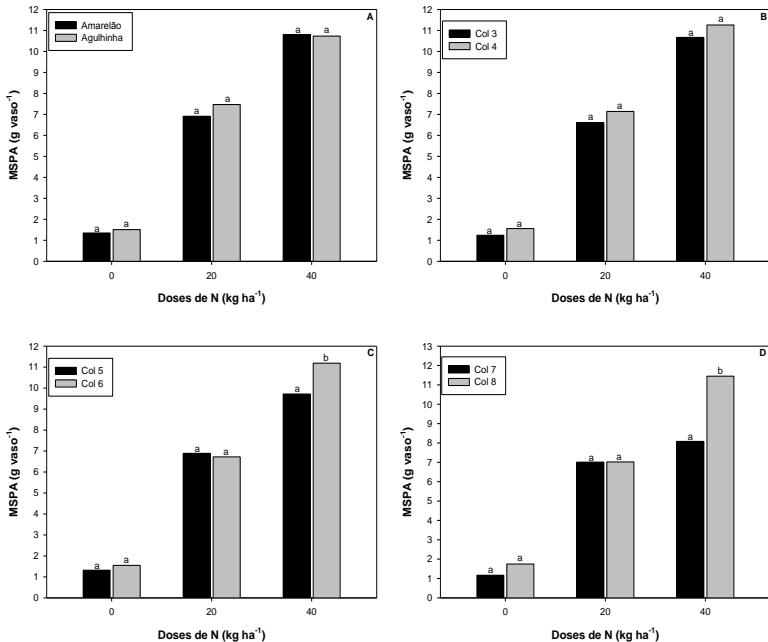
e milho, pertencentes à família gramineae que naturalmente não formam estas estruturas simbióticas especializadas. No entanto, tem sido demonstrado que algumas de gramíneas como a cana de açúcar, milho, arroz e trigo podem suprir parte substancial da exigência da planta com nitrogênio proveniente da fixação biológica, desse modo contribuindo para uma agricultura mais sustentável. Diversas bactérias diazotróficas endofíticas foram identificadas colonizando a rizosfera, como raízes e tecidos aéreos de gramíneas, no entanto, a associação planta-bactéria ainda não está bem compreendida. Assim sendo, a identificação de genótipos que realmente se beneficiem do processo de FBN é uma das etapas primordiais para viabilizar os estudos de identificação de microrganismos e suas relações com as plantas.

Resultados obtidos por Baldani et al. (2000) mostram uma contribuição de 18% relativo a FBN quando inoculadas com diferentes estirpes de *Herbaspirillum* e 20% com *Burkholderia spp.* Da mesma forma, estudo recente realizado por Ferreira et al. (2003) mostraram incrementos de 20% de nitrogênio acumulado no grão de arroz cultivar IR-42 inoculado com *H. seropediaeae*.

Na tabela 06 são apresentados os dados da análise de variância para as variáveis ^{14}N e ^{15}N , indicando as interações entre os tratamentos utilizados no estudo. O estudo foi conduzido até o final do ciclo produtivo, sendo realizada a colheita dos grãos e determinado os teores de nitrogênio (^{14}N e ^{15}N), apresentados nas figuras 03, 04 e 05. O acúmulo de ^{14}N no grão de arroz de sequeiro apresentou comportamento de curva quadrática para todos os inoculantes avaliados. Houve incremento com o aumento da dose de N adicionada ao substrato para todos os tratamentos de inoculação, variando de 0,79 % para o inoculante Ai27 a 1,77% para o Fe34, respectivamente nas doses 0 e 100% do recomendado para a cultura. Na dose 100% de N, o inoculante Fe27, rizobactéria do gênero *Pseudomonas sp.*, apresentou o menor teor de ^{14}N no grão, cerca de 1,46%, diferindo dos demais inoculante com a mesma dose de N, fato este que pode ser devido a sua maior especificidade em solubilizar fosfato (Figura 3).

De acordo com Ladha e Reddy (2003) o nitrogênio é o nutriente mais limitante para a cultura do arroz. Desse modo a fixação biológica de N_2 (FBN) é considerada uma alternativa.

Figura 2 - Massa Seca de Parte Aérea em genótipos de arroz de sequeiro em tratamento não inoculado (A), inoculados com Ai27 (B), Fe27 (C) e Fe34 (D) em diferentes doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N .



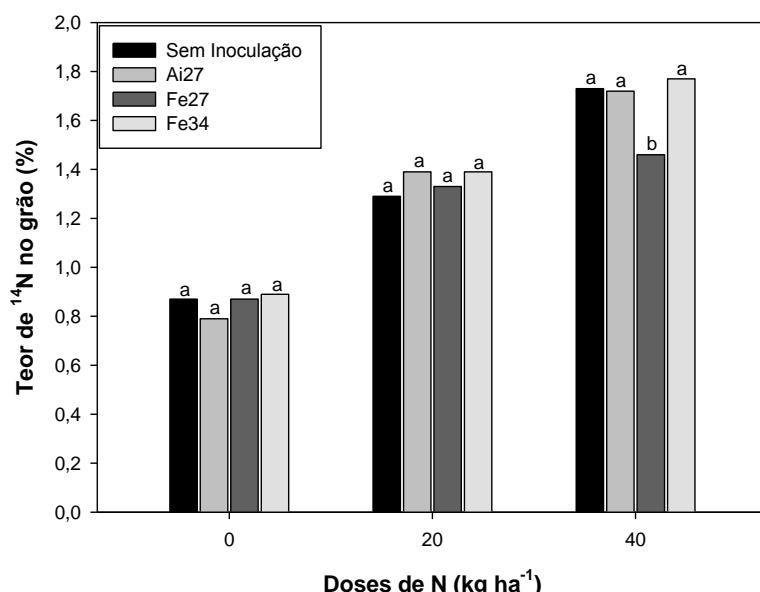
Fonte: Produção do próprio autor

Tabela 6 - Análise de variância e fontes de variação em genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas com doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N .

Fontes de Variação	Teor de ^{14}N	Teor de ^{15}N
	(%)	(%)
Genótipos	*	*
Inoculantes	*	*
Dose	*	*
Genótipo*Inoculante	Ns	*
Dose*Inoculante	*	*
Genótipo*Dose	Ns	*
Genótipo*Dose*Inoculante	Ns	*

Fonte: Produção do próprio autor

Figura 3 - Teor de nitrogênio no grão de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N .



Fonte: Produção do próprio autor.

As figuras 04 e 05 mostram o teor em percentagem de átomos ^{15}N no grão dos genótipos crioulos de arroz de sequeiro, amarelão e agulhinha, inoculados com rizobactérias promotoras de crescimento. O comportamento quadrático foi observado para todos os inoculantes e genótipos avaliados, sendo que com o aumento das doses de N adicionadas ao substrato a percentagem de ^{15}N no grão foi reduzida. Com a adição de nitrogênio ao substrato, o teor de ^{15}N adicionado ao mesmo, sofria diluição, uma vez que a proporção $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ aumentava, desse modo à absorção e acúmulo de ^{14}N pela cultura e posterior translocação para o grão era superior ao de ^{15}N , como pode ser observados nas Figuras 4 e 5.

Rodrigues et al. (2008) estudando a inoculação de *Azospirillum amazonense* na cultura do arroz em condições de casa de vegetação observou que a inoculação de *A. amazonense* alterou o crescimento do arroz. Alguns isolados testados mostraram efeitos benéficos sobre a produtividade, o acúmulo de nitrogênio e contribuições de fixação do N_2 para o arroz. Entretanto outros inibiram o crescimento. Assim, confirmando a necessidade de uso de inoculantes bacterianos, adequados as condições do estudo.

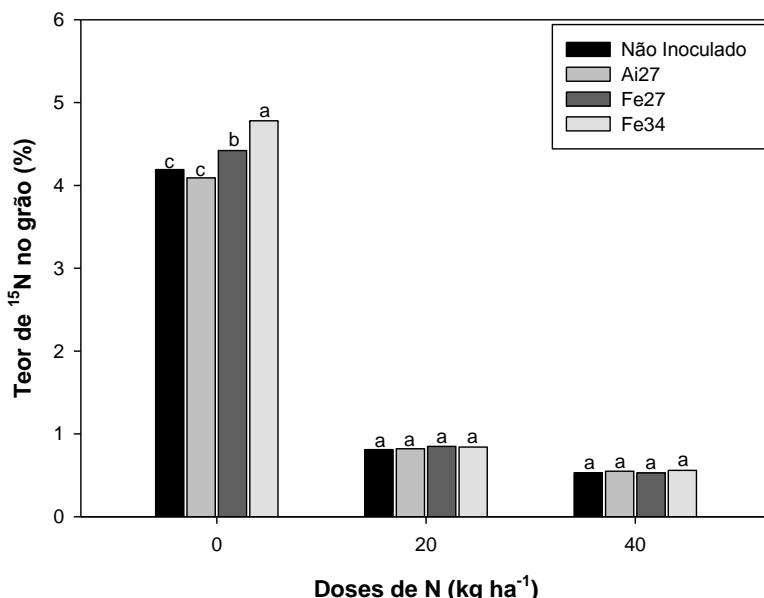
Em ambos os genótipos, amarelão e agulhinha, foi observado na dose 0% diferenças significativas entre as médias dos inoculantes, sendo que no genótipo amarelão o inoculante Fe34 produzido com bactérias do gênero *Rhizóbiump* sp. apresentou o maior valor de ^{15}N , 4,78% seguido pelo Fe27 produzido com bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. com 4,42%, pelo Ai27, do gênero *Azospirillum* sp. e o tratamento sem inoculação com 4,09 e 4,19% respectivamente. No caso do genótipo agulhinha, o teor de ^{15}N foi 4,14%, 3,68% 3,55% e 3,27% para os tratamentos sem inoculação, Ai27, Fe27 e Fe34 respectivamente, evidenciando diferenças entre os genótipos de arroz de sequeiro utilizados no estudo. Na visualização da figura 04 podemos verificar o potencial de algumas rizobactérias em acumular nitrogênio no tecido vegetal de plantas. Ao analisarmos o genótipo crioulo de arroz de sequeiro, amarelão, (Figura 4), observa-se nas doses 50 e 100% de N, mais adição de ^{15}N , não houve diferença no acúmulo de N no grão entre os tratamentos com inoculações e o tratamento sem inoculação. Entretanto quando não é aplicado N (dose 0%) mais adição de ^{15}N ,

verificam-se diferenças entre os tratamentos com inoculantes e o sem inoculação. Os inoculantes com estirpes de *Rhizórium* sp. e *Pseudomonas* sp. acumularam no grão os maiores teores de ^{15}N , com 4,78 e 4,42% respectivamente, 4,19% para o tratamento sem inoculação e 4,09% para o tratamento com estirpe de *Azospirillum* sp. (Ai27). Essas diferenças evidenciam que os inoculantes Fe34 e Fe27 promoveram o acúmulo de N no grão, provavelmente através da produção de substâncias promotoras de crescimento e/ou da fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Os genótipos de arroz de sequeiro, amarelão e agulhinha, se comportaram de modo distinto para cada inoculante usado no estudo quanto ao teor de ^{15}N no grão. No tratamento onde não houve a inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas não houve diferenças significativas entre os dois genótipos em todos os níveis de adubação nitrogenada. Já o genótipo amarelão quando inoculado com rizobactérias do gênero *Azospirillum* sp. (Ai27), *Pseudomonas* sp. (Fe27) e *Rhizóbio* (Fe34) na dose 0% obteve maior teor de ^{15}N no grão em relação ao genótipo agulhinha. Os teores no genótipo amarelão foram de 4,09, 4,42 e 4,78% para Ai27, Fe27 e Fe34 respectivamente enquanto que para o genótipo agulhinha os teores foram de 3,68, 3,55% e 3,27% para Ai27, Fe27 e Fe34 respectivamente (Figura 6). Desse modo, se pode verificar que o uso de bactérias diazotróficas endofíticas apresentam especificidades diferenciadas de acordo com o genótipo cultivado. Uma vez que o genótipo amarelão quando sem adição de nitrogênio, absorveu maior quantidade de ^{15}N do solo, acumulando esse N no grão, nos tratamentos inoculados. No tratamento sem inoculação os genótipos, amarelão e agulhinha não diferiram entre as três doses de N utilizadas, apresentando teores muito próximos um do outro, 4,19% e 4,14% na dose 0% nos genótipos amarelão e agulhinha respectivamente; 0,81% e 0,75% na dose 50% e 0,53% e 0,52% na dose 100%, respectivamente nos genótipos amarelão e agulhinha.

Em seu trabalho Campos et al. (2003), verificou que o enriquecimento de ^{15}N encontrado nos genótipos de arroz, nas amostragens realizadas ao longo do desenvolvimento das plantas, diminuiu com o tempo, provavelmente representando o decréscimo na marcação de ^{15}N do N disponível do solo.

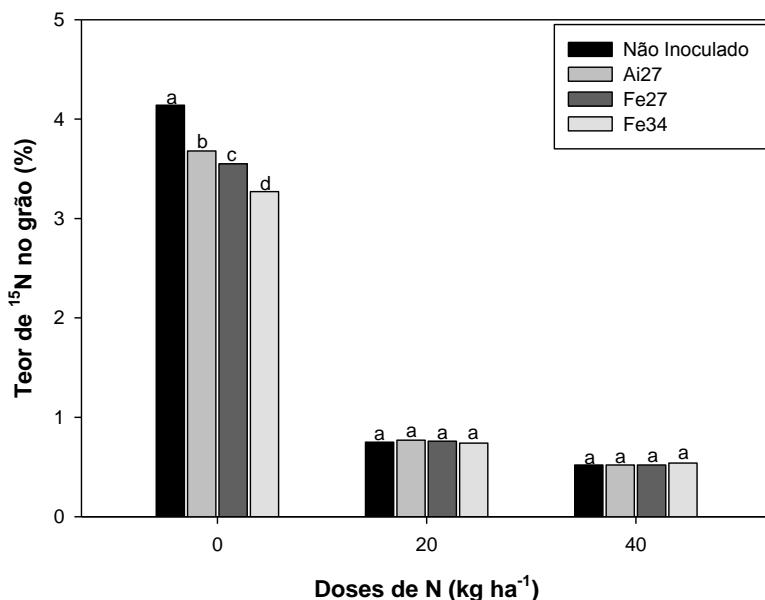
Figura 4 - Teor de ^{15}N no grão de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N .



Fonte: Produção do próprio autor.

A premissa para o uso da técnica de diluição isotópica de ^{15}N para quantificação da FBN é que a planta controle e a planta que se beneficia da FBN absorvam N do solo com o mesmo enriquecimento de ^{15}N . Segundo Witty (1983), esta premissa é obedecida se o enriquecimento de ^{15}N do N disponível do solo não variar com o tempo e nem com a profundidade. Caso contrário, as plantas controle e fixadora de N_2 deverão apresentar uma curva de acumulação de N proporcionalmente estável, ao longo de seu desenvolvimento.

Figura 5 - Teor de ^{15}N no grão de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N .



Fonte: Produção do próprio autor.

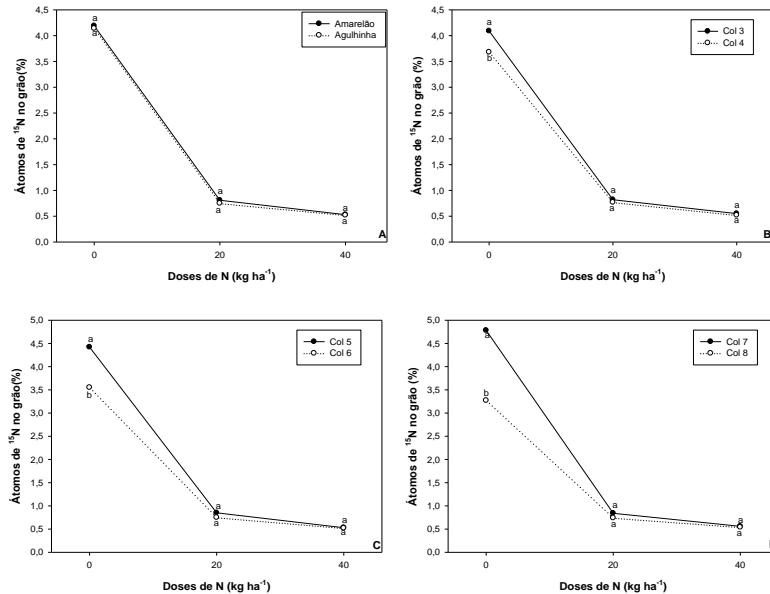
O comportamento de acumulo total de nitrogênio pelas plantas foi semelhante entre os genótipos, no entanto, representa o somatório do N acumulado do solo e do N derivado da FBN. Como o N do solo foi marcado com ^{15}N , a recuperação de ^{15}N pelas plantas é um indicador da utilização de N do solo. Tomando como base as taxas de recuperação de ^{15}N em cada época de amostragem, apesar da grande variabilidade dos dados, é possível verificar que existem genótipos com taxa de acumulação de N do solo (recuperação de ^{15}N) que variaram proporcionalmente entre eles nos diferentes intervalos de avaliação. No entanto, os genótipos IAC 4440, considerado controle para estudos de FBN (Oliveira, 1994), BG 90-2, CNA 6814 e MG 1, que apresentaram comportamentos distintos

quanto as quantidades de N do solo acumuladas em cada período, foram os que obtiveram os maiores enriquecimentos de ^{15}N na planta, na colheita final, não sendo significativamente diferentes. Estes resultados sugerem que o comportamento de acumulação de nitrogênio do solo destes genótipos foi semelhante, mas as quantidades absorvidas foram diferentes. Isto indica, também, que o N disponível do solo pode ter sido suficiente para atender a demanda de N dos genótipos, pelo menos nos períodos de maiores demandas.

Os dados obtidos do estudo com ^{15}N em genótipos crioulos de arroz de sequeiro foram avaliados de forma diferenciada em alguns aspectos. Na tabela 07 é apresentado a análise de variância – ANOVA dos dados tabulados referentes apenas ao genótipo amarelão em duas doses de nitrogênio (0 e 50% do recomendado), todos os níveis de inoculação (sem inoculação, Ai27, Fe27 e Fe34), e dois níveis de ^{15}N – com adição e sem adição de ^{15}N . O tratamento sem a adição de ^{15}N foi utilizado como controle negativo, onde se determinou e avaliou a presença natural do isótopo estável ^{15}N . Foram determinados os teores de ^{14}N e ^{15}N e submetidos à análise de variância para verificação da interação entre as fontes de variação.

A Tabela 7 mostra esses efeitos, onde o teor de ^{14}N apresentou efeito simples para dose e para adição de ^{15}N , além da interação entre dose e adição de ^{15}N . Entretanto para a variável teor de ^{15}N , todas as fontes de variação foram significativas, inclusive as interações, Dose* ^{15}N , Inoculante* ^{15}N , Dose*Inoculante, e para Dose*Inoculante* ^{15}N . Em seu estudo Oliveira et al. (2002) inoculando planta de cana micropagadas com cinco diferentes cepas de rizobactérias (*G. diazotrophicus*, *H. seropediae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *Burkholderia sp.*) originalmente isolado a partir de cana de açúcar. Estas estirpes foram usadas em várias combinações. Após aclimatação de 45 dias em estufa, as plântulas foram transferidas para vasos contendo ^{15}N para avaliação da fixação de nitrogênio pela técnica de diluição isotópica com ^{15}N . A inoculação de bactérias promoveu um aumento máximo de 39% da biomassa total (645 g por planta) sobre o controle não inoculado. No processo, as bactérias inoculadas assimilaram 30% de N pela FBN. 2001).

Figura 6 - Teor de ^{15}N no grão de genótipos de arroz de sequeiro com tratamentos, não inoculado (A), inoculados com Al27 (B), com Fe27 (C) e com Fe34 (D) em diferentes doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N .



Fonte: Produção do próprio autor

Tabela 7 - Análise de variância e fontes de variação em genótipo de arroz de sequeiro da variedade amarelão inoculado com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas com doses de nitrogênio e adição de ^{15}N .

Fontes de Variação	^{14}N	^{15}N
	(%)	(%)
Dose	*	*
^{15}N	*	*
Inoculante	Ns	*
Dose* ^{15}N	*	*
Inoculante* ^{15}N	Ns	*
Dose*Inoculante	Ns	*
Dose*Inoculante* ^{15}N	Ns	*

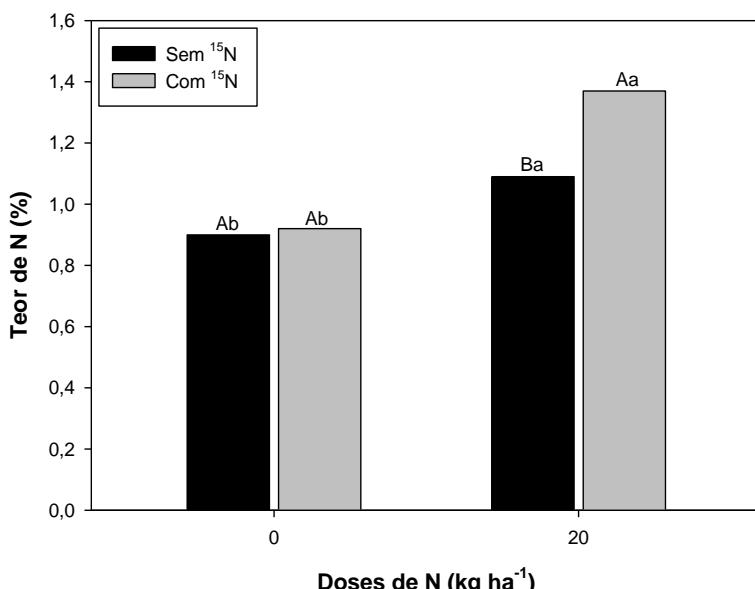
Fonte: Produção do próprio autor.

A adição de ^{15}N ao solo promoveu o incremento no teor de ^{14}N no grão do genótipo crioulo de arroz de sequeiro amarelão, conforme pode ser visualizado na figura 7. Na ausência de dose de nitrogênio (Dose 0%) não houve diferença significativa no teor de ^{14}N no grão entre o tratamento com ^{15}N e sem ^{15}N . Entretanto ao ser adicionado a dose de 50% de N recomendada para a cultura de arroz de sequeiro foi verificada diferença significativa, onde o tratamento com ^{15}N apresentou acumulo no grão de 1,37% de ^{14}N e o tratamento sem adição de ^{15}N , acumulou 1,09% de ^{14}N no grão de arroz (Figura 7).

A abundância natural de isótopos estáveis de ^{15}N em grão de arroz de sequeiro nos tratamentos sem a adição de ^{15}N no substrato é apresentada na Figura 8, mostrando que não há diferença significativa no teor de ^{15}N no grão entre as doses de N adicionadas ao solo para todos os tratamentos de inoculação utilizados no experimento. Os valores de isótopos de ^{15}N natural variaram de 0,38% na dose 0% sem inoculação para 0,37% nos demais inoculantes e entre as doses 0 e 50%.

Atualmente, a técnica disponível mais adequada para quantificar a FBN em uma cultura, principalmente em condições de campo, é a diluição isotópica de ^{15}N utilizando substrato enriquecido com o seu isótopo ou utilizando a sua abundância natural no nitrogênio disponível do solo (BOODDEY et al, 2001).

Figura 07: Teor de nitrogênio no grão em genótipo de arroz de sequeiro, variedade amarelão, inoculado com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio nos tratamentos com adição de ^{15}N e sem adição de ^{15}N .

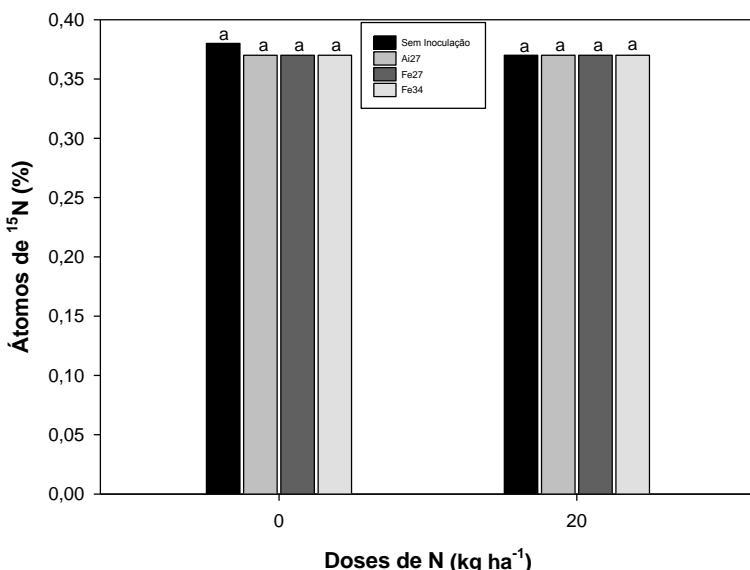


Médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro da mesma dose de N e pela mesma letra minúscula entre as doses de N não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância.

Fonte: produção do próprio autor.

Por exemplo, em estudo com 15 variedades de milho, Garcia de Salamone e Doeberreiner (1996) mostraram que algumas variedades aumentaram significativamente o rendimento de grãos e o conteúdo de N após a inoculação com cepas mistas de *Azospirillum spp.*, ao passo que as outras variedades mostraram decréscimos.

Figura 8 - Abundancia natural de ^{15}N em grãos de genótipo de arroz de sequeiro, variedade amarelão, inoculado com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio, sem adição de ^{15}N .



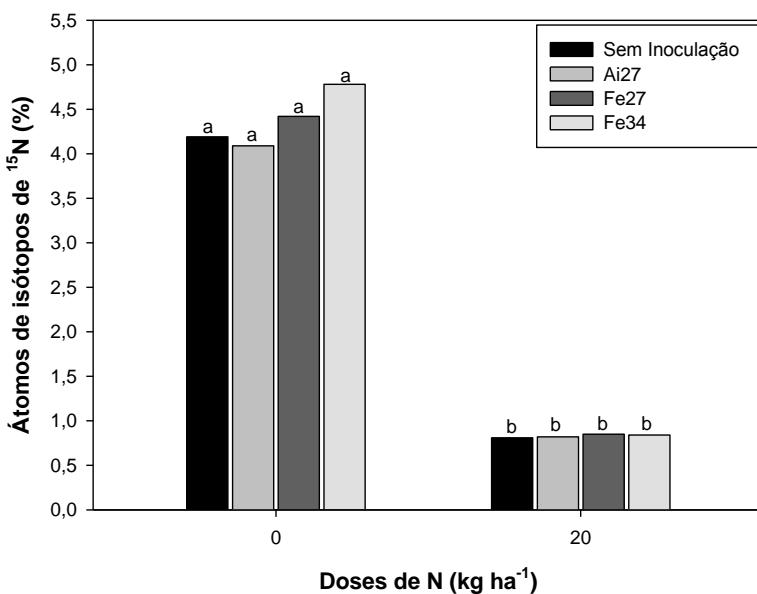
Médias seguidas pela mesma letra entre as doses de N não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância.

Fonte: Produção do próprio autor.

Em um subsequente estudo com diluição isotópica de ^{15}N , mostrou que duas variedades de milho no seu anterior estudo (Dekalb D4-70 e CMS22) poderiam fixar acima de 58% do seu N se inoculado com estirpes adequadas de *Azospirillum spp.* Por outro lado, no caso de sorgo, com abundância natural de ^{15}N , Lee et al. (1994) observaram que não houve diferenças significativas na FBN nos tratamentos controles ou com a inoculação de *Azospirillum/Azotobacter*. Oliveira (1994) utilizando a técnica de diluição isotópica de ^{15}N em 40 variedades de arroz observou diferenças entre as variedades quanto a contribuição da fixação biológica de nitrogênio.

Nos tratamentos com a adição de ^{15}N ao substrato o comportamento foi diferenciado em relação aos tratamentos sem a adição de ^{15}N para a variável, teor de ^{15}N no grão. A Figura 9 reflete esta diferença, onde todos os tratamentos de inoculação apresentaram maiores teores de ^{15}N no grão na menor dose de N aplicada no substrato (Dose 0%), com valores de 4,19, 4,09, 4,42 e 4,78% de ^{15}N para os tratamentos sem inoculação, Ai27, Fe27 e Fe34 respectivamente e 0,81, 0,82, 0,85 e 0,84% de ^{15}N na dose de 50% do N recomendado para os tratamentos sem inoculação, Ai27, Fe27 e Fe34 respectivamente (Figura 9).

Figura 9 - Teor de isótopos estáveis de ^{15}N em grãos de genótipo de arroz de sequeiro, variedade amarelão, inoculado com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas diferentes doses de nitrogênio, com adição de ^{15}N .



Médias seguidas pela mesma letra entre as doses de N não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância.

Fonte: Produção do próprio autor.

Também, Miranda et al. (1990), quantificaram a fixação biológica de nitrogênio pela diluição isotópica de ^{15}N complementada pelo balanço de nitrogênio, na comparação entre ecótipos de *Panicum maximum* verificaram também diferenças entre os ecótipos.

Dobereiner et al. (1996), mostraram resultados positivos em genótipos de milho inoculados com *Azospirillum*, onde alguns genótipos mostraram-se mais eficientes na FBN, com até 100% de aumento na produção. Do mesmo modo, Urquiaga et al. (1992), trabalhando com variedades de cana de açúcar observou diferenças entre variedades sobre a FBN, através do método de diluição isotópica de ^{15}N e balanço de N. Onde a taxa de FBN observada variou de 40, 50 e 60% do total de N acumulado pela planta, dependendo da variedade avaliada.

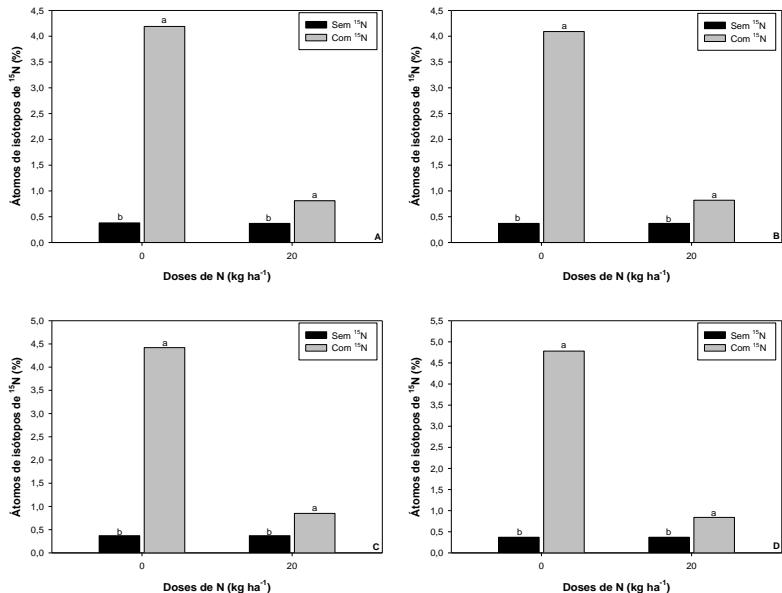
A variedade de arroz *Oryza officinalis*, através da redução de acetileno e incorporação de gás $^{15}\text{N}_2$ foi determinada a fixação biológica de nitrogênio em plantas após a inoculação com bactérias endofíticas de *Herbaspirillum sp.* A percentagem de $^{15}\text{N}_2$ incorporado foi de 381% em comparação com 0,4 da planta não inoculada, a qual provou o papel da fixação biológica de nitrogênio por *Herbaspirillum sp.* estirpe B501 em arroz (ELBELTAGY et al. 2001). Em outro exemplo a promoção de crescimento por *Burkholderia* em arroz, foi estimada que 31% (372 mg N por planta) do nitrogênio da planta foram obtidas por FBN (BALDANI et al. 2000).

Na Figura 10 são mostrados os dados de teores de ^{15}N e suas interações para cada inoculante. O acúmulo de ^{15}N no grão foi maior quando da adição de ^{15}N no substrato nas duas doses de N avaliadas (0 e 50%). Na comparação entre inoculantes verifica-se que os inoculantes Fe34 e Fe27 (*Rhizobium sp.* e *Pseudomonas sp.*) obtiveram as maiores médias de acúmulo de ^{15}N no grão, 4,78 e 4,42% respectivamente, enquanto que nos tratamentos sem inoculação e Ai27 os valores foram 4,19 e 4,09% de ^{15}N respectivamente. O maior incremento de ^{15}N no grão evidenciado que nos tratamentos com os inoculantes Fe34 e Fe27 houve uma menor atividade desses gêneros de bactérias endofíticas no uso do nitrogênio atmosférico, indicando que não ocorreu fixação biológica de nitrogênio para essas bactérias. Evidenciando desse modo que o maior acúmulo de nitrogênio no grão para esses

isolados pode ser devido a produção de substâncias que promovem o crescimento para o inoculante com estírpes de *Rhizobium sp.* e promoção de crescimento, devido a produção de fitormônios, e solubilização de fosfato pelas bactérias do gênero *Pseudomonas sp.*.

Hoje, um dos métodos mais úteis para examinar a fixação de nitrogênio ainda é a diluição isotópica de ^{15}N e técnicas de abundância natural de ^{15}N . Ambas diluição isotópica de ^{15}N e abundância natural de ^{15}N têm demonstrado que a cana-de-açúcar pode fixar quantidades substanciais de nitrogênio (URQUIAGA et al., 1992.; BODDEY et al., 1995, 1999., YONEYAMA et al, 1997). Mas também mostrou que a quantidade fixada é altamente variável, sendo dependente do genótipo da planta e das condições ambientais. Como exemplo, utilizando uma metodologia semelhante, Urquiaga et al. (1992), não encontraram contribuições significativas para a fixação biológica de nitrogênio em três variedades de arroz irrigado. Por outro lado, o uso da técnica de diluição do isótopo ^{15}N nos estudos de Wu et al, (1995), Shrestha e Ladha (1996), no Instituto Internacional de Pesquisa do Arroz (IRRI) mostraram que alguns genótipos de arroz podem obter significativas quantidades de nitrogênio a partir da FBN. Onde as variedades examinadas por Shrestha e Ladha (1996) obtiveram até 20,2% do nitrogênio necessário para a cultura da FBN atmosférico. Isto está de acordo com muitos estudos com a técnica de diluição de ^{15}N e do balanço de nitrogênio relatados também com a cultura do arroz (BODDEY et al, 1995, 1999; LADHA e REDDY, 1995), sugerindo que a FBN pode ser de extrema importância, embora altamente variável, em sistemas produtivos com baixo uso de adubos nitrogenados.

Figura 10 - Teor de isótopos estáveis de ^{15}N em grãos de genótipo de arroz de sequeiro, variedade amarelão, com os tratamentos: não inoculado (A), inoculados com bactérias diazotróficas endofíticas, Ai27 (B), Fe27 (C) e Fe34 (D) com doses de nitrogênio e com adição de ^{15}N e sem adição de ^{15}N .



Fonte: Produção do próprio autor.

4.4 CONCLUSÕES

- 1.** A adição de nitrogênio ao solo promoveu o incremento de nitrogênio no grão de genótipos crioulos de arroz de sequeiro para todos os tratamentos de inoculação com exceção para o inoculante produzido com bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. em condição adequada de nitrogênio adicionada ao solo.
- 2.** O uso da técnica de diluição isotópica de ^{15}N mostrou não haver fixação biológica de nitrogênio nos genótipos de arroz de sequeiro inoculados com bactérias endofíticas utilizados no estudo.

4.5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALVES B.J.R. **Aplicação da técnica de análise de solutos nitrogenados da seiva para a quantificação da fixação biológica de nitrogênio em *Desmodium ovalifolium* CV.** Itabela. Seropédica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 150p. Tese de Doutorado, 1996.

AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J., AITA, C. **Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto.** R. Bras. Ci. Solo, 26:241-248, 2002.

AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J.; FERNANDES, S.B.V. & BAYER, C. **Culturas de cobertura, acúmulo de nitrogênio total no solo e produtividade do milho.** R. Bras. Ci. Solo, 23:679-686, 1999.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.. **Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp.** Biol Fertil Soils, v. 30, p. 485–491, 2000.

BARBOSA FILHO, M.P. **Adubação do arroz de sequeiro.** Inf. Agropec., 14:32-38, 1991.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA S.; et al.. **Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement.** Plant Soil, n° 174, p.195–209, 1995.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. **Calculations and assumptions involved in the use of the A-value and ^{15}N isotope dilution**

techniques for the estimation of the contribution of plant-associated biological N₂ fixation. Plant and Soil, 145:151-155, 1992.

BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. **Estimation of biological nitrogen fixation associated with Brachiaria and Paspalum grasses using ¹⁵N-labelled organic matter and fertilizer.** Plant and Soil, Dordrecht, 90: 265-292. 1986.

BORTOLETTO, N.; MARTINS, A.L.M.; TRIVELIN; P.C.O.; BOARETTO, A.E. & SCIVITTARO, W.B. **Eficiencia de abonos verdes (crotalaria y mucuna) y urea, aplicadas solos o juntamente, como fuentes de N para el cultivo de arroz.** Terra, 20:17-23, 2002.

CAMPOS, D.V.B., de; RESENDE, A.S.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. 1995. **Identification of wetland rice genotypes with potential for biological nitrogen fixation.** Resumo expandido do International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The role of biological nitrogen fixation. EMBRAPA-CNPAB, UFRRJ, Academia Brasileira de Ciências. Angra dos Reis, RJ. Novembro/Dezembro 1995. pp.242-243.

CANTARELLA, H.; DUARTE, A.P. **Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho.** In: GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V. (Ed.). Tecnologia de produção de milho. Viçosa: UFV, 2004, cap.5, p.139-182.

COELHO, A.M.; FRANÇA, G.C.; BAHIA, A.F.C. & GUEDES, G.A. **Balanço de nitrogênio ¹⁵N em Latossolo Vermelho-Escuro, sob vegetação de cerrado, cultivado com milho.** R. Bras. Ci. Solo, 95:187-193, 1991.

COSTA, A.C.S.; FERREIRA, J.C.; SEIDEL, E.P.; TORMENA, C.A. & PINTRO, J.C. **Perdas de nitrogênio por volatilização da amônia em três solos Argilosos tratados com ureia.** Acta S. Agron., 26:467-473, 2004.

CROZIER C.R.; KING, L.D.; VOLK, R.J. **Tracing nitrogen movement in corn production systems in the North Carolina Piedmont: a nitrogen-15 study.** Agronomy Journal, Madison, v.90, n.2, p.171-177, 1998.

ELBELTAGY, A. K.; SATO, N. T.; SUZUKI, H.; et al. **Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a Herbaspirillum sp. isolated from wild rice species.** Appl Environ Microbiol, v. 67, p. 5285–5293, 2001.

FAQUIN, V. **Cinética da absorção de fosfato, nutrição mineral, crescimento e produção da soja sob a influência de micorriza vesículo-arbuscular (MVA).** 1988. 136 p. Tese de doutorado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES, S. L.; et al.. **Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado.** Agronomia, v. 37, p. 6–12, 2003.

FIGUEIREDO, C. C. de; RESK, D. V. S.; GOMES, A. C.; UQUIAGA, S. Sistemas de manejo na absorção de nitrogênio pelo milho em um Latossolo Vermelho no Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.3, p.279-287, Brasília, 2005.

GROVE, L.T.; RITCHIEY, K.D. & NADERMAN JUNIOR, G.C. **Nitrogen fertilization of maize on Oxisol of the cerrado of Brasil.** Agron. J., 27:261-265, 1980.

HARRIS, G.H. & HESTERMAN, O.B. **Quantifying the nitrogen contribution from alfalfa to soil and two succeeding crops using nitrogen-15.** Agron. J., 82:129-134, 1990.

HARRIS, G.H.; HESTERMAN, O.B.; PAUL, E.A.; PETERS, S. & E.JANKE, R.R. **Fate of legume and fertilizer nitrogen-15 in a long term cropping systems experiment.** Agron. J., 86:910-915, 1994.

JENSEN, E. S.; NIELSEN, H. H.. **How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment.** Plant Soil, n° 252, p. 177–186, 2003.

JOHANSEN, A.; JAKOBSEN, I.; JENSEN, E.S. **Hyphal N transport by a vesiculararbuscular mycorrhizal fungus associated with cucumber grownat three nitrogen levels.** Plant and Soil, v.160, p.1-9, 1994.

JUNIOR, F. B. dos R.; SILVA, L. G. da; REIS, V. M.; et al.. **Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana de açúcar.** Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasilia, v. 35, n° 3, p. 985-994, 2000.

JUNK G. & SVEC H.J. **The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various souces.** Geochim. Cosmochim. Acta. 14: 234-243, 1958.

KUNZ, J.H.; CARLESSO, R.; DA ROSA, G.M.; GARCIA, C.G.; PETRY, M.T. & MELO, G.L. **Adubação nitrogenada do arroz de sequeiro irrigado por aspersão no RS.** In: FERTBIO 2002. Rio de Janeiro, 2002. Anais. Rio de Janeiro, CPGA-CS/UFRJ, 2002. CD-ROM.

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

LAL, R. **Carbon emission from farm operations.** Environ. Intern., 30:981-990, 2004.

LARA CABEZAS, W.R.L.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. & SANTANA, D.G. **Influência da cultura antecessora e da adubação nitrogenada na produtividade de milho em sistema plantio direto e solo preparado.** Ci. Rural, 34:1005-1013, 2004.

LARA CABEZAS, W.A.R.; TRIVELIN, P.C.O.; KONDÖRFER, G.H.; PEREIRA, S. **Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura do milho em sistema plantio direto no Triângulo Mineiro.** R. Bras. Ci. Solo, 14:363-376, 2000.

LIMA, E.; BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. **Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided nitrogen balance.** Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.19, p.165-170, 1987.

MAGALHÃES, J.R.; HUBER, D.M.; TSAY, C.Y. **Influence of the form of nitrogen on ammonium, monoacids and Nassimilating enzyme activity in maize genotypes.** Journal of Plant Nutrition, New York, v.18, p.47-763, 1995.

MELGAR, R.J., SMYTH, T.J.; CRAVO, M.S. & SÁNCHEZ, P.A. **Doses e épocas de aplicação de fertilizante nitrogenado para milho em Latossolo da Amazônia Central.** R. Bras. Ci. Solo, 15:289-296, 1991.

MICHELON, J.C.; CARLESSO, R.; PETRY, M.T.; FIORIN, T.T.; DE BONA, F.D.; MELO, G.L. & KUNZ, J.H. **Influência da adubação nitrogenada no rendimento e componentes do rendimento do arroz de sequeiro irrigado por aspersão no RS.** In: FERTBIO 2002, Rio de Janeiro, 2002. Anais. Rio de Janeiro, CPGA-CS/UFRJ, 2002. CD-ROM.

MIRANDA, C. H. B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.. **Selection of ecotypes *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation usind the ^{15}N isotope dilution technique.** Soil Biology & Biochemistri, Elmsford, v. 22, p-657-663, 1990.

MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; et al.. **Isolation, partial haracterization, and effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro- propagated sugarcane in vitro.** Plant Soil, n° 237, p. 47–54, 2001.

MURAOKA, T.; AMBROSANO, E.J.; ZAPATA, F.; LARA CABEZAS, W.A.R.; TRIVELIN, P.C.O.; KORNODÔRF, G.H. & PEREIRA, S. **Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura do milho em sistema plantio direto no Triângulo Mineiro.** R. Bras. Ci. Solo, 14:363-376, 2000.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I.. **The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants.** Plant Soil, n° 242, p. 205–215, 2002.

OLIVEIRA, O.C. **Quantificação da fixação biológica de nitrogênio em arroz (*Oryza sativa*, L.) inundado.** 1994. Tese (mestrado) - UFRRJ, Seropédica, R.J.

PEOPLES M.B., FAIZAH A.W., RERKASEM B. & HERRIDGE D.F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field.** ACIAR, Monograph No. 11, Canberra, 1989. 76p.

RAO, A.C.S.; SMITH, J.L.; PARR, J.F. & PAPENDICK, R.I. **Considerations in estimating nitrogen recovery efficiency by the difference and isotopic dilution methods.** Fert. Res., 33:209-217, 1992.

REDDY, G.B.; REDDY, K.R. Fate of nitrogen-15 enriched ammonium nitrate applied to corn. **Soil Science of American Journal**, Madison, v.57, n.1, p.111-115, 1993.

RODRIGUES, E. P.; 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.

SCHORTEMEYER, M.; FEIL, B. **Root morphology of maize under homogeneous or spatially separated supply of ammonium and nitrate at three concentration ratios.** Journal of Plant Nutrition, New York, v.19, n.7, p.1089-1097, 1996.

SCIVITTARO, W.B.; MURAOKA, T.; BOARETTO, A.E.; et al. **Utilização de nitrogênio de adubos verdes e mineral pelo milho.** R. Bras. Ci. Solo, 24:917-926, 2000.

SCIVITTARO, W.B.; MURAOKA, T.; BOARETTO, A.E.; et al.. **Transformações do nitrogênio proveniente de mucuna-preta e uréia utilizados como adubo na cultura do milho.** Pesq. Agropec. Bras., 38:1427- 1433, 2003.

SHEARER, G. & KOHL, D.H. **N₂ fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance.** Aust. J. Plant Physiol., 13, 699-756, 1986.

SILVA, E.C.; MURAOKA, T.; BUZETTI, S.; GUIMARÃES, G.L. TRIVELIM, P.C.O.; VELOSO, M.E.C. **Utilização do nitrogênio (15N) residual de coberturas de solo e da uréia pela cultura do milho.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 30, n. 6, p.965-974, 2006.

SILVA, E.C.; MURAOKA, T.; BUZETTI, S.; VELOSO, M.E.C.; TRIVELIN, P.C.O. **Aproveitamento do nitrogênio (¹⁵N) da crotalária e do milheto pelo milho sob plantio direto em Latossolo Vermelho de Cerrado.** Ciencia Rural, 36:739-746, 2006b.

STONE, L.F.; SILVEIRA, P.M.; MOREIRA, J.A.A. & YOKOYAMA, L.P. Adubação nitrogenada em arroz sob irrigação suplementar por aspersão. Pesq. Agropec. Bras., 34:27-932, 1999.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M.. **Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates.** Soil Science Society of America, Journal, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.

WARNCKE, D.D.; BARBER, S.A. **Ammonium and nitrate uptake by corn (*Zea mays* L.) as influenced by nitrogen concentration and NH₄ + / NO₃ - ratio.** Agronomy Journal, Madison, v.65, p.950-953, 1973.

WELLS, C. **Total energy indicators of agricultural sustainability: Dairy farming case study.** Wellington, University of Otago, 2001. 81p. (Technical Paper 2001/3)

XU, Q.F.; TSAI, C.L.; TSAI, C.Y. **Interaction of potassium with the form and nitrogen and their influence in the growth and nitrogen uptake of maize.**, New York, v.15, n.1, p.23-33, 1992.

5. CAPITULO III

INOCULAÇÃO DE ARROZ DE SEQUEIRO COM BACTÉRIAS DO GÊNERO *Azospirillum* - ESTIRPE Abv5/abv6 SOB DIFERENTES NÍVEIS DE NITROGÊNIO EM CONDIÇÃO DE CAMPO

RESUMO

Nas décadas de 80 e 90 houve grande avanço tecnológico, mas ainda há muitos desafios a serem superados no que se refere a produção de arroz de sequeiro. Como maior desafio tem-se a consolidação dessa cultura de forma sustentável como um sistema produtivo na agricultura brasileira. Para o arroz de sequeiro foi desenvolvido cultivares mais produtivas e precoces, responsivas às melhorias do ambiente e com boa qualidade do grão produzido. A capacidade de produção agrícola dos solos está diretamente relacionada aos teores de matéria orgânica e nitrogênio no solo, entretanto é difícil manter seus níveis no solo de modo satisfatório na maioria dos solos. Desse modo, as formas de adição e de manutenção de matéria orgânica devem ser consideradas com antecipação em todos os programas de manejo e conservação dos solos agrícolas. Sabe-se que as gramíneas são colonizadas por bactérias endofíticas e que estas podem contribuir para a nutrição da planta, ou pelo processo de FBN ou pela produção de fitormônios que atuam no crescimento radicular. No caso de plantas de arroz (*Oryza sativa*), o sistema radicular pode ser colonizado por RPCP, promovendo o crescimento vegetal, aumentando o volume de raízes e melhorando a nutrição da planta. Com o objetivo de avaliar a capacidade de promoção de crescimento e a fixação biológica de nitrogênio em dois genótipos crioulos de arroz de sequeiro através de um inoculante comercial com rizobactérias do gênero Abv5/abv6. O experimento apresenta um arranjo fatorial $2 \times 3 \times 2$,

utilizando dois genótipos crioulos de arroz de sequeiro, sendo um genótipo proveniente do município de Chapecó/SC (variedade amarelão) e um genótipo proveniente da Gerencia Regional da Epagri de Araranguá (variedade Cateto) e um genótipo comercial de arroz irrigado cultivado na região (variedade Rice Tech); três doses de nitrogênio (0, 50 e 100% da dose recomendada) e um inoculante comercial - Abv5/Abv6 a base de bactérias do gênero azospirillum; e com a condição não inoculada. Por ocasião do fim do ciclo da cultura foi realizada a colheita de grãos para a determinação da produtividade e determinação N e P. Os teores de N e P na folha bandeira e grão, além da produtividade apresentaram efeito de dose. Onde de acordo com o aumento da dose de nitrogênio aplicada ao solo, os valores também aumentaram.

Palavras-chave: Rizobactérias promotoras de crescimento. Fixação Biológica de Nitrogênio. Fitormonios vegetais.

INOCULATION OF UPLAND RICE WITH BACTERIA OF *Azospirillum* - Abv5/abv6 STRAIN UNDER DIFFERENT LEVELS OF NITROGEN IN FIELD CONDITIONS

ABSTRACT

In the 80s and 90s there was a great technological advancement, but there are still many challenges to be overcome in relation to production of upland rice. As the biggest challenge has been the consolidation of this culture as a sustainable production system in Brazilian agriculture. For upland rice cultivars were developed more productive and early, responsive improvements to the environment and good quality of the grain produced. The production capacity of agricultural soils is directly related to the soil organic matter and nitrogen in the soil, though it is difficult to maintain their levels in soil satisfactorily in most soils. Thus, the forms of addition and maintenance of organic matter should be considered in advance in all programs for management and conservation of agricultural soils. It is known that the grasses are colonized by endophytic bacteria and that these may contribute to the nutrition of the plant, or at the BNF process or production of hormones which act on root growth. In the case of rice plants (*Oryza sativa*), the root system colonized by PGPR may be, promoting plant growth, increasing the volume and improving root plant nutrition. In order to evaluate the ability of promoting growth and nitrogen fixation in two genotypes of upland rice Creole through an inoculant with rhizobacteria of the genus Abv5/abv6. The experiment presents a 2x3x2 factorial arrangement using two genotypes of upland rice Creoles, one genotype from the Chapecó / SC (yellowing variety) and a genotype from the Regional Managers Epagri Araranguá (Cateto variety) and a genotype trade of rice production in the region (Rice variety Tech), three nitrogen rates (0, 50 and 100% of the recommended dose) and an inoculant - Abv5/Abv6 the basis of *Azospirillum* bacteria, and not inoculated with the condition. At the end of the cycle was done grain harvest yield for the determination and determination of N and P. The N and P in the flag leaf and grain,

as well as yield showed dose effect, where in accordance with the increase of the nitrogen applied to the soil, the values also increased.

Key words: Growth promoting rhizobacteria. Biological fixation of nitrogen. Phytohormones plants.

5.1 INTRODUÇÃO

Nas décadas de 80 e 90 houve grande avanço tecnológico, mas ainda há muitos desafios a serem superados no que se refere a produção de arroz de sequeiro. Como maior desafio tem-se a consolidação dessa cultura de forma sustentável como um sistema produtivo na agricultura brasileira. Para o arroz de sequeiro foi desenvolvido cultivares mais produtivas e precoces, responsivas as melhorias do ambiente e com boa qualidade do grão produzido. Fatos estes que permitiu a expansão da cultura em muitas regiões do país e desse modo tornando-a mais competitiva no mercado agrícola. O maior potencial competitivo apresenta limitações a partir do momento em que essas cultivares são produzidas em pequenas propriedades, onde não é fornecido condições ideais em termos de nutrição e ambiente, para se alcançar o máximo potencial produtivo da cultivar melhorada. Esse fato pode ser compreendido principalmente pela falta de capital necessário para o manejo adequado do solo, da adubação e dos tratos culturais durante o ciclo da cultura, uma vez que os pequenos agricultores geralmente cultivam o arroz como forma de subsistência, em locais com baixa fertilidade natural e em locais inadequados para a cultura. Com base nisto há uma demanda crescente na busca de cultivares que permitam menor uso de fertilizantes químicos, resistência maior a doenças, maior capacidade de competição com plantas daninhas e uma maior eficiência no uso e acumulo de nutrientes do solo.

A capacidade de produção agrícola dos solos está diretamente relacionada aos teores de matéria orgânica e nitrogênio no solo, entretanto é difícil manter seus níveis no solo de modo satisfatório na maioria dos solos. Desse modo, as formas de adição e de manutenção de matéria orgânica devem ser consideradas com antecipação em todos os programas de manejo e conservação dos solos agrícolas (CAZETTA et al., 2008).

O uso de fertilizantes na produção de grãos é de fundamental importância para a manutenção das reservas de nitrogênio originalmente presentes no solo. Altas produtividades com baixas doses adicionadas ao sistema, normalmente significa

que a quantidade de N exportada com a colheita é maior que a adicionada, contribuindo para a redução dos teores de N no solo (ALVES et al., 2006). Em um sistema utilizado de modo sustentável há a necessidade de que as reservas de nutriente e de matéria orgânica do solo sejam mantidas em níveis adequados ao longo dos anos e dos cultivos. Uma vez que os níveis de carbono (C) e nitrogênio (N) do solo estão diretamente relacionados, oscilando em uma razão de 12: 1 a 18:1, quando se considera a matéria orgânica estável no solo. Desse modo em rotações de culturas em que as perdas de nitrogênio com a exportação de nitrogênio nos grãos colhidos sejam maiores do que a entrada de nitrogênio irá promover a perda de carbono do solo, ou matéria orgânica, reduzindo assim a capacidade de suprimento de N para as plantas, sendo consideradas insustentáveis ao longo do tempo (URQUIAGA et al., 2005).

O nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes para a obtenção de altos índices de produtividade em culturas anuais, como: arroz, milho, trigo e soja, devido a grande demanda das plantas por esse nutriente. Desse modo, a baixa disponibilidade de nitrogênio no solo limita a produtividade da cultura, tanto em regiões de clima temperado e tropical. Nesse contexto, o processo de fixação biológica de nitrogênio desempenha um importante papel para a agricultura, pois reduz o uso de fertilizantes nitrogenados, reduzindo o custo de produção e os impactos ambientais causados pelo uso excessivo de fertilizantes. Este processo pode ser de grande relevância para plantas não leguminosas como as gramíneas em geral, especialmente o arroz, dado seu grande valor socioeconômico a nível global, tendo em vista que é utilizado por um terço da população mundial como principal fonte de alimentação.

Sabe-se que as gramíneas são colonizadas por bactérias endofíticas e que estas podem contribuir para a nutrição da planta, ou pelo processo de FBN ou pela produção de fitormonios que atuam no crescimento radicular. No caso de plantas de arroz (*Oryza sativa*), o sistema radicular pode ser colonizado por RPCP, promovendo o crescimento vegetal, aumentando o volume de raízes e melhorando a nutrição da planta. Dentre os microrganismos indicados como promotores de crescimento de plantas estão bactérias do gênero *Azospirillum* (JAMES et al., 2000) e *Rhizobium* (YANNI et al., 2001) que apresentam

capacidade de promoção de crescimento e de FBN. Também há relatos de maior absorção de N, P, K e Fe em plantas de arroz inoculadas e aumento no vigor de plântulas de arroz após a inoculação com bactérias (BISWAS et al., 2000 a e b).

As culturas de arroz, trigo e milho consomem aproximadamente 60% do total de fertilizantes nitrogenados utilizados no mundo (LADHA et al., 2005). Portanto, em razão da extensa área ocupada com a produção de cereais, aproximadamente cinco vezes a das leguminosas, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) associada às culturas torna-se de extrema importância, mesmo que apenas parte de suas necessidades de nitrogênio possa ser suprida pela FBN (SALA, et al. 2007). A ausência de resposta à inoculação de rizobactérias em gramíneas tem sido atribuída ao uso de linhagens inadequadas, uma vez que há um consenso em que o genótipo da planta é o fator chave para a obtenção dos benefícios oriundos da FBN, aliado a estirpes de bactérias eficientes (REIS et al., 2000).

O teor de nitrogênio fixado pelas bactérias em gramíneas gira em torno de 25 a 50 kg/ha/ano, equivalendo ao suprimento médio de 17% das demandas das culturas. Considerando que as espécies produtoras de grãos, como arroz, trigo e milho são as principais fontes de alimento para a população, esta taxa de FBN, mesmo parecendo baixa, representa uma grande economia nos custos de produção, além de se obter uma agricultura mais sustentável, justificando assim o uso dessa tecnologia para a produção agrícola.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Entre o período de 29 de novembro de 2012 e 28 de março de 2013 foi desenvolvido um estudo a campo utilizando inoculante comercial à base de bactérias diazotróficas endofíticas conduzido no Município de Mirim Doce-SC. O experimento apresenta um arranjo fatorial 3x3x2, utilizando dois genótipos crioulos de arroz de sequeiro, sendo um genótipo proveniente do Centro de treinamento da Epagri de Chapecó/SC (variedade

amarelão) e um genótipo proveniente da Gerencia Regional da Epagri de Araranguá (variedade Cateto) e um genótipo Híbrido de arroz irrigado cultivado na região do Alto Vale do Itajaí (Rice Tech); três doses de nitrogênio (0, 20 e 40 kg ha⁻¹, correspondendo a 0, 50 e 100% da dose recomendada pelo manual de adubação e calagem para SC e RS), além da adubação de base com 60 kg ha⁻¹ de P e 50 kg ha⁻¹ de K, considerando uma produtividade média de 2000 kg ha⁻¹. E, um inoculante comercial - Abv5/Abv6 a base de bactérias do gênero *Azospirillum*; e com a condição não inoculada.

O ensaio foi conduzido a campo no município de Mirim Doce - SC nas coordenadas de 29°12'45,38" S e 50°07'26,16" O, em um solo com as seguintes características físico-químicas: teor de argila de 43 % e 3,1 % de matéria orgânica, com pH natural de 4,8, teor de P de 3,6 mg dm⁻³, teor de K de 61 mg dm⁻³ e CTC efetiva de 10,92 cmolc dm⁻³. Os tratamentos foram distribuídos em blocos inteiramente casualizados em cinco repetições com parcelas subdivididas.

A adubação com N, P e K foi realizada de acordo com o Manual de Adubação e Calagem para o RS e SC, 2004, utilizando uréia, superfosfato triplo e cloreto de potássio antes da semeadura. As sementes foram inoculadas com o inoculante comercial no momento da semeadura. Aos 40 dias após a germinação foi realizada a adubação de cobertura com uréia, respeitando as dose de N de cada parcela (0, 20 e 40 kg ha⁻¹).

No período de inicio do florescimento foi realizado a coleta de folhas bandeiras para a determinação de N e P, extraídos segundo Tedesco et al. (1995) e a determinação de N pelo método de Kjeldahl e P segundo Gatiboni (2003). Por ocasião do fim do ciclo da cultura foi realizada a colheita de grãos para a determinação da produtividade e determinação N e P, extraídos segundo as metodologias descritas em Tedesco et al. (1995) e a determinação de N pelo método Kjeldahl e o P segundo Gatiboni (2003).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O experimento desenvolvido em condição de campo na cidade de Mirim Doce/SC foi conduzido com dois genótipos de arroz de sequeiro (amarelão e agulhinha), com três diferentes doses de nitrogênio (0, 50 e 100%) e dois níveis de inoculação (inoculado e não inoculado). Na Tabela 8 é apresentado os resultados da análise de variância – ANOVA da variáveis produtividade, teor de P e N na folha bandeira e no grão. Sendo que para todas as variáveis estudadas não foram observados interação entre as fontes de variação (Tabela 10). Foram encontrados efeitos simples para genótipo e dose nas variáveis, produtividade e P na folha bandeira, efeito de bloco, genótipo e dose para o teor de P no grão, bloco e dose para o teor de N na folha bandeira e dose e genótipo para o teor de N no grão.

Tabela 8 - Análise de variância e fontes de variação em genótipos de arroz de sequeiro inoculado com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e com doses de nitrogênio.

Fontes de Variação	Prod.	P - Fl. Band.	P - Grão	N - Fl. Band.	N-Grão
	kg ha ⁻¹	(%)	(%)	(%)	(%)
Dose	ns	Ns	*	*	*
Genótipo	*	*	*	Ns	*
Inoculante	ns	Ns	ns	Ns	Ns
Dose	*	*	*	*	Ns
Genótipo*Inoc.	ns	Ns	ns	Ns	Ns
Dose*Inoc.	ns	Ns	ns	Ns	Ns
Genótipo*Dose	ns	Ns	ns	Ns	Ns
Genót.*Dose*Inoc.	ns	Ns	ns	Ns	Ns

Fonte: Produção do próprio autor.

Na avaliação da produtividade dos diferentes genótipos de arroz de sequeiro não foram observados diferenças significativas entre os tratamentos inoculados com Abv5/abv6 e não inoculado. Do mesmo modo experimentos com inoculação em trigo, com estípulas de *Azospirillum spp.* Em condição de campo, revelaram que não houve efeito da inoculação sobre a produção de grãos. No entanto, foi observado que o teor de nitrogênio nos grãos aumentou significativamente nos

tratamentos com bactérias e sem a adição de nitrogênio, sendo observado que cerca de 70% do nitrogênio acumulado foi translocado das partes vegetativas para os grãos (RODRIGUES et al., 2000).

Diferenças significativas foram constatadas entre os genótipos de amarelão, agulhinha e Rice Tech (variedade comercial - irrigada) (Tabela 9), além de ser observado o comportamento quadrático entre as doses de nitrogênio adicionadas ao solo no momento da semeadura, onde a dose de 50% de N recomendada para a cultura apresentou a maior média de produtividade com 2124 kg ha^{-1} , e 1848 e 2083 kg ha^{-1} para as dose 0% e 100%, respectivamente. Quando analisado as diferenças entre os genótipos, foi observado que a variedade Rice Tech (variedade de arroz irrigado) apresentou a maior media de produtividade em relação aos genótipos crioulos, variando de 2425 kg ha^{-1} para o Rice Tech, 2202 kg ha^{-1} para o Cateto e 1428 kg ha^{-1} para o genótipo amarelão (Tabela 9).

No entanto, estudos com a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* em diferentes variedades de arroz crescidas em condições de campo sob diferentes doses de N e molibdênio, e em regime hídrico de sequeiro, mostraram um incremento de até 37% na produção de grãos deste cereal (SUNDIN, 2001).

Guimarães et al. (2003) em seus estudos sobre inoculação de bactérias diazotróficas em genótipos de arroz de sequeiro, obtiveram resultados que mostram diferenças significativas entre os tratamentos devido à inoculação em coleta realizada aos 75 dias após o plantio (DAP), onde a bactéria *H. seropedicae* aumentou em até 43% a matéria seca da parte aérea. Esta estirpe também se mostrou eficiente no acúmulo de N na parte aérea, que apresentou um aumento de 28%. Diferenças significativas tanto no acúmulo de matéria seca, quanto na produção de grãos também foram observados na coleta feita aos 130 DAP. Em relação à matéria seca da parte aérea, houve um aumento de 6% decorrente da inoculação com *H. seropedicae*. Esta estirpe aumentou a produção de grãos em 50% em relação ao controle. Aumentos em torno de 38% na produção de grãos também foram obtidos para a estirpe de *B. brasiliensis*.

Estudos estabeleceram que inoculações com bactérias promotoras de crescimento possuem importância comercial para culturas como arroz, cana de açúcar e trigo, podendo reduzir a entrada de fertilizantes nitrogenados no cultivo (BALDANI et al. 2.000, MATTHEWS et al. 2001, SALEH et al. 2001; GOVINDARAJAN et al. 2006, 2007). Yanni et al. (1997) utilizaram um terço da dose recomendada de adubação e a inoculação com *R. Leguminosarum* da estirpe Trifolii em um campo de arroz para a produção de grãos, obtendo rendimento equivalente à dose completa de fertilizante nitrogenado recomendada (144 kg N ha^{-1}). Do mesmo modo, a *Burkholderia* MG43, inoculada em cana de açúcar resultou em efeito positivo com o uso de metade da dose de N recomendada para acultura da cana de açúcar, resultando em uma redução de custos de produção na ordem de 140 kg ha^{-1} (GOVINDARAJAN et al., 2006).

Tabela 9 - Produtividade de genótipos de arroz de sequeiro inoculado com inoculante comercial com bactérias do gênero *Azospirillum* sp. – estirpe Abv5/abv6 em diferentes doses de nitrogênio.

Genótipos	Doses de N (% recomendada)			Total (kg ha ⁻¹)
	0	50	100	
Amarelão	1142	1501	1641	1428 C
Cateto	2013	2439	2155	2202 B
Rice Tech	2388	2433	2453	2425 A
Total (kg ha⁻¹)	1848	2124	2083	

Fonte: produção do próprio autor.

Os resultados corroboram com Zorita e Caniglia (2008) e com Piccinin et al. (2001), quando após a inoculação de sementes de trigo com *Azospirillum brasiliense*, obtiveram aumento significativo no rendimento de grãos. Também Hungria (2011) observou em seu estudo o incremento médio de rendimento de milho em torno de 26% e para trigo de 31%, quando inoculados.

Piccinin et al. (2013), estudando o efeito da inoculação de sementes de trigo com bactérias de *Azospirillum brasiliense* em diferentes doses de nitrogênio encontraram efeito positivo do uso

de inoculante turfoso associado à dose máxima de N utilizada sobre a produção de 3072,3 kg ha⁻¹ de grãos de trigo, efeito diferente quando utilizado o inoculante líquido, onde o maior rendimento foi obtido quando a inoculação foi associada a metade da dose de nitrogênio.

Dobbelaeere et al. (2003) trabalhando com milho e Santa et al. (2008) com trigo, observaram que o aumento do rendimento é diretamente ligado à contribuição da FBN através da associação de bactérias do gênero *Azospirillum sp.* Levando em consideração as doses de N adicionadas. Assim como Zagonel et al. (2002) e Heinemann et al. (2006) também encontraram efeito positivo de doses de N no rendimento de sementes de trigo.

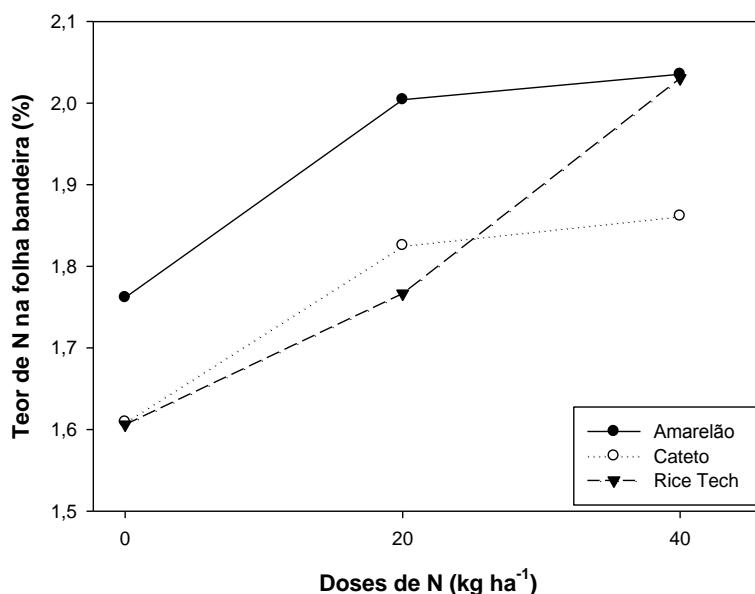
Braccini et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes para o milho, verificando que a inoculação de sementes com *A. brasiliense* na forma líquida aumentou a altura da planta e o rendimento de grãos em relação ao controle, confirmando a hipótese de que as estirpes de bactérias do gênero *Azospirillum Abv5-Abv6* são eficazes para FBN quando realizado a inoculação de sementes de forma adequada e racional, o que pode reduzir a aplicação de fertilizantes nitrogenados na cultura do trigo em 50%, levando a economia de matérias primas e de trabalho.

No período de floração da cultura foi realizada a coleta de folhas bandeiras para a determinação dos teores de nitrogênio e fósforo. Entre os genótipos e entre os tratamentos de inoculação não foram observadas diferenças significativas. Sendo que o teor médio de nitrogênio apresentou diferenças entre as doses de nitrogênio adicionadas ao solo (Figura 11), apresentando comportamento linear, ou seja, com o aumento das doses de N adicionadas ao solo (0, 50 e 100% do recomendado) o teor de N na folha bandeira também aumentou, sendo que o teor médio variou de 1,66, 1,87 e 1,98% para as dose 0, 50 e 100% da dose recomendada. Já o teor de fósforo na folha bandeira além de diferença entre as doses de nitrogênio adicionadas, apresentou diferenças entre os três genótipos de arroz utilizado no estudo como observado na Tabela 10. O genótipo de arroz Rice Tech (variedade irrigado) apresentou o maior teor de P na folha bandeira, 0,17% seguido do genótipo crioulo de arroz de sequeiro amarelão com 0,16% e o genótipo cateto com 0,15% de fósforo. Entre as doses de nitrogênio aplicado ao solo, observou-

se comportamento quadrático, sendo que na dose 0% de N o teor de P na folha bandeira foi maior, chegando a 0,17%, seguido de 0,16% e 0,14% nas doses 50 e 100% de N adicionado respectivamente.

Ao final do ciclo da cultura foi realizada a colheita dos grãos dos genótipos de arroz de sequeiro e a partir do qual foram determinados os teores de N e P. A análise dos teores de N mostrou a ocorrência de diferenças significativas do acumulo de N no grão apenas entre os genótipos avaliados (Tabela 11).

Figura 11 - Teor de nitrogênio em folha bandeira de genótipos de arroz de sequeiro inoculados com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes doses de nitrogênio.



Fonte: Produção do próprio autor.

Os genótipos crioulos de arroz de sequeiro foram mais eficientes no acúmulo de N no grão, sendo o genótipo Cateto o que apresentou o maior teor de N no grão, 0,89%, seguidos do

genótipo amarelão e Rice Tech com 0,85 e 0,73% respectivamente.

Tabela 10 - Teor de fósforo em folha bandeira de genótipos de arroz de sequeiro inoculado com inoculante comercial com bactérias do gênero *Azospirillum* sp. – estirpe Abv5/abv6 em diferentes doses de nitrogênio.

Genótipos	Doses de N (kg ha ⁻¹)			Total (%)
	0	20	40	
Amarelão	0,17	0,17	0,15	0,16 AB
Cateto	0,16	0,15	0,12	0,15 B
Rice Tech	0,18	0,17	0,16	0,17 A
Total (%)	0,17	0,16	0,14	

Fonte: Produção do próprio autor.

Tabela 11 - Teor de nitrogênio no grão de genótipos de arroz de sequeiro inoculado com inoculante comercial com bactérias do gênero *Azospirillum* sp. – estirpe Abv5/abv6 em diferentes doses de nitrogênio.

Genótipos	Doses de N (kg ha ⁻¹)			Total (%)
	0	20	40	
Amarelão	0,65	0,88	1,02	0,85 AB
Cateto	0,89	0,94	0,86	0,89 A
Rice Tech	0,69	0,83	0,68	0,73 B

Fonte: Produção do próprio autor.

Vários autores obtiveram resultados positivos com bactérias do gênero *Azospirillum*, as quais promoveram o crescimento e o acúmulo de N em plantas de trigo (SALA et al., 2005), trouxe benefícios na manutenção dos afilhos férteis, maior extração de N e acúmulo nos grãos (JEZEWSKI et al., 2010), aumento de produção (SALA et al., 2007), translocação mais eficiente do N para os grãos, maior peso de grãos (DIDONET et al., 2000) e maior desenvolvimento radicular. Contudo, outros autores não encontraram diferença entre tratamentos com e sem a inoculação (CAMPOS et al., 1999).

Conforme dados obtidos por DIDONET et al. (2000) pode-se evidenciar que a utilização do tratamento com

Azospirillum brasiliense, via tratamento de sementes proporcionou uma maior produtividade de grãos na cultura do trigo, uma vez que a bactéria é capaz de contribuir com um melhor aproveitamento de nitrogênio acumulado, inicialmente na biomassa, que posteriormente é translocado para o grão. Este fato vem corroborar com resultados obtidos anteriormente em outros estudos que comprovaram que gramíneas são colonizadas por bactérias diazotróficas endofíticas, as quais contribuem com parte da nutrição da planta, seja através do processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) ou da produção de hormônios, que atuam no aumento do sistema radicular das plantas (BASHAND et al., 1990; DIDONET et al., 2000; BALDANI e BALDANI, 2005; SALA et al., 2005). Em estudos realizados por ROGER & LADHA (1992), foi demonstrado que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) no arroz irrigado pode render até 50 Kg ha⁻¹ de N, sendo considerado que, provavelmente, a FBN realizada nestas plantas seja o resultado da atividade de várias espécies de microrganismos diazotróficos associados (NEVES & RUMJANEK, 1998; CRUZ et al.; 2001). A cultivar de arroz irrigado pode interferir na FBN das bactérias associadas à cultura. APP et al. (1986) encontraram diferenças significativas entre cultivares na fixação do N, quando avaliaram o balanço do N em 83 cultivares de arroz. GUIMARÃES et al. (2000) avaliaram a capacidade de resposta de três cultivares de arroz irrigado à inoculação com diferentes estirpes de *Burkholderia spp.* e encontraram variações de 67 a 111% na massa seca produzida pelas plântulas de arroz avaliadas, em relação a testemunha. Atribuindo-se estas diferenças à especificidade entre estirpes bacterianas e cultivares utilizadas.

Baldani et al. (2000), utilizando condições gnotobióticas, obtiveram aumentos de até 54 % no acúmulo de N em plantas de arroz associado a *Herbaspirillum spp.* Os resultados obtidos mostram que dos isolados testados poucos foram os que propiciaram algum benefício ao trigo, como também demonstrado por Baldani et al. (2000) em estudo de seleção de *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de arroz. Realmente, um dos pontos cruciais para seleção e manejo desses diazotróficos é a especificidade planta-bactéria, como também constataram Salomone & Döbereiner (1996).

Reis et al. (2000) indicaram, como estratégia para intensificação da seleção de bactérias diazotróficas associativas, o uso de experimentos em condições gnobióticas com várias bactérias e um genótipo. Aumentos moderados, em torno de 20%, atribuídos à inoculação com diazotróficos endofíticos, seriam considerados comercialmente significativos na agricultura moderna (Bashan & Levanony, 1990).

A inoculação de bactérias diazotróficas associativas tem-se mostrado eficiente em aumentar a atividade da nitrogenase e propiciar ganhos, principalmente no acúmulo de matéria seca, produção de grãos, concentração de N e outras características agronômicas na maioria dos estudos, mas também sem efeitos ou com efeitos prejudiciais em outros. Em geral, o efeito da inoculação sobre a produção situa-se em torno de 10 a 30 % e, em alguns casos, valores mais elevados de 50 a 250 % têm sido mencionados (BODDEY & DOBEREINER, 1988).

Em seu estudo Pinto Junior et al. (2012) avaliando a inoculação de *Azospirillum brasiliense* na cultura do milho, observou que todos os tratamentos com inoculação de bactérias diazotróficas apresentaram resultados superiores ao da testemunha (sem inoculação e sem adição de nitrogênio), e iguais ao tratamento controle com a maior dose de N (120 Kg ha⁻¹) para matéria seca de caule, folha e total. O tratamento que se destacou foi com inoculação das estírpes Ab-V5 + AbV6 + 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio, com acréscimos em relação ao da testemunha em 103,82% para matéria seca de caule, 65,11% na matéria seca de folha e 80,36% na matéria seca total. Este incremento no acúmulo de massa seca da planta em resposta à inoculação pode ser associado à produção de fitohormônios pelas bactérias como auxinas, giberelinas e citocininas, que estimulam a formação de pelos radiculares e raízes secundárias, resultando em maior superfície de absorção de água e nutrientes (RADWAN et al., 2004).

Também Pinto Junior et al. (2012) encontrou que a inoculação com as estírpes de forma isolada ou em combinação promoveu incrementos no diâmetro de caule, área foliar e altura de plantas, aumentando em até 20,72; 63,70 e 29,47%, respectivamente. Não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos para teor relativo de clorofila e teor de N, P e K nas folhas de milho.

Resultados contrários foram obtidos por Dobbelaere et al. (2001), ao trabalharem com bactérias do gênero *Azospirillum*. Estes autores relatam que este maior teor de N nas plantas inoculadas é resultado tanto da FBN, quanto dos mecanismos de promoção do crescimento, que podem incrementar a capacidade das plantas em absorver este nutriente. O benefício da inoculação do milho com bactérias diazotróficas depende de fatores como genótipo da planta, estirpes selecionadas, inter-relação entre ambos e o meio ambiente (SALA et al., 2007).

Na tabela 12 é apresentado o teor de fósforo no grão e os efeitos obtidos na análise estatística realizada. O fósforo acumulado no grão apresentou diferenças entre os genótipos produzidos e entre as doses de nitrogênio adicionadas ao solo. O genótipo cateto apresentou o maior teor de P, acumulando 0,29%, seguidos do genótipo Rice Tech com 0,27% e do genótipo amarelão com 0,24% de P no grão. Entre as doses de N adicionadas ao solo o comportamento do acúmulo de P no grão foi semelhante ao comportamento do acúmulo de P na folha bandeira em todos os genótipos avaliados. A média de P acumulado na dose 0% foi de 0,29%, e na dose 50 e 100% foi de 0,26% de P no grão, demonstrando comportamento quadrático.

Tabela 12 - Teor de fósforo no grão de genótipos de arroz de sequeiro inoculado com inoculante comercial com bactérias do gênero *Azospirillum* sp. – estirpe Abv5/abv6 em diferentes doses de nitrogênio.

Genótipos	Doses de N (kg ha ⁻¹)			Total (%)
	0	20	40	
Amarelão	0,27	0,24	0,23	0,24 B
Cateto	0,32	0,28	0,29	0,29 A
Rice Tech	0,30	0,26	0,26	0,27 AB
Total (%)	0,29	0,26	0,26	

Fonte: Produção do próprio autor.

Dentre esses mecanismos, destacam-se a produção de hormônios, que interferem no crescimento das plantas e podem alterar a morfologia das raízes, possibilitando a exploração de maior volume de solo (BASHAN e HOGUIN, 1997; ZAIED et al., 2003), o aumento do processo da redução assimilatória de nitrato

disponível no solo (BODDEY et al., 1986) e a fixação biológica do N₂ (INIGUEZ et al., 2004). Entre esses mecanismos o aumento do sistema radicular, estimulado pela presença de bactérias, através da produção de substâncias promotoras do crescimento radicular, pode resultar em maior absorção de minerais e de água (OKON e LABANDERAGONZALEZ, 1994).

5.4 CONCLUSÕES

- 1.** A inoculação com bactérias de *Azospirillum*, estirpe Abv5/abv6 não promoveu a fixação biológica de nitrogênio e a promoção de crescimento nos genótipos de arroz de sequeiro utilizados no estudo.
- 2.** Com o aumento das doses de nitrogênio ao solo foi observado o aumento do teor de N na folha bandeira, que é responsável pelo desenvolvimento e crescimento dos grãos. Já quando avaliado o teor de N no grão, não foi verificado aumento no teor de N.

5.5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

APP, A. A.; WATANABE, I.; VENTURA, T.S. et al. **The effect of cultivated and wild rice varieties on the nitrogen balance of flooded soil.** Soil Science, v. 141, p. 448-452, 1986. ARROZ IRRIGADO: RECOMENDAÇÃO TÉCNICAS DA PESQUISA PARA O SUL DO BRASIL, Pelotas. Documento n. 57, Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado/EPAGRI/IRGA, 124 p., 1999.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEEINER, J. **Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp..** Biol Fert Soils, v. 30, p. 485–491, 2000.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.77, p.549-579, 2005.

BASHAN, Y. HOGUIN, G. **Azospirillum-plant relationship: Environmental and physiological advances (1990-1996).** Can. Journal Microbiology, v.43, p.103-121, 1997.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. **Current status of Azospirillum inoculation technology: Azospirillum as a challenge for agriculture.** Canadian Journal of Microbiology, v.36, p.591-605, 1990.

BODDEY, R.M., BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I.; et al.. **Effect of inoculation of Azospirillum spp on the nitrogen assimilation of field grown wheat.** Plant and Soil, v.95:109-121, 1986.

BODDEY, R.M. & DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for the future research. Plant Soil, 108:53- 65, 1988.

CAMPOS, B.H.C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. **Inoculante “Graminante” nas culturas de trigo e aveia.** Ciência Rural, v.23, n.3, p.401-407, 1999.

CAZETTA, D. A.; ARF, O.; BUZZETTI, S.; et al. **Desempenho do arroz de terras altas com a aplicação de doses de nitrogênio e em sucessão às culturas de cobertura do solo em sistema de plantio direto.** Bragantia, Campinas, SP, v. 67, n. 2, p. 471 – 479, 2008.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B. et al. **16 S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril).** Applied Environmental Microbiology, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, 2001.

DIDONET, A.D.; LIMA, O.D.S.; CANDATEN, A.A.; et al.. **Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido à inoculação de *Azospirillum*.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.35, n.2, Feb. 2000.

DOBBELAERE, S. et al. **Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*.** Australian Journal Plant and Physiology, v. 28, n.9, p. 871-879, 2001.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; et al.. **Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*.** Plant Soil, v. 280, p. 239–252, 2006.

GOVINDARAJAN, M.; KWON, S. W.; WEON, H. Y. **Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp.** World J Microbiol, v. 23, p. 997–1006, 2007.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro.** Agronomia, v. 37, nº2, p. 25 – 30, 2003.

GUIMARÃES, S. L.; SABINO, D. C. C.; FERREIRA, J. S. et al. **Efeito da inoculação de estirpes de *Burkholderia* spp em 3 cultivares de arroz inundado crescidas em condições gnobióticas.** In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 24., REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 8., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 6., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 3., 2000. Santa Maria. Anais. Santa Maria: UFSM, p. 146, 2000.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPPLETT, E.W. **Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342.** Molec. Plant Microbiology, v.17, p.1078-1085, 2004.

JEZEWSKI, T. J.; SILVA, J. A. G.; FERNANDES, S. B. V. **Efeito da inoculação de *Azospirillum* em trigo, isolado e associado a estimulante de crescimento no noroeste do RS.** In: Congresso de Iniciação Científica da UFPel, 2010, Pelotas/RS. XIX Congresso de Iniciação Científica, XII Encontro de Pós-graduação e II Mostra Científica da UFPel, v.1, p. 568-571, 2010.

MATTHEWS, S.S.; SPARKES, D. L.; BULLARD, M. J.. **The response of wheat to inoculation with the diazotroph *Azorhizobium caulinodans*.** Aspects Appl Biol, v. 63, p. 35–42, 2001.

MENDE, M. C.; ROSÁRIO, J. G. dos; FARIA, M. V.; et al.. **Avaliação da eficiência agronômica de *Azospirillum brasiliense* na cultura do trigo e os efeitos na qualidade de farinha.** Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias, Guarapuava-PR, v. 4, n.3, p.95-110, 2011.

NEVES, M. C. P.; RUMJANEKN. G. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, cap. 1, p. 15-60, 1998.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C.A. **Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation**. Soil Biology and Biochemistry, v.26, p.1591-1601, 1994.

PINTO JUNIOR, A. S.; GUIMARÃES, V. F; RODRIGUES, L F. O.S; et al.. **Resposta a Inoculação de Estípulas de Azospirillum brasiliense na Cultura do Milho na Região Oeste do Paraná**. XXIX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO - Águas de Lindóia - 26 a 30 de Agosto de 2012.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. **Efeito da inoculação de Azospirillum e Herbaspirillum na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.39, n.10, p.987-994, 2004.

REIS, B. Van; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.; DOBEREINER, J. **Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees**. Critical Reviews in Plant Sciences, v. 19, p. 227 – 247, 2000.

RODRIGUES, O., DIDONET, A. D., GOUVEIA, J. A., SOARES, R. C. **Nitrogen translocation in wheat inoculated with Azospirillum and fertilized with nitrogen**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 35, n.7, Brasília, p.1473-1481, 2000.

ROGER, P. & LADHA, J.K. **Biological N₂ fixation in wetland rice fields: Estimation and contribution to nitrogen balance**. Plant and Soil, v.141, p. 41-55, 1992.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N. FREITAS, J. G.; et al.. **Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.42, n.6, p.833-842, 2007.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. dos S.; DONZELI, V. P.; et al.. **Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 29, p. 345-352, 2005.

SALEH, S. A.; MEKHEMAR, G. A. A.; EI-SOUD, A. A. A.; et al.. **Survival of Azorhizobium and Azospirillum in different carrier materials: inoculation of wheat and Sesbania rostrata.** Bulletin of Faculty of Agriculture, Cairo University, v. 52, p. 319-338, 2001.

SALA, V.M.R.; SILVEIRA, A.P.D. da; CARDOSO, E.J.B.N. **Bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas.** In: SILVEIRA, A.P. da; FREITAS, S. dos S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: IAC, 2007. Cap. 6, p. 97-116.

SALOMONE, I.G. & DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. Biol. Fertil. Soils, 21:193-196, 1996.

SILVA, D. M. da; FRIES, Marcos R. (in memorian); ANTONIOLLI, Zaida I.; et al.. **Bactérias diazotróficas em solo cultivado com arroz irrigado (*Oryza sativa L.*)** Revista Brasileira de Agrociência, v.10, n. 4, p. 467-474, out-dez, 2004.

SUDIN, M. F. C. A. M. **Efeito do molibdênio associado ao nitrogênio mineral e *Herbaspirillum seropediae* em cultivares de arroz (*Oryza sativa L.*)** Tese de Doutorado. UFRRJ, Seropédica-RJ, 183p., 2001.

URQUIAGA, S.; SISTI, C. P. J.; ZOTARELLI, L; et al.. **Manejo de sistemas agrícolas para sequestro de carbono no solo.** In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L.. de (Ed.). **Conhecimentos e técnicas avançadas para o estudo dos processos da biota no sistema solo-planta.** Brasilia.: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. P. 257 – 273.

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

ZAIED, K.A.; EL-HADY, A.H.; AFIFY, A.H.; et al.. **Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria.** Pakistan. Journal of Biological Sciences, v.4, p.344-358, 2003.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inoculação de arroz de sequeiro com isolados de bactérias diazotróficas endofíticas promove o crescimento de parte aérea e raiz das plantas, aumentando potencial fotossintético da planta e o volume de solo explorado pelo sistema radicular. Desse modo permite maior absorção de água, maior acúmulo e assimilação de nutrientes como o nitrogênio e o fósforo no tecido vegetal, refletindo em maior produtividade da cultura. Corroborando com trabalhos que mostram que grande parte do nitrogênio acumulado em gramínea é devido a fixação biológica de nitrogênio (URQUIAGA et al., 1992; POLIDORO, 2002; OLIVEIRA et al., 2002). Entretanto, sabe-se que adubações com fertilizantes nitrogenados nas gramíneas influenciam na população de microrganismos diazotróficos endofíticos, principalmente nas raízes (SALA et al., 2005). Fato este que deve ser levado em consideração quando da realização da adubação de base e de cobertura em gramíneas.

O uso da técnica de diluição isotópica de ^{15}N e abundância natural de ^{15}N mostrou-se uma importante ferramenta na avaliação da fixação biológica de nitrogênio e da promoção de crescimento nos genótipos de arroz de sequeiro. Com seu uso foi possível identificar e avaliar o potencial de bactérias diazotróficas endofíticas, isoladas no laboratório de microbiologia do solo no Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Na década de 80, foram verificados, por meio da técnica de diluição isotópica de ^{15}N , que cerca de 20 kg N ha^{-1} acumulados nas plantas dessa gramínea eram derivados da FBN (BODDEY et al., 1983). Esta técnica também possibilitou a confirmação de que várias gramíneas de clima tropical se beneficiam do nitrogênio que é fixado biologicamente (DE-POLLI et al., 1977), como é o caso do arroz, com contribuições da FBN variando de 6,0% a 29,0% (OLIVEIRA, 1994). Da mesma forma Dobereiner & Baldani (1995) observaram que estípulas de *Herbaspirillum* spp. quando inoculadas em plantas de arroz cultivadas em solução de Hoagland contendo nitrogênio marcado, contribuíram com aumentos de cerca de 40% no N-total acumulado nas plântulas. No entanto, em casa de

vegetação, aumentos variando entre 17 e 19% do N incorporado à planta devido à FBN foram observados com a inoculação de estirpes de *H. seropedicae* e *B. brasiliensis* (BALDANI et al., 2000). Do mesmo modo, em culturas como o trigo, a contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada tem sido bastante variada. Quando inoculado com *Azospirillum* spp., a contribuição, quantificada através da aplicação da técnica do ^{15}N tem sido em torno de 7% a 10% (MALIK et al., 2001). Em cana-de-açúcar, o uso de inoculantes com bactérias diazotróficas pode gerar incrementos de até nove toneladas por hectare (SHANKARIAH & HUNSIGI, 2001).

No estudo em condições de campo, a cultura do arroz de sequeiro se mostrou responsiva à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas, como também mostra os resultados de DALLA SANTA et al. (2004b) em experimentos com milho sob condições de campo, utilizando *Azospirillum* sp, estirpes RAM-7 e RAM-5, observaram a redução de 40% da necessidade de fertilização nitrogenada recomendada para a cultura. Do mesmo modo, Suman et al. (2005), ao avaliar a inoculação individual de estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associada à adubação mineral nitrogenada na dose 75 kg ha $^{-1}$ de N em cana-de-açúcar, verificaram que a inoculação em geral favoreceu o acúmulo de nitrogênio na parte aérea da planta, com incrementos de 7,32 a 21,97%, em relação ao tratamento controle. Corroborando com Shankariah & Hunsigi (2001) observaram aumento da produtividade da cana-de-açúcar inoculada com *Azospirillum brasiliense* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* de 9 e de 5 t ha $^{-1}$, respectivamente.

Avaliando os resultados já obtidos em estudos similares, pode-se dizer que a inoculação de arroz de sequeiro, assim como outras gramíneas de interesse econômico é importante ao se avaliar as questões sociais e econômicas do pequeno produtor rural e as questões relativas a preservação do meio ambiente. Uma vez que, o uso de inoculantes pelos pequenos produtores torna-se um componente produtivo de suma importância, visto que seu uso pode reduzir consideravelmente o custo produtivo com insumos agrícolas, principalmente os fertilizantes nitrogenados e fosfatados. Insumos estes responsáveis diretos pelo nível de produtividade e os mais

onerosos em termos de custos para os agricultores que produzem para sua subsistência.

Diante desse cenário, produção de subsistência, a busca e o uso de novas tecnologias, como bactérias com potencial para fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento, gera aumentos consideráveis na renda, volume de produção, melhoria de qualidade de vida no meio rural, além de minimizar os efeitos negativos do uso excessivo de fertilizantes químicos sobre o meio ambiente.

De modo geral a busca de tecnologias renováveis, ditas “limpas” para amenizar o impacto ambiental é um dos principais objetivos de pesquisas amplamente estudadas pela sociedade científica e que apresentam respaldo pela sociedade civil, uma vez que geram grandes avanços na geração de tecnologias.