

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

TESE

**Inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em Duas
Variedades de Arroz Irrigado: Qualidade do
Inoculante e Necessidade da Reinoculação**

Joilson Silva Ferreira

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA -
CIÊNCIA DO SOLO**

**INOCULAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* EM DUAS VARIEDADES
DE ARROZ IRRIGADO: QUALIDADE DO INOCULANTE E
NECESSIDADE DA REINOCULAÇÃO**

JOILSON SILVA FERREIRA

Sob a Orientação da Professora
Vera Lúcia Divan Baldani

e Co-orientação dos Professores
José Ivo Baldani

Sonia Regina de Souza

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências em
Agronomia, Área de Concentração
em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2008

633.18

F383i

T

Ferreira, Joilson Silva, 1977-
Inoculação de Herbaspirillum
seropedicae em duas variedades de
arroz irrigado: qualidade do
inoculante e necessidade da
reinoculação/ Joilson Silva
Ferreira - 2008.
85 f.: il.

Orientador: Vera Lúcia Divan
Baldani.

Tese (Doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f. 59-67.

1. Arroz - Cultivo - Teses. 2.
Arroz - Inoculação - Teses. 3.
Bactérias nitrificantes - Teses. 4.
Nitrogênio - Fixação - Teses. I.
Baldani, Vera Lúcia Divan, 1954- .
II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Instituto de
Agronomia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta tese, desde que seja citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO

JOILSON SILVA FERREIRA

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** em Agronomia.

TESE APROVADA EM 27/02/2008

Vera Lúcia Divan Baldani. Ph.D., Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)

Silvia Regina Goi. Ph. D., UFRRJ

Marcos Gervásio Pereira. Dr., UFRRJ

Marivaine da Silva Brasil. Dra., UFMS

Eliana Gertrudes de Macedo Lemos. Dra., UNESP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eremita e Manoel.
Às minhas irmãs, Fátima, Elenilson e Janilza.
Aos meus sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

Ao CPGA-CS, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, pela oportunidade concedida.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, da UFRRJ e da Embrapa Agrobiologia que tornarão estes anos de trabalho os melhores possíveis.

Aos professores e funcionários do Departamento de Solos, em especial aos professores Marcos Gervásio Pereira, Alexandre Ravelli e Lúcia Cunha dos Anjos e aos funcionários Roberto e Luciene da Secretária do curso.

À Embrapa Agrobiologia por fornecer condições para a realização deste trabalho.

À Dra. Vera Baldani pela orientação e apoio em todos os momentos do desenvolvimento desta tese e no convívio do dia-dia.

Ao Dr. José Ivo Baldani e a Prof. Sônia Regina de Souza pela co-orientação.

Aos funcionários da Embrapa Agrobiologia que ajudaram neste trabalho.

A Geraldo Baeta por está sempre a disposição para ajudar a qualquer momento.

Aos laboratoristas Lúcio e Wilson, à Dra. Verônica Massena Reis e aos bolsistas e ex-bolsistas do laboratório de Gramíneas, Salomão, Daniele, Marcela, Luciana, Elisete, Marinete, Gabriela, Marivaine, Liamara, Erineudo, Guilherme, Leandro, Rafael, Wilmondes, Paulo Marcos Fernandes Boa Sorte e Willian por tornarem o laboratório um ambiente de trabalho bem descontraído.

Aos meus amigos Gilmar e Salomão pela ajuda, apoio e respeito em todos os momentos durante esses 15 anos de convivência.

Aos Amigos Deividson, Michael, Vandro e Geovane pelos bons momentos que passamos por todos esses anos.

Ao grupo que tentou formar a mesa das quartas-feiras, Cristiane, Ricardo, Daniele, Salomão, Edilson e Liamara, mas que não deu muito certo.

Ao pessoal do campo experimental da Embrapa (Terraços e Casa de Vegetação) pela ajuda e colaboração nos experimentos.

Por fim, um agradecimento especial a Grande Amiga Michele de Oliveira Macedo que partiu de forma inesperada, mas as lembranças da pessoa maravilhosa que foi, ficará para sempre em minha memória.

BIOGRAFIA

Nascido em Inhambupe, município do estado da Bahia, filho de Eremita Silva Ferreira e Manoel Quirino Ferreira, concluiu o ensino fundamental no Colégio Estadual Mário Costa Filho no ano de 1991. Ingressando em 1992 no Curso de Magistério no mesmo colégio. Sendo que em 1993 desistiu do magistério e ingressou no curso de Técnico em Agropecuária, pela Escola Agrotécnica Federal de Catu - BA, concluindo o curso em 1995. Em 1996 trabalhou como funcionário temporário do IBGE, onde foi responsável pela coordenação dos censos agropecuário e populacional no município de Inhambupe. No ano de 1997 iniciou o Curso de Engenharia Florestal pela UFRRJ, em 1997 e 1998 foi bolsista de pré-iniciação científica no Departamento de Produtos Florestais do Instituto de Florestas da UFRRJ. Iniciou em 1999 trabalhos de pesquisa na Embrapa Agrobiologia como Bolsista de Iniciação Científica sob a orientação da Dra. Vera Lúcia Divan Baldani. Formou-se em Engenharia Florestal em 2002, concluindo o mestrado em Agronomia - Ciência do Solo em 2004 e no mesmo ano iniciou o curso de doutorado.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de organismos de vida livre fixadores de nitrogênio.....	4
Tabela 2: Análise química de amostras de terra utilizada no plantio das variedades de arroz no experimento de vasos.....	13
Tabela 3: Análise química das amostras de terra do horizonte A do Argissolo Vermelho Amarelo utilizado nos experimentos com a cultura do arroz.....	14
Tabela 4: Análise química das amostras de terra do horizonte A do Argissolo Vermelho Amarelo utilizado nos experimentos com a cultura do arroz.....	15
Tabela 5: Iniciadores utilizados nas reações de amplificação para análise por DGGE e respectivas seqüências de nucleotídeos.....	17
Tabela 6: Número de bactérias diazotróficas crescidas no meio de cultivo JNFb, presentes em raiz e parte aérea de arroz inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> , variedade IAC4440, no estágio de desenvolvimento, vegetativo.....	23
Tabela 7: Acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IR42 inoculadas com ou sem a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0 e 50 kg de N . ha ⁻¹).....	24
Tabela 8: Acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IAC4440 inoculadas com ou sem a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0 e 50 kg de N . ha ⁻¹).....	24
Tabela 9: Produção de grãos das plantas de arroz da variedade IR42 inoculadas com ou sem a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0 e 50 kg de N . ha ⁻¹).....	25
Tabela 10: Produção de grãos das plantas de arroz da variedade IAC4440 inoculadas com ou sem a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> e com ou sem fertilizante (0 e 50 kg de N . ha ⁻¹).....	25
Tabela 11: Número de bactérias diazotróficas crescidas no meio de cultivo JNFb, presentes em raiz e parte aérea de arroz, variedades IAC4440 e IR42, inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> , nos estádios de desenvolvimento vegetativo e florescimento (Primeiro ano)	26
Tabela 12: Acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento vegetativo (80 DAP), inoculadas com a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N . ha ⁻¹).....	27
Tabela 13: Acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IAC4440, no estágio de desenvolvimento vegetativo (80 DAP), inoculadas com a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N . ha ⁻¹).....	27
Tabela 14: Acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento florescimento, inoculadas com a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N . ha ⁻¹)..	28
Tabela 15: Acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IAC4440, no estágio de desenvolvimento florescimento, inoculada com a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N . ha ⁻¹).....	28

Tabela 16: Acúmulo de nitrogênio total da parte aérea das plantas de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento vegetativo, inoculadas com a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha ⁻¹).	29
Tabela 17: Acúmulo de nitrogênio total da parte aérea das plantas de arroz da variedade IAC4440, no estágio de desenvolvimento vegetativo, inoculadas com a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha ⁻¹).	29
Tabela 18: Acúmulo de nitrogênio total da parte aérea das plantas de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento florescimento, inoculadas com a estirpe ZAE 94 e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha ⁻¹).	29
Tabela 19: Acúmulo de nitrogênio total da parte aérea das plantas de arroz da variedade IAC4440, no estágio de desenvolvimento florescimento, inoculadas com a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha ⁻¹).	30
Tabela 20: Produção de grãos das plantas de arroz da variedade IR42 inoculada com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹).	30
Tabela 21: Produção de grãos das plantas de arroz da variedade IAC4440 inoculadas com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹).	32
Tabela 22: Acúmulo de nitrogênio total dos grãos de arroz da variedade IR 42 inoculada com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹).	34
Tabela 23: Acúmulo de nitrogênio total dos grãos de arroz da variedade IAC 4440 inoculada com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹).	35
Tabela 24: Acúmulo de proteína total dos grãos de arroz da variedade IR 42 inoculada com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹).	36
Tabela 25: Acúmulo de proteínas dos grãos de arroz da variedade IAC 4440 inoculada com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹).	37
Tabela 26: Número de bactérias diazotróficas crescidas no meio de cultivo JNFb, presentes em raiz e parte aérea de arroz, variedades IAC4440 e IR42, inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> , nos estádios de desenvolvimento, vegetativo e florescimento.	39
Tabela 27: Acúmulo de biomassa seca e nitrogênio total da parte aérea das plantas de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento vegetativo (80 DAP) e florescimento inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha ⁻¹) e tratamentos de reinoculação.	40
Tabela 28: Acúmulo de biomassa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IAC4440, no estágio de desenvolvimento vegetativo (80 DAP) e florescimento, inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha ⁻¹) e tratamentos de reinoculação.	41
Tabela 29: Produção, nitrogênio total e proteína bruta total dos grãos das plantas de arroz da variedade IR42 inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum</i>	

	<i>seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹) e tratamentos de reinoculação.....	42
Tabela 30:	Produção, nitrogênio total e proteína total dos grãos das plantas de arroz da variedade IAC4440 inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹) e tratamentos de reinoculação.....	43
Tabela 31:	Número do acesso e respectiva identificação das estirpes das espécies do gênero <i>Herbaspirillum</i> depositadas no GenBank e utilizadas no alinhamento da 16S DNAr.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Desenho experimental dos tratamentos do primeiro ano para uma variedade em um bloco.....	15
Figura 2: Desenho experimental dos tratamentos do experimento de reinoculação (segundo ano) para uma variedade em um bloco.	16
Figura 3: Sobrevivência da estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> em inoculante turfoso preparado utilizando turfa neutralizada com (CaCO ₃) à pH 6,0 e 7,0 e teor de umidade de 43 %.....	19
Figura 4: Sobrevivência da estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> em função do tempo nos diferentes teores de umidades (20 (a), 43 (b), 60 (c) e 80 % (d)) utilizados no preparo dos inoculantes.	21
Figura 5: Sobrevivência da estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> em inoculante turfoso preparado com diferentes teores de umidade aos 180 dias de armazenamento em geladeira.....	22
Figura 6: Sobrevivência da estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> em inoculante turfoso armazenados em dois tipos de embalagem: (1) mais porosa (2) menos porosa e mantidos em geladeira por 180 dias.....	23
Figura 7: Análise de regressão da produção de grãos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹) na variedade IR42 inoculada ou não com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	31
Figura 8: Análise de regressão da variável produção de grãos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹) na variedade IAC4440 inoculada ou não com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	32
Figura 9: Análise de regressão da variável nitrogênio total dos grãos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹) na variedade IR42 inoculada ou não com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	34
Figura 10: Análise de regressão da variável nitrogênio total dos grãos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹) na variedade IAC440 inoculada ou não com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	35
Figura 11: Análise de regressão da variável proteína total dos grãos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹) na variedade IR42 inoculada ou não com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	36
Figura 12: Análise de regressão da variável proteína total dos grãos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha ⁻¹) na variedade IAC440 inoculada ou não com a estirpe ZAE 94 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	37
Figura 13: Árvore filogenética da região 16S rRNA das diferentes espécies do gênero <i>Herbaspirillum</i> em comparação com a estirpe ZAE 94, agrupadas pelo método neighbour-joining.....	45
Figura 14: DNA total extraído dos tecidos do colmo das plantas de arroz (primeiro experimento de campo).....	46
Figura 15: Fragmentos de 700 pb obtidos a partir da reação de PCR da região de 16s rRNA utilizando os primers específicos 799f e 1492r (material amplificado do primeiro experimento de campo).....	47
Figura 16: Produto de amplificação da região de 16s rDNA utilizando os primers específicos 968f(GC) e 1401r (material amplificado do primeiro experimento de campo).....	48

Figura 17: Dendograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelComparII. Experimento de Inoculação.....	49
Figura 18: Dendograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelComparII. Experimento de Reinoculação.....	50
Figura 19: Dendograma de similaridade (UPGMA) e alinhamento das bandas obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelComparII. Experimento de Inoculação	52
Figura 20: Dendograma de similaridade (UPGMA) e alinhamento das bandas obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelComparII. Experimento de Reinoculação.....	53
Figura 21: Dendograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelComparII. Experimento de Inoculação.....	54
Figura 22: Dendograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelComparII. Experimento de Reinoculação.....	55

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO GERAL	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 - A Cultura do Arroz.....	3
2.2 - A Importância do Nitrogênio	3
2.3 - Organismos Fixadores de Nitrogênio.....	4
2.4 - A Fixação Biológica de N ₂ em Gramíneas	4
2.5 - Reinoculação de Bactérias Diazotróficas.....	6
2.6 - Produção e Preparo de Inoculantes	7
2.7 - Fatores que Afetam a Sobrevivência de Microrganismos Diazotróficos.....	9
2.8 – Importância da Técnica de DGGE no Estudo da Diversidade de Bactérias Diazotróficas.....	9
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1- Métodos Gerais Utilizados nos Experimentos	12
3.1.1- Caracterização do material murfoso utilizado e condições de multiplicação da bactéria.	12
3.1.2- Preparo da turfa com diferentes pH.....	12
3.1.3- Preparo dos inoculantes com diferentes teores de umidade.....	12
3.1.4- Sobrevivência das bactérias nas turfas	13
3.1.5- Caracterização das embalagens utilizadas.....	13
3.2- Inoculação da Estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> em Vasos.....	13
3.2.1- Sementes	13
3.2.2- Plantio, tratamentos e delineamento experimental.....	14
3.3- Inoculação e Reinoculação da Estirpe ZAE94 de <i>H. seropedicae</i> em Condições de Campo.....	14
3.3.1- Plantio, tratamentos e delineamento experimental do experimento de inoculação ..	14
3.3.2- Plantio, tratamentos e delineamento estatístico do experimento de reinoculação. ...	15
3.3.3- Análise da diversidade de bactérias presentes nas plantas de arroz inoculadas e reinoculadas com a estirpe de <i>H. seropedicae</i> (estirpe ZAE 94) em condições de campo. ...	16
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 - Sobrevivência da Bactéria em Turfa com Diferentes pH.....	19
4.2 - Sobrevivência da Bactéria em Inoculante com Diferentes Teores de Umidade e Tipo de Embalagem	20
4.3 - Experimento de Inoculação em Vasos	23
4.4 - Experimento de Inoculação de <i>H. seropedicae</i> (estirpe ZAE 94) em Condições de Campo.....	25
4.5 - Experimento de Reinoculação de <i>H. seropedicae</i> (estirpe ZAE 94) em Condições de Campo.....	38
4.6 - Análise da Comunidade Microbiana Presente em Plantas de Arroz Crescidas em Condições de Campo e Inoculadas e Reinoculadas com a Estirpe de <i>H. seropedicae</i> (estirpe ZAE 94).	43
4.6.1 – Sequenciamento da região 16S DNAr da estirpe ZAE 94 de <i>H. seropedicae</i> utilizada nos ensaios de inoculação e reinoculação.....	43

4.6.2 - Análise da comunidade de bactérias presentes nas plantas de arroz inoculadas e reinoculadas com a estirpe ZAE94 através da técnica de DGGE.....	45
5- CONCLUSÕES.....	57
6- CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
8- APÊNDICE	68

RESUMO

FERREIRA, Joilson Silva. **Inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz irrigado: qualidade do inoculante e necessidade da reinoculação.** 2008. 69f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

A demanda para a utilização de bactérias diazotróficas como biofertilizante em diferentes culturas de plantas não leguminosas cresceu muito nos últimos anos, principalmente pelo fato de que ainda não existe no mercado nacional um inoculante disponível para estas plantas. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar alguns aspectos que influenciam na qualidade de inoculantes e o efeito da inoculação e da reinoculação de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe ZAE 94 (BR 11417), aplicada como inoculante na forma turfosa em duas variedades de arroz irrigado: IR 42 e IAC 4440. A qualidade do inoculante foi avaliada através da sobrevivência da estirpe em inoculantes preparados com diferentes teores de umidade, pH e embalagens durante o período de 180 dias de armazenamento em geladeira, e sua contribuição foi avaliada através dos parâmetros de produção, N-total e proteína total dos grãos. O impacto da inoculação e reinoculação, sobre a comunidade de bactérias presentes no colmo das plantas de arroz, foi realizada através da técnica de DGGE. A estirpe ZAE 94 foi multiplicada em meio de cultura por 24 h a 30° C a 100 rpm e a suspensão celular obtida foi misturada à turfa seca, moída e com a acidez corrigida para pH 7,0 e teor de umidade de 43 %. O inoculante produzido foi aplicado nas sementes de arroz, em um experimento em vasos e em dois experimentos consecutivos em campo em solo Argissolo Vermelho Amarelo, com delineamento experimental em blocos ao acaso. Os ensaios de qualidade mostraram que a umidade e tipo de embalagem utilizada foram os parâmetros que mais influenciaram a sobrevivência da estirpe. Os resultados obtidos nos experimentos de inoculação e reinoculação mostraram que o tratamento inoculado, com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae*, foi estatisticamente igual ao tratamento que recebeu 20 kg . ha⁻¹ de nitrogênio mineral, na forma de Sulfato de Amônia, na variedade IR42 e 50 kg . ha⁻¹ na variedade IAC4440 para os parâmetros de produção, N-total e proteínas de grãos. O ensaio de reinoculação mostrou que a utilização do inoculante a base da estirpe ZAE 94 se faz necessária em todos os anos de plantio, já que os tratamentos inoculados e reinoculados foram estatisticamente iguais, porém estatisticamente superiores aos tratamentos não inoculados e ao que havia recebido inoculação somente no ano anterior nas duas cultivares. O uso da técnica de DGGE na análise da comunidade microbiana das plantas de arroz, em ambos experimentos de campo, mostrou uma ampla ocorrência de bandas na mesma altura da espécie *Herbaspirillum seropedicae*, mesmo nos tratamentos que não foram inoculados. Isto indica que esta bactéria tem grande capacidade de colonizar a planta hospedeira. Este estudo também mostrou uma grande ocorrência de bandas diferentes daquelas dos padrões utilizados, o que sugere a colonização das plantas de arroz por diferentes espécies de bactérias.

Palavras-chave: Inoculantes, Bactérias diazotróficas endofíticas, FBN, DGGE.

ABSTRACT

FERREIRA, Joilson Silva., **Inoculation of the *Herbaspirillum seropedicae* in two rice lowland varieties: Inoculant quality and need reinoculation.** 2008. 69f. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2000.

The demand for the use of diazotrophic bacteria as biofertilizant in different non leguminous crops grew a lot in the last years mainly due to the fact that there is no commercial inoculant available in Brazil. The aim of this work was to evaluate some aspects that can influence the quality of the inoculant and the contribution of the inoculation and reinoculation of the *Herbaspirillum seropedicae* strain ZAE 94 (BR 11417), applied as peat inoculant in two varieties of lowland rice: IR 42 and IAC 4440. The quality of the inoculant was evaluated following the survival of the strain used in the inoculant prepared with different moisture levels, pH and type of package bags storage in refrigerator during the period of 180 days and your contribution was evaluated using the parameters yield, N-total and total of proteins accumulated in the grains. The effect of inoculation and reinoculation, on the community of the bacteria present in the stem of the rice plants was evaluated using the technique of DGGE. The strain ZAE 94 was grown in culture medium at 30° C and 100 rpm for 24 h and the obtained cell suspension was used in the different experiments. The inoculant was prepared using grounded dry peat, pH adjusted to 7.0 and with 43% of moisture. The produced inoculant was applied on the seeds of the rice varieties just before planting. One experiment was carried out in pots and two consecutive experiments in the field, the soil in the area classified as Udult, in a randomized block design. The data obtained showed that the moisture and package type were the aspects that had more influence on the survival strain. The results of the inoculation and reinoculation experiments showed that the inoculated ZAE 94 strain was statistically similar to the treatment of 20 kg. ha⁻¹ of ammonium sulfate applied as the nitrogen source in the variety IR42 and equivalent to 50 kg. ha⁻¹ in the variety IAC4440 for the parameters yield, N-total and proteins of grains. The reinoculation experiments showed the necessity to reinoculate the strain ZAE 94 in the following planting years, since that the inoculated and reinoculated treatments were statically similar but significantly superior to the non inoculated treatment and the treatment was inoculated only in the previous year for both parameters and rice varieties used. The DGGE technique applied to analyze the bacterial community present in the rice plants of both experiments showed wide occurrence of bands in the same height of the *Herbaspirillum seropedicae* species, even for the treatments that was not inoculated, suggesting that this bacterium has great capacity of dispersion and colonize the host plant. This study also showed occurrence of bands of different sizes from the control patterns, suggesting that rice plant varieties are colonized by different bacterial species.

Key words: Inoculants, Diazotroph Endophytic Bacteria, FBN, DGGE.

1 – INTRODUÇÃO GERAL

O nitrogênio é um dos elementos minerais mais importantes 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 desta molécula não pode ser rompida pelas plantas. Entre os processos que podem romper esta molécula, tornando-a assimilável pelas plantas, está o da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) que é o mais estudado em culturas de plantas leguminosas (HUNGRIA et al., 2000). A eficiência do processo da FBN em plantas de leguminosas é facilmente visualizada na cultura da soja no Brasil, onde atualmente não se aplica N de fertilizantes minerais, e mesmo assim o Brasil é o segundo maior produtor mundial desta leguminosa (FAO, 2004).

Em plantas não leguminosas, o processo da FBN não é tão eficiente quanto na cultura da soja. Contudo, várias bactérias capazes de fixar nitrogênio atmosférico, como os gêneros *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Azospirillum*, têm sido isoladas de plantas como arroz, trigo, milho e sorgo em vários experimentos (BALDANI, 1984, 1996; OLIVEIRA, 1992; RODRIGUES, 2003). Os resultados de inoculação destas bactérias ainda não são muito consistentes, embora, efeitos significativos na produção de grãos e N-total da planta tenham sido relatados (BALDANI, 1984, 1996).

De uma maneira geral, 60-70% dos experimentos citados por OKON & LABANDERA-GONZALEZ (1994) obtiveram sucesso, sendo que somente 5-30% deles apresentaram respostas estatisticamente significativas à inoculação de bactérias diazotróficas. Um balanço dos resultados de experimentos de inoculação com *Azospirillum* mostra uma grande variabilidade nos efeitos sobre culturas como o trigo, arroz, milho e sorgo, onde a média de incremento na produção de grãos está em torno de 20 a 30% (BALDANI et al., 1999; FERREIRA et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2007).

A inconsistência destes resultados pode ser atribuída à baixa sobrevivência das bactérias diazotróficas endofíticas em solo. Por isso, torna-se importante o estudo da reinoculação destas bactérias, buscando maximizar a contribuição desta associação para a cultura do arroz.

Estudos usando a técnica de diluição isotópica com ¹⁵N mostraram, em condições gnotobióticas, efeitos positivos da inoculação das estirpes diazotróficas endofíticas selecionadas de *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia* sp. Essas estirpes contribuíram com 54 e 27%, respectivamente do N-total acumulado nas plantas de arroz da variedade Guarani (BALDANI et al, 2000). Contudo, ainda não foi desenvolvido um inoculante para o arroz, e os estudos nesse sentido devem avançar, para que seja obtido um inoculante capaz de suprir grande parte das necessidades de nitrogênio deste cereal.

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). Essa contribuição da inoculação é facilmente quantificada numericamente. Entretanto, outros impactos ambientais, como diminuição da contaminação dos lençóis freáticos resultante da minimização do uso de N de fertilizantes minerais, são mais difíceis de serem quantificados matematicamente.

Apesar destes resultados promissores, e do Brasil ser um país referência em FBN em plantas leguminosas e não leguminosas, tendo aparatos tecnológicos e mão-de-obra qualificada, ainda não existe no mercado um inoculante comercial para gramíneas. O desuso desta tecnologia, em culturas como arroz, milho, trigo e cana-de-acúcar, coloca o Brasil em

posição de desvantagem em relação a países como Argentina e México, onde já existem empresas especializadas na produção desta tecnologia, além de gerar perdas à economia brasileira.

Adicionalmente, ainda não existem estudos sobre o efeito da inoculação destes microrganismos sobre a diversidade de bactérias presentes nas plantas, já que o aumento da população de um determinado microrganismo pode afetar a população e a funcionalidade dos demais dentro da planta hospedeira.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: -Avaliar a contribuição da inoculação e reinoculação da bactéria diazotrófica selecionada para as variáveis, produção, N%, N-total e teor de proteína dos grãos, nas variedades de arroz IR42 e IAC4440 em condições de campo, em dois ciclos consecutivos; -Verificar como os fatores, pH, umidade e tipo de embalagem podem afetar diretamente a sobrevivência da bactéria diazotrófica utilizada no preparo dos inoculantes. Avaliar o efeito da sua inoculação da bactéria diazotrófica utilizada sobre a comunidade de bactérias presentes no colmo das plantas de arroz, utilizando a técnica de DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante).

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - A Cultura do Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura anual, monocotiledônea pertencente à família *Poaceae* (MOREIRA & KLUGE, 1999), com distribuição entre as latitudes de 45° Norte a 40° Sul e desde o nível do mar até 3000 metros de altitude (PINZAN, 1986).

O Brasil ocupa atualmente o 9º lugar, com 3% da produção mundial, e produção média anual de 3,4 ton/ha (IBGE, 2007). O estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional. O sistema de cultivo predominante no Rio Grande do Sul é o de irrigação por inundação com uma área plantada de 990 mil hectares (IBGE, 2007). Nos estados de Mato Grosso e Maranhão, o sistema de cultivo é o de sequeiro com área plantada de 494 mil e 372 mil hectares, respectivamente (IBGE, 2007). Este sistema é influenciado pela disponibilidade de água, através da chuva, o cultivo é feito no período de verão, entre os meses de outubro e abril (GUIMARÃES & SANT'ANA, 1999).

Nos últimos 25 anos, a lavoura de arroz tornou-se altamente dependente dos fertilizantes químicos, aumentando assim os custos de produção. A seleção de variedades de arroz mais eficiente na FBN, adaptadas à condição de inundação e de sequeiro, é uma estratégia interessante e deve ser considerada para a sustentabilidade desta cultura (OLIVEIRA, 1994).

2.2 - A Importância do Nitrogênio

O nitrogênio é um dos elementos mais abundante nas plantas como constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucléicos, hormônios e clorofila, entre outras moléculas. No solo o nitrogênio disponível para as plantas pode estar na forma de nitrato, amônia, aminoácidos, peptídios e purinas, sendo encontrados transportadores de membranas para todas estas formas (WILLIAMS & MILLER, 2001).

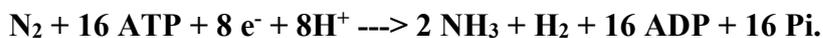
Embora presente na atmosfera em aproximadamente 78% da constituição gasosa, é encontrado na forma molecular (N_2), que não é absorvível pelas plantas, já que a maioria das plantas obtém o nitrogênio do solo sob a forma de íon nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) (FERNADES & SOUZA, 2006).

A forma mais comumente absorvida é a de nitrato, já que o nitrogênio amoniacal liberado pela decomposição da matéria orgânica do solo é rapidamente convertido a nitrato por bactérias quimiossintetizantes. Sendo que sob condições de pH muito ácido, altas concentrações de fenóis ou anoxia, a amônia não é oxidada e pode ficar acumulado no solo e algumas plantas a absorverem nesta forma.

Os átomos de nitrogênio presentes na molécula de N_2 encontram-se unidos de uma maneira muito estável. Por esse motivo, para que o N_2 possa ser convertido a uma forma assimilável é necessário o fornecimento de temperatura e pressão muito elevadas (fixação industrial), processo esse que consome muita energia e encarece o preço do adubo nitrogenado. Assim, a presença de um sistema enzimático apropriado (fixação biológica) realiza a conversão de uma forma mais econômica.

A fixação industrial do N_2 , chamada de processo de Haber-Bosch, utiliza temperaturas em torno de 200 °C e pressões em torno de 200 atm, sendo dispendiosa do ponto de vista energético (TAIZ & ZEIGER, 2004).

No processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), organismos procariotos são capazes de assimilar o N₂ atmosférico e convertê-lo a forma assimilável (NH₃). A FBN ocorre graças à enzima nitrogenase, o que do ponto de vista energético é dispendioso para o organismo que a realiza, sendo que a reação pode ocorrer à temperatura ambiente e pressão atmosférica adequada. (REIS et al., 2006).



(onde e⁻ simboliza elétron e Pi simboliza o fosfato inorgânico).

O processo industrial converte cerca de 80 X 10¹² g.ano⁻¹ de nitrogênio molecular em amônia, enquanto, que a fixação por processos naturais converte cerca de 190 X 10¹² g.ano⁻¹. Deste total fixado por processos naturais, os relâmpagos são responsáveis por cerca de 8%, as reações fotoquímicas, entre óxido nítrico gasoso (NO) e o ozônio (O₃), produzindo o ácido nítrico (HNO₃), por cerca de 2% e a fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias ou algas azuis responsáveis por aproximadamente 90%, daí a importância em se estudar a FBN em plantas fixadoras e não fixadoras.

2.3 - Organismos Fixadores de Nitrogênio

Organismos procariontes, que possuem a enzima nitrogenase, são capazes de fixar o N₂ através de um processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN). Esses organismos podem ser de vida livre (**Tabela 1**) ou viver em associações. Dentre as bactérias autotróficas e heterotróficas, destacam-se as cianobactérias (*Gloeotheca*, *Oscillatoria*, *Plectonema*, *Anabaena*, *Nostoc*), que realizam a fotossíntese de maneira semelhante aos vegetais superiores, havendo a liberação de O₂, e a *Klebsiella pneumoniae*, na qual foram identificados e estudados os primeiros genes *nif*.

Tabela 1: Exemplos de organismos de vida livre fixadores de nitrogênio.

Bactérias Autotróficas
- <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
- <i>Rhodospirillum rubrum</i>
- <i>Gloeotheca</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Plectonema</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i>
Bactérias Heterotróficas
- <i>Clostridium pasteurianum</i>
- <i>Klebsiella pneumoniae</i>
- <i>Azotobacter vinelandii</i>

Fonte: adaptado de SMITH & GALLON (1993).

Já para as bactérias que formam associações com leguminosas, como os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, a estimativa da FBN está em torno de 100 % do N requerido pela planta. Para as bactérias associadas às gramíneas, como os gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, a resposta a FBN está em torno de 30 % do N requerido pela cultura dependendo das variedades utilizadas (FERREIRA et al., 2003).

2.4 - A Fixação Biológica de N₂ em Gramíneas

O crescente interesse no estudo da FBN na agricultura, visa minimizar o uso de fertilizantes minerais nitrogenados na produção agrícola. A utilização de adubos nitrogenados está ligada a grandes desvantagens, sendo as principais delas o alto custo dos adubos, uma vez

que para se produzir industrialmente um quilograma de fertilizante nitrogenado, se gasta seis vezes mais energia que aquela necessária para produzir um quilograma de fósforo ou de potássio (DA SILVA et al., 1978), e problemas ambientais, como a contaminação do lençol freático por excesso na aplicação de N na forma de nitrato, principalmente para países em desenvolvimento, onde a agricultura econômica requer minimização dos investimentos para permanecer economicamente viável.

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 a 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. Devido à sensibilidade da enzima nitrogenase ao oxigênio, o possível nicho deve apresentar uma baixa concentração de O_2 .

Estas bactérias diazotróficas e endofíticas apresentam grande potencial para utilização na agricultura dado a habilidade de colonizar o interior das plantas e de se localizar em nichos protegidos do oxigênio, e assim, o potencial da enzima nitrogenase, para fixar nitrogênio pode ser mantido no nível máximo (BALDANI & DÖBEREINER, 1995). Muitas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio são conhecidas e têm sido isoladas de plantas cultivadas, como por exemplo arroz, milho, cana-de-açúcar e sorgo (REIS et al. 1994; OLIVARES et al. 1996; REIS JR. et al. 2000).

No caso de arroz, diversas bactérias foram isoladas em associação com a planta, como por exemplo os gêneros *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Pseudomonas* e recentemente o gênero *Sphingomonas* (BALDANI, 1984 e 1996, SAMPAIO, 2004). Dentre as espécies representativas destes gêneros podemos citar a *B. brasilensis*, isolada de cana-de-açúcar, batata doce, mandioca e principalmente arroz (BALDANI, 1996), *H. seropedicae* isolada de arroz, milho, trigo e sorgo (BALDANI et al., 1986) e a espécie *A. brasilense* isolada de milho, trigo, arroz e sorgo (BALDANI, 1984, BALDANI et al., 1997).

Efeitos positivos da inoculação destas bactérias diazotróficas têm sido observados por diversos autores. Em experimentos de inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* em solo não estéril, conduzido em condições de casa de vegetação, observou-se que este endófito pode ser introduzido no interior da planta de arroz e sorgo, pela aplicação do inoculante nas sementes antes da germinação (OLIVARES et al., 1993). Estudos de microscopia ótica e eletrônica têm mostrado que os endófitos, *H. seropedicae* e "*B. brasilensis*" são capazes de infectar e colonizar o tecido de plantas de arroz (BALDANI, 1996).

O potencial de utilização dessas bactérias é grande, já que experimentos de inoculação, conduzidos em casa de vegetação, com estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* mostraram que 17 a 19% do N acumulado foi derivado da FBN enquanto que este aumento foi de 11 a 20% com "*Burkholderia brasilensis*" (BALDANI, et al., 2000). No campo, dependendo da variedade de arroz utilizada, o incremento na produção de grãos pode chegar a 62%, quando inoculada com uma estirpe selecionada (GUIMARÃES et al., 1998).

A inoculação da variedade de arroz IR42, crescidas no campo, com as estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE 94) e *Burkholderia brasilensis* (BR11430) promoveu aumentos na produção de grãos de 38% e 16%, respectivamente em relação ao controle não inoculado (FERREIRA et al., 2003). Estas mesmas estirpes também proporcionaram aumentos de até 18% na produção de grãos da variedade IAC4440 em relação ao controle não inoculado.

Estudos de inoculação em trigo com a estirpe JA04 de *A. brasilense* acrescido da adubação com 15 kg N.ha⁻¹ demonstraram um aumento no N-total e produção de grãos, resultados estes, similares ao tratamento que recebeu 60 kg N.ha⁻¹ (DIDONET et al., 1996).

A inoculação com as estirpes Sp 245 (*A. brasilense*) e Sp 59b (*A. lipoferum*) promoveu aumento no crescimento da parte aérea, raiz e ramificações radiculares de plantas de arroz (linhagens promissoras de terras altas) em condições de laboratório. As maiores respostas, tanto no comprimento da parte aérea, quanto da raiz, foram obtidas quando se utilizou *Azospirillum brasilense* Sp245 como inoculante (DIDONET et al., 2003).

Experimentos conduzidos em casa de vegetação com trigo, cevada e aveia, inoculados com *Azospirillum* sp. estirpe RAM-7, mostraram que a inoculação aumentou a produtividade, porém, estas respostas variam entre as culturas avaliadas. Para o trigo, os aumentos significativos foram obtidos quando a inoculação foi associada a 100% do nitrogênio recomendado, já no tratamento que recebeu somente inoculação este aumento foi de 7,4%, embora não significativo. Na cevada, a presença do inoculante foi capaz de suprir 20% da adubação recomendada de nitrogênio. Para a aveia, a inoculação com *Azospirillum* sp. RAM-7 não proporcionou aumento significativo na produtividade. Em relação ao teor de nitrogênio total dos grãos, para as três culturas, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos avaliados (DALLA SANTA et al., 2004a).

Em ensaios de inoculação de sementes de café (*Coffea arabica*), cv. Catuaí vermelho IAC 144, observou-se que as mudas inoculadas com *A. brasilense*, estirpe Cd, apresentavam valores significativamente maiores de altura, peso de matéria seca de folhas, de caule + ramos e de raízes, quando comparadas às mudas não inoculadas (RICCI et al., 2003).

Já na cultura do milho, experimentos com o inoculante “Graminante” a base de *Azospirillum* spp., os tratamentos com inoculação e aplicação de adubação nitrogenada obtiveram produção de 6404 kg ha⁻¹, no tratamento sem inoculação, a produção foi de 5500 kg.ha⁻¹ (CAVALLET et al., 2000). Estes autores concluíram que dependendo da disponibilidade de nitrogênio a inoculação das sementes aumentou a produção em 30%.

Resultados semelhantes foram encontrados por DALLA SANTA et al. (2004b) em experimentos de inoculação em milho em condições de campo, por dois anos consecutivos, com *Azospirillum* sp estirpes RAM-7 e RAM-5. Esses autores observaram que com o uso dessas estirpes foi capaz de reduzir em 40% a quantidade de fertilização nitrogenada recomendada em cada experimento.

Apesar destes efeitos positivos relatados e do Brasil ser um país referência em FBN em plantas leguminosas e não leguminosas, além de ter aparatos tecnológicos e mão-de-obra qualificada, ainda não existe no mercado um inoculante comercial para gramíneas.

2.5 - Reinoculação de Bactérias Diazotróficas

No Brasil são poucos os resultados sobre o efeito da reinoculação de diversas culturas. Por exemplo, mesmo no caso da soja, os efeitos da reinoculação ainda são bastante controversos.

No caso da soja, sobre condições de uma população nativa muito eficiente, foram observadas respostas a reinoculação em solos do cerrado (VARGAS et al., 1992). No estado do

Paraná foram verificados incrementos de 10 % na produtividade, além de que a manutenção dos teores de N no solo beneficiaram a nutrição da cultura seguinte (NISHI et al., 1996).

Incrementos significativos na produção de grãos foram observados na cultura de feijão, em solos do cerrado, no segundo ano de cultivo, utilizando sementes reinoculadas (HUNGRIA et al., 2000). Entretanto, Campos (1999), trabalhando com soja em plantio direto, observou que não houve efeito da reinoculação nos experimentos conduzidos cinco anos após a primeira inoculação. Segundo o autor, a falta de reposta à reinoculação deve-se ao estabelecimento da população de rizóbio no solo. Resultados semelhantes foram encontrados por CAMPOS & GNATTA (2006) trabalhando com a reinoculação de diferentes formulações de inoculantes comerciais em soja cultivada por plantio direto de 8 a 12 anos. Estes autores também não observaram respostas a reinoculação em três safras consecutivas nos parâmetros estudados

Resultados obtidos nos Estados Unidos demonstraram que populações de rizóbio com 20 a 50 células/g de solo eliminam a resposta à inoculação, desde que essas bactérias sejam eficientes (THIES et al., 1991), nessas condições, mesmo quando inoculantes eficientes são utilizados, muitas vezes é difícil detectar resposta à inoculação.

Deste modo, é importante a avaliação do efeito da reinoculação de bactérias diazotróficas que se mostraram eficientes em promover a FBN em culturas como o arroz, além de que a RELARE (Rede de Laboratórios para a Recomendação de Estirpes) determina no de recomendação de estirpes a serem utilizadas em inoculantes comerciais, que as mesmas sejam testadas em ciclos consecutivos da cultura.

2.6 - Produção e Preparo de Inoculantes

O inoculante é o conjunto formado por um veículo de inoculação contendo um ou mais microrganismos. Este veículo deve ser capaz de manter um maior número de células viáveis por um determinado tempo de armazenamento (lei n.º 86955 de 18 de fevereiro de 1982), além de facilitar a colonização das plantas após a inoculação das sementes. Além disto, devem desempenhar as funções previstas como por exemplo, fixar nitrogênio atmosférico ou atuar como bactérias promotoras de crescimento.

Os inoculantes mais comuns no mercado são: inoculante líquido que utiliza como veículo de inoculação os meios líquidos que contenham um grande número de células, que possam sobreviver por um longo período, regule a pressão osmótica e proteja a integridade da membrana celular (RONCHI & BALATTI, 1996); e o inoculante turfoso: que utiliza como veículo de inoculação a turfa em pó ou granulada, sendo mais comum a turfa em pó, que apresenta um alto teor de matéria orgânica, podendo preservar um elevado número de células por um longo período.

A Argentina lançou um produto denominado Graminante™, produzido pela Empresa Laboratórios Alquimia S.A., a base de pó de carbonato de cálcio, contendo uma mistura de estirpes de *Azospirillum* spp., para ser utilizado principalmente na cultura do milho. Os fabricantes asseguram que este produto pode aumentar a produção de grãos em cerca de 20%. Entretanto, nenhum desses inoculantes introduzidos no mercado mundial apresentaram comprovada eficiência quando testados no Brasil. (CAMPOS et al., 1999 e 2000)

Outros inoculantes comerciais contendo *A. brasilense* também foram lançados no mercado mundial. No Estados Unidos foi desenvolvido um produto com o nome de Azo-Green™. Na Itália, Alemanha e Bélgica foi desenvolvido um produto contendo uma mistura de *A. brasilense* (estirpe Cd) e *A. lipoferum* (estirpe Br17), o nome comercial do produto é Zea-Nit™. Na França foi lançado outro produto a base de *Azospirillum* contendo a estirpe CRT1; este produto utilizado em experimento com milho, no nordeste de Togo, na África, promoveu o aumento de 100% na produção de grãos (FAGES & MULARD, 1988). No México foi desenvolvido um fertilizante para milho denominado “Fertilizante para Milho”,

que tem sido usado com sucesso visto a sua aplicação em 5.000 ha no ano de 1993 (OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

A qualidade do inoculante está condicionada ao tipo de veículo, umidade, aeração e pelas condições ambientais a que este é submetido até a sua utilização (ARAÚJO, 1993). As condições ambientais influenciam diretamente a sobrevivência do microrganismo usado, o que pode ser explicado pelas variações observadas no número de bactérias. A precipitação pluviométrica é um desses fatores que interferem na população, pois em épocas de baixa precipitação o número de bactérias encontradas foi menor que em condição de alta precipitação (REIS JR et al., 2000).

A qualidade do inoculante também pode ser avaliada através da determinação do número de células viáveis e pelo teor de elementos tóxicos como por exemplo cloro e sódio, presentes nos veículos turfosos utilizados.

No Brasil, por lei regulamentada, n.º 86955 de 18 de fevereiro de 1982, foi oficializado o controle de qualidade dos inoculantes comerciais, indicando especificações, garantias e tolerâncias para os inoculantes produzidos. Para os inoculantes que contenham microrganismos fixadores de nitrogênio, estes deverão apresentar concentração mínima de $10^7/10^8$ células viáveis por grama do produto no momento do uso, entretanto, a RELARE (2004), alterou este número para 10^9 células por grama do produto. Além disso, o veículo utilizado para produção do inoculante pode também afetar a sobrevivência das bactérias diazotróficas após a inoculação das sementes (KREMER & PETERSON, 1982).

Estudos de sobrevivência de estirpes ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* e M130 de *Burkholderia brasilensis* inoculadas em turfa nacional e armazenadas em geladeira apresentaram uma população em torno de 10^8 células . g⁻¹ de inoculante em até 110 dias de armazenamento (FERREIRA et al., 2003).

No Brasil, o uso desses biofertilizantes teve início na década de 50 e somente no ano de 1956 se instalou no país a primeira indústria brasileira de inoculantes. A produção brasileira de biofertilizantes é de cerca de 20 milhões de doses/ano, entre os inoculantes do tipo líquido e turfoso. Apesar desta produção é necessária a importação de mais 13 milhões de doses para atender a demanda interna, o que torna o Brasil um mercado interessante para as multinacionais do ramo. Do total de doses de inoculantes produzidos para atender a demanda brasileira cerca de 98,83 % são consumidas na cultura da soja e 1,12% no feijão (<http://www.agrolink.com.br/noticias/Noticialista.aspx>).

Embora o país seja referência mundial em fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas não leguminosas como por exemplo o arroz, trigo, milho e cana-de-açúcar e ser o responsável pela identificação de diversas bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Glucanacetobacter*, *Burkholderia*, ainda não existe no mercado nacional um biofertilizante comercial destinado a estas culturas em contraste aos países como Argentina, México e EUA que já comercializam produtos com essas bactérias.

Uma das razões pela inexistência de produto no mercado brasileiro deve-se a baixa reproduzibilidade na resposta das plantas à inoculação em contraste ao observado para a cultura da soja. Entretanto, destaca-se lembrar que diversos autores observaram uma economia de até 50 kg de N. ha⁻¹, em algumas plantas não leguminosas (BALDANI et al., 2000; FERREIRA et al., 2003; FERREIRA, 2004; GUIMARÃES et al., 2007). Se considerarmos a área plantada com as quatro culturas citadas acima (arroz, trigo, milho e cana-de-açúcar), pode-se projetar que a diminuição com a aplicação de N no Brasil seria em torno de bilhões de reais ao ano. Além de benefícios indiretos como a geração de empregos na indústria de inoculantes e na agricultura, ainda ter-se-ia os benefícios diretos ao meio ambiente. Portanto, o uso de bactérias diazotróficas como biofertilizantes é uma estratégia viável e deve ser adotada tanto em culturas de plantas leguminosas como em não leguminosas.

2.7 - Fatores que Afetam a Sobrevivência de Microrganismos Diazotróficos

Diversos fatores podem afetar a sobrevivência e o efeito dessas bactérias sobre as plantas após a inoculação das sementes e plantio. Dentre esses fatores pode-se citar o veículo de inoculação, que está diretamente relacionado à manutenção da umidade e o pH (RELARE, 2004).

A produção em larga escala de inoculantes geralmente se baseia em duas etapas: o crescimento de microrganismo em cultura líquida e o seu uso para impregnação da turfa. A cultura é multiplicada em grande quantidade de meio líquido que contenha um alto número de células/ml. O sucesso deste método depende da adição de um número suficiente de microrganismos para estabelecer uma grande população inicial e uso de turfas e condições de armazenamento que permita a multiplicação, e mantenha a viabilidade. Outro fator constitutivo de sucesso do método depende da esterilização e da exclusão subsequente de contaminantes.

Dentre os principais fatores que afetam a sobrevivência da bactéria na turfa, estão a temperatura de armazenamento, entre 4° e 26° C, que afeta a taxa de crescimento mas não a sobrevivência do microrganismo, principalmente do rizóbio, desde que a umidade não seja limitante (ROUGHLEY, 1968).

Teores de umidade entre 30% e 40% restringiram o número de células das estirpes de rizóbio SU47 e CB756, e valores de 30% de umidade restringiram o número de células da estirpe de rizóbio TA1 após uma semana. Teores de umidade de até 60% favoreceram a sobrevivência das estirpes SU47, CB756 e TA1 até 12 semanas (ROUGHLEY, 1968).

Pode ocorrer perda de água no inoculante, devido à permeabilidade dos sacos de polietileno usados como embalagem. FENG et al., 2002 observaram que o teor de umidade da turfa decresceu de 52%, na fase inicial, para 49% após 85 dias a 30° C, o que foi atribuída às trocas gasosas dos sacos de polietileno usados como embalagem. Os sacos de polietileno usados devem ser capazes de permitir a troca de gases e reter umidade satisfatória para a sobrevivência dos microrganismos. FENG et al., 2002 em trabalho com rizóbio verificaram que a limitação de nutrientes e a baixa concentração de O₂ na turfa, são alguns dos fatores responsáveis na indução de mudança na morfologia destas bactérias.

Elementos como Na⁺ e Cl⁻ podem afetar a sobrevivência de rizóbios na turfa, dependendo da concentração e da fonte do elemento. Estudos feitos com a interação desses elementos com culturas de *Rhizobium trifolli* estirpe TA1, e *Rhizobium meliloti* estirpe SU47 mostraram que, quando o sódio foi adicionado na forma de Na₂ HPO₄, a taxa de crescimento do rizóbio foi afetada em cultura rica. Entretanto, esse crescimento, na turfa, com a mesma fonte, não foi afetado. Já a adição de CaCl₂.H₂O foi mais tóxica que a de NaCl na turfa e em meio de cultura rico (STEIBORN et al., 1975).

2.8 – Importância da Técnica de DGGE no Estudo da Diversidade de Bactérias Diazotróficas

Bactérias diazotróficas têm a habilidade de colonizar o espaço inter celular das plantas de arroz, acessando o seu interior através de fissuras provocadas pela emissão de raízes laterais, injúrias mecânicas e por estômatos (SILVA, 2001).

A contribuição destas bactérias não está limitada a FBN, já que trabalhos na literatura demonstram a capacidade de produção de hormônios vegetais, como auxinas, citocininas e giberelinas (MELO, 1998), além de contribuir para a defesa física da planta contra agentes patogênicos, ocupando espaços dentro da planta que poderiam vir a ser nichos para estes patógenos vegetais.

Embora diversas bactérias diazotróficas tenham sido isoladas de arroz, milho, cana de açúcar e sorgo (como os gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Sphingomonas*), as técnicas de cultivo em meio de cultura, tradicionalmente utilizadas, no isolamento destas bactérias não são eficientes, já que apenas 10 % da população total destas bactérias pode ser cultivada (COWAN, 2000). Isto significa, que um grande número de bactérias, com grande potencial de utilização na agricultura, pode ainda não ter sido isolada. Além disso, algumas estirpes poderiam se encontrar em estado não cultivável no ambiente sendo então excluídas das análises (ROSADO, 2000).

O uso de técnicas de biologia molecular, baseadas no uso da região 16S RNA, para o isolamento e a caracterização da diversidade de bactérias diazotróficas tem permitido um grande avanço nesta área. KUKLINSKY-SOBRAL et al. (2005) trabalhando com a diversidade de bactérias, através da técnica de DGGE e cultivo em meio de cultura, presentes no interior de tecidos de plantas de soja, cultivadas com e sem a aplicação de glifosato, verificaram diferenças nos gêneros isolados pelas duas técnicas. O que pode ser explicado em função das fontes de nutrientes utilizados pelo meio de cultura, e pelo fato de que na técnica de DGGE pode-se utilizar o DNA total extraído diretamente das plantas, não beneficiando grupos específicos de microrganismos.

Através do uso da técnica de DGGE é possível analisar a diversidade de grupos funcionais, ou seja, de organismos que estão envolvidos em determinados processos, como por exemplo, microrganismos fixadores de nitrogênio. Para isso é necessário o uso de iniciadores baseados em genes responsáveis pelo processo de FBN.

O DGGE é uma técnica de eletroforese que utiliza géis de poliacrilamida com gradiente desnaturante. O uso de gradientes desnaturantes permite a separação de fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas com seqüências de bases nucleotídicas diferentes. Entretanto, na utilização desta técnica é necessário o uso de iniciadores que possuam uma seqüência de nucleotídeos rica em G+C (grampo G-C), cujo objetivo é impedir a desnaturação total da dupla fita do DNA na eletroforese (MUYZER et al., 1993). Os fragmentos amplificados separam-se de acordo com a sua composição nucleotídica durante a eletroforese, portanto, as duplas fitas de DNA que contenham mais GC exigem uma concentração de desnaturante maior para que ocorra a sua desnaturação. Após a desnaturação total a velocidade de migração do DNA no gel é extremamente reduzida e ocorre a separação dos outros fragmentos que apresentam composição nucleotídica diferente (MUYZER & SMALLA 1998).

A vantagem da técnica de DGGE está no fato de normalmente serem utilizados os genes ribossomais (16S em bactérias e 18S para fungos) como DNA alvo, para os quais existem amplos bancos de dados disponíveis, o que possibilita a análise de homologia dos fragmentos isolados (MUYZER & SMALLA 1998). Além do uso destes iniciadores, pode-se utilizar iniciadores específicos, com o gene *nif H*, capazes de caracterizar um determinado gênero ou grupo microbiano. O uso desses iniciadores permite que microrganismos com populações reduzidas possam ser avaliados com maior sensibilidade em relação à população microbiana total. As principais desvantagens são a demandada para a otimização das condições do gradiente no gel, o uso de fragmentos de apenas 500 pb que limita as informações da seqüência, além da necessidade de utilização do grampo de GC (RANJARD et al., 2000).

Esta técnica tem sido utilizada em diferentes estudos de diversidade microbiana como, por exemplo, efeito dos herbicidas sobre a biomassa microbiana do solo (ZILLI, 2004), impacto de metais pesados sobre a diversidade de rizobactérias (DELL'AMICO et al., 2005), efeito de práticas agrícolas sobre a comunidade microbiana do solo (WAKELIN et al., 2007), efeito de pesticidas (EL FANTROUSSI et al., 1999), resíduos de petróleo (DUARTE et al., 2001), e o cultivo de plantas geneticamente modificadas (HEUER et al., 2002).

A demanda para a utilização de bactérias diazotróficas, em diferentes culturas não leguminosas, cresceu muito nos últimos anos, e desse modo, o conhecimento de bactérias diazotróficas eficientes e capazes de colonizar culturas de importância econômica, como o arroz, que é altamente dependente de nitrogênio de fertilizantes minerais, é um grande desafio para a sustentabilidade dessas culturas.

O uso de técnicas de biologia molecular no estudo da diversidade de bactérias diazotróficas é importante para caracterizar e identificar gêneros, espécies ou até mesmo estirpes que tenham potencial de utilização na agricultura, para o suprimento de nitrogênio, produção de hormônios e supressão de patógenos, além de dar uma contribuição importante do efeito da inoculação sobre a comunidade de bactérias presentes nas plantas.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Métodos Gerais Utilizados nos Experimentos

3.1.1- Caracterização do material murfoso utilizado e condições de multiplicação da bactéria.

A análise química do veículo turfoso utilizado mostrou que o substrato apresenta as seguintes características: pH em H₂O de 3,4, teor de Al 8,5 (cmol_c/dm³), Ca 7,1 (cmol_c/dm³), Mg 6,9 (cmol_c/dm³), P 22 (mg/dm³), K 47 (mg/dm³) e Matéria Orgânica (MO) de 72 (g . kg⁻¹).

A estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* ZAE 94 (depositada na coleção de culturas de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia com o código BR 11417) previamente selecionada por BALDANI (1996), foi multiplicada em tubos de ensaio contendo meio Dygs, por 24 horas a 30° C sob agitação a 100 rpm, em seguida riscada em placas com meio semi-específico, NFb 3x (DOBEREINER et al., 1995), para verificar a pureza da cultura crescida. Após a verificação da pureza, a estirpe foi multiplicada em meio Dygs e o número de células viáveis foi determinado pelo método do Número Mais Provável (NMP) no meio JNFb (DOBEREINER et al., 1995), e utilizada no preparo dos inoculantes. O número foi de 1,4 x 10⁹ células viáveis/mL

3.1.2- Preparo da turfa com diferentes pH

Para avaliar a sobrevivência das bactérias em diferentes pH, a turfa foi neutralizada até atingir os pH 6,0 e 7,0. Para a neutralização foram adicionados doses crescentes de CaCO₃ nas amostras das turfas, e colocada para incubar por até 15 dias segundo metodologia utilizada por FERREIRA (2004). A determinação do pH em água foi feita durante todo o período para verificar se houve variação do mesmo. Após a etapa de neutralização e esterilização (autoclave), os sacos contendo as turfas foram utilizados no preparo dos inoculantes. Para avaliação da sobrevivência nos dois pH, foi utilizada a umidade inicial de 42 % em base seca, que é o mesmo utilizado nos inoculantes rizobianos preparados com o veículo turfoso empregado nos ensaios desta tese.

3.1.3- Preparo dos inoculantes com diferentes teores de umidade

Os inoculantes foram preparados até atingir as umidades de 20, 42, 60 e 80%. Para isso, adicionou-se a mesma quantidade de cultura utilizada no teor de umidade de 42% em todos os demais tratamentos. Para os tratamentos com teores de umidade de 60 e 80%, o volume de cultura foi completado com água destilada estéril, para atingir a umidade desejada. Para a umidade de 20%, o volume de cultura foi centrifugado a 6000 x g e o pelete ressuspensionado no volume desejado.

Os teores de umidade utilizados (U) foram determinados por diferença entre a massa da amostra úmida (MAU) e a massa da amostra seca (MAS):

$$U (\%) = (MAU - MAS) * 100 / MAS.$$

A suspensão bacteriana contendo $1,4 \times 10^9$ células/mL foi inoculada com auxílio de uma seringa esterilizada, em sacos de polipropileno contendo turfa (previamente seca, moída, esterilizada e pH ajustado), até atingir a umidade inicial desejada. Após a inoculação, a turfa contendo as bactérias foi mantida por 24 horas a 30°C e em seguida armazenada em geladeira a 4 °C.

3.1.4- Sobrevivência das bactérias nas turfas

Avaliação da sobrevivência das bactérias foi feita pelo método do NMP, utilizando o meio semi-seletivo, JNFb para a estirpe ZAE 94. Inicialmente as contagens foram feitas aos 1, 15 e 30 dias, e subseqüentemente a cada 30 dias. Os inoculantes foram armazenados em geladeira por até 180 dias. Foram utilizados três repetições dos inoculantes preparados para cada tratamento. Após a determinação do NMP de bactérias presentes as amostras foram descartadas.

3.1.5- Caracterização das embalagens utilizadas

As embalagens polipropileno utilizadas nos ensaios de sobrevivência apresentavam as seguintes especificações:

- Embalagem 1: Mais porosa e com as dimensões (200mm de comprimento, 120mm de largura e 0,05mm de espessura);
- Embalagem 2: Menos porosa e com as dimensões (200mm de comprimento, 120mm de largura e 0,08mm).

3.2- Inoculação da Estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* em Vasos

Foram utilizados os primeiros 20 cm do horizonte A de um Planossolo Série Ecologia, oriundo do Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia. Não foi ajustado o pH, pois este solo já havia sido submetida à calagem anterior à coleta. A partir da análise química do solo (Tabela 2), foram feitas adubações, com 20 kg de P₂O₅ e 50 kg de K₂O de acordo com o Manual de Adubação e Calagem para o Rio de Janeiro para a cultura de arroz (ALMEIDA et al., 1988). Como fonte de micronutrientes foi aplicado FTE na quantidade de 0,3 g . kg⁻¹ de solo.

Tabela 2: Análise química de amostras de terra utilizada no plantio das variedades de arroz no experimento de vasos.

	pH em água	Al	Ca	Mg	P	K
		(cmol _c /dm ³)			(mg/dm ³)	
Solo	5,8	0,0	1,3	0,7	6	27

3.2.1- Sementes

Foram utilizadas sementes das variedades de arroz contrastantes quanto ao potencial de fixação. IR42 (Alta contribuição para FBN) (OLIVEIRA et al. 1994; KUNDU & LADHA, 1995; WU et al., 1995) e IAC4440 (baixa contribuição para FBN) (OLIVEIRA, 1994) cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão e multiplicadas no Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia em Seropédica, RJ, na safra de 2004/2005.

3.2.2- Plantio, tratamentos e delineamento experimental

O plantio foi feito com as sementes das variedades IR42 e IAC4440, peletizadas com o inoculante turfoso (concentração de 250g de inoculante . 20kg⁻¹ de semente (FERREIRA, 2004) preparado com teor de umidade de 42% e pH 7,0, em vasos com capacidade para 6 kg, contendo 4 kg de solo não estéril. O plantio foi feito com 6 sementes por vaso, sendo feito desbaste, entre 20 e 30 dias após plantio (DAP), deixando 4 plantas/vaso. Os vasos foram inundados, quando as plântulas atingiram em média 15 cm de altura, e a lâmina d'água de 2 cm foi mantida sempre na mesma altura durante a realização do experimento.

O experimento foi conduzido ao ar livre com delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, em arranjo fatorial 2 x 2, com e sem inoculação da estirpe ZAE 94, e com e sem aplicação da dose de 50kg de N . ha⁻¹, totalizando 4 tratamentos. A separação das médias foi feita utilizando o teste estatístico LSD a 5% de probabilidade no programa Sisvar (FERREIRA, 2000).

As coletas foram feitas durante o período vegetativo (60 DAP), onde foi analisado o acúmulo de massa seca da parte aérea e o NMP da população de bactérias presentes na parte aérea e raiz das plantas de arroz e ao final do ciclo da cultura foi avaliado a produção de grãos.

3.3- Inoculação e Reinoculação da Estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* em Condições de Campo.

As variedades de arroz IR42 e IAC4440 foram plantadas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia, em um Argissolo Vermelho Amarelo. Após a análise química do solo (Tabela 3), foi feita a adubação e calagem, segundo recomendações do Manual de Adubação e Calagem para o Rio de Janeiro para a cultura de arroz (ALMEIDA et al., 1988). Como fonte de micronutrientes foi aplicado FTE na quantidade de 14 kg/ ha⁻¹.

Tabela 3: Análise química das amostras de terra do horizonte A do Argissolo Vermelho Amarelo utilizado nos experimentos com a cultura do arroz.

	pH em água	Al	Ca	Mg	P	K
		(cmolc/dm ³)			(mg/dm ³)	
Planossolo	5,0	0,3	2,3	1,5	14	84

3.3.1- Plantio, tratamentos e delineamento experimental do experimento de inoculação (Período de 2005-2006).

O plantio foi feito com sementes inoculadas, em parcelas com seis linhas, espaçadas 30 cm, e na densidade média de 100 sementes por metro linear. As parcelas foram distribuídas em 6 blocos ao acaso. Os tratamentos utilizados foram: a inoculação ou não da estirpe ZAE 94, as variedades de arroz IAC4440 e IR42 e 3 doses de N mineral na forma de sulfato de amônio (20, 50 e 100 Kg de N.ha⁻¹) (Figura 1). As doses de nitrogênio (50 e 100 kg de N . ha⁻¹) foram parceladas com aplicações aos 40 dias após o plantio, no início do florescimento e no enchimento dos grãos.

A separação das médias foi feita utilizando o teste estatístico LSD a 5% de probabilidade além do uso da análise de regressão para descrever a resposta das plantas aos diferentes níveis de adubação e inoculação. Para realização do teste estatístico foi utilizado o programa Sisvar.

Foram realizadas três coletas, no período vegetativo, florescimento e maturação de grãos de arroz. Os parâmetros agrônômicos analisados foram à matéria seca da parte aérea,

%N (TEDESCO, 1983), nitrogênio total da parte aérea e dos grãos, produção de grãos, proteína bruta dos grãos e a contagem do número de bactérias diazotróficas presentes nas diferentes partes da planta. O conteúdo de proteína bruta dos grãos foi calculado pelo N-Kjeldahl multiplicado pelo fator de correção de 5,95. Este fator é baseado no conteúdo de nitrogênio (16,8 %) da proteína do arroz, a glutelina (JULIANO, 1985).

No florescimento também foi feita a análise da diversidade das bactérias diazotróficas através da técnica de DGGE conforme descrita no item 3.3.3. As parcelas foram mantidas sob irrigação constante durante todo o ciclo da cultura.

BLOCO I

S	20	C	C (20)
50	100	C (50)	C (100)

Figura 1: Desenho experimental dos tratamentos do primeiro ano para uma variedade em um bloco. Legenda: S- Sem inoculação, C- com inoculação e 20, 50 e 100 refere-se às doses de Nitrogênio em kg . ha⁻¹.

3.3.2- Plantio, tratamentos e delineamento estatístico do experimento de reinoculação (Período 2006-2007).

No segundo ano, a parte aérea das plantas de arroz remanescentes, do ano anterior, foi retirada e o restante das plantas foi incorporado ao solo. Após a análise química das amostras de terra do horizonte A de um Argissolo Vermelho Amarelo (**Tabela 4**), foi feita a correção de acordo com a necessidade da cultura.

Tabela 4: Análise química das amostras de terra do horizonte A do Argissolo Vermelho Amarelo utilizado nos experimentos com a cultura do arroz.

	pH em água	Al	Ca	Mg	P	K
		(cmol _c /dm ³)			(mg/dm ³)	
Argissolo	5,0	0,2	2,1	1,1	4,7	70,4

O experimento foi conduzido em blocos ao acaso com seis repetições. Os tratamentos consistiram nos mesmos utilizados no ano anterior, mais a reinoculação ou não das parcelas, acrescentado-se dois tratamentos aos do ano anterior, totalizando 10 tratamentos para cada variedade. Alguns tratamentos receberam inoculação no primeiro ano e não no segundo, e o vice-verso (

Figura 2). As variáveis avaliadas foram semelhantes ao experimento anterior. A separação das médias foi feita utilizando o teste estatístico Scott-Knott a 10 % de probabilidade. O uso deste teste neste experimento se justifica devido à facilidade em separar ensaios com números de tratamentos maiores. Para realização do teste foi utilizado o programa Sisvar (FERREIRA, 2000).

BLOCO I

SC	20	100	CC	CC (50)
SS	50	CS	CC (20)	CC (100)

Figura 2: Desenho experimental dos tratamentos do experimento de reinoculação (segundo ano) para uma variedade em um bloco. Legenda: S- Sem inoculação, C- com inoculação, 0, 20, 50 e 100 refere-se doses de N. A primeira e segunda letra, referem-se ao primeiro e segundo ano respectivamente. Exemplo: SC- Primeiro ano sem inoculação (S) e o segundo inoculado (C).

3.3.3- Análise da diversidade de bactérias presentes nas plantas de arroz inoculadas e reinoculadas com a estirpe de *H. seropedicae* (estirpe ZAE 94) em condições de campo.

Anteriormente ao estudo da diversidade de bactérias presentes no colmo de plantas de arroz inoculadas, foi feito o sequenciamento e alinhamento da estirpe ZAE 94, com outras bactérias do gênero *H. seropedicae*. O objetivo desta etapa foi caracterizar e identificar corretamente a bactéria alvo, além de verificar a possibilidade de se obter um iniciador estirpe específico utilizando a região universal do 16S rRNA, de modo a facilitar o monitoramento desta estirpe nas plantas inoculadas em campo. A comparação das seqüências geradas foi feita através do programa BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTn, ALTSCHUL, et al., 1997). O alinhamento das seqüências de DNA foi feita utilizando o programa Clustal_W (THOMPSON et al., 1994), seguida da construção da árvore filogenética, utilizando o algoritmo neighbour-joining no programa MEGA (www.megasoftware.net, KUMAR et al., 2004).

Na análise da diversidade de bactérias das plantas foi utilizado o colmo das plantas de arroz, já que de acordo com BARRAQUIO et al. (1997) este seria o local onde está presente o maior número de bactérias diazotróficas. Para estudar a diversidade de bactérias diazotróficas, presentes nos colmos das plantas de arroz, foi utilizada a técnica de DDGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante) (MYERS et al, 1987).

No estudo da diversidade de bactérias através da técnica de DGGE é necessário utilizar um padrão de bandas de bactérias diazotróficas conhecidas. Este padrão foi inicialmente definido por BOA SORTE et al. (2006). As etapas utilizadas no estudo da diversidade das plantas de arroz inoculadas são descritas a seguir.

a) Extração do DNA total das plantas arroz

Neste procedimento foram utilizadas seis plantas por tratamento. As plantas foram primeiramente lavadas em água corrente e depois em água destilada por duas vezes. Após a lavagem, foram retirados discos de 1 cm de comprimento na base do colmo das plantas. Em seguida este material foi macerado com nitrogênio líquido e foram retiradas três amostras de aproximadamente 200 mg cada. As amostras obtidas foram utilizadas na extração do DNA total segundo a metodologia descrita por DOYLE & DOYLE (1987).

Ao final da extração, as três amostras foram misturadas, obtendo-se então 1 amostra composta por tratamento. O produto obtido da extração de DNA total foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,0 % em TAE 1X, a 100V por 1h, e após corado por 20 segundos em brometo de etídeo, descorado por 30 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado.

b) Amplificação da região 16S rRNA utilizando iniciadores específicos

Cerca de 80 ng do DNA total extraído das plantas de arroz, foi utilizado na amplificação da região de 16S rRNA. Foi utilizado uma desnaturação a 95°C por 3 min, 30 ciclos de 94°C por 20 seg., 53°C por 40 seg. e 72°C por 40 seg. e um a extensão final a 72°C por 7 min. Foram utilizados os iniciadores específicos 799f (CHELIUS & TRIPLETT, 2001) e 1492r (OSBORNE et al., 2005) para avaliar a comunidade microbiana total. A reação continha 5 µl de tampão(10x), 2,5 µl de MgCl(25mM), 1 µl de dNTP(2,5mM), 1 µl de BSA(3mg/mL), 0,5 µl de Taq-polimerase(500U), 0,7 µl do iniciador 799f e 1 µl do iniciador 1492r (25mM), para um volume de 50 µl por reação. O uso destes iniciadores teve como objetivo eliminar a amplificação dos plástidos, mitocôndrias e cloroplastos, obtidos durante o processo de extração do DNA total e que concorrem com o DNA bacteriano na reação de PCR (reação em cadeia da polimerase).

c) Amplificação com iniciadores específicos para DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante) (MUYZER et al., 1996).

O procedimento seguido foi o descrito por MUYZER et al. (1996). Após a primeira reação de PCR do item anterior (b), aproximadamente 5 µl do produto obtido foi submetido à nova reação de PCR, contendo 5 µl de tampão(10x), 3 µl de MgCl(25mM), 4 µl de dNTP(2,5mM), 1 µl de BSA(3mg/mL), 0,6 µl de Taq-polimerase(500U) e 0,5 µl de cada iniciador (25mM), para um volume de 50 µl por reação e os iniciadores 968f e GC-1401r (HEUER & SMALLA, 1997) (**Tabela 5**). Ao final da reação, o material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1%) a 100 V por 1h, para visualização da qualidade do material amplificado. Em seguida o material obtido foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE).

Tabela 5: Iniciadores utilizados nas reações de amplificação para análise por DGGE e respectivas seqüências de nucleotídeos.

Primer	Sequência:
1401r	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG
968f	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG TGGG GAA CGC GAA CCT TAC

d) Montagem do gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante

Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical (BioRad DCode™ System -Universal Mutation Detection System) com placa de 20 X 20 cm, espaçador 1,5 mm. O material utilizado foi previamente lavado, para retirar resíduos de poliacrilamida.

Foram utilizados gradientes de desnaturação variando de 55 a 65 % (BOA SORTE et al. 2006), como desnaturante foi utilizado uréia-formamida (MYERS et al, 1987). As faixas de desnaturação utilizadas, foram obtidas a partir da mistura de duas soluções (menor (45 %) e maior concentração (75 %) de uréia-formamida) com 6% de poliacrilamida para volume

final de 20 ml do gel de corrida. Esta mistura é obtida com o auxílio de uma bomba peristáltica com fluxo aproximado de 0,22 mL/min.

e) Aplicação das amostras

Foi aplicado uma alíquota de 30 µL do produto da amplificação com os iniciadores GC1401r e 968f, misturado com 5 µL de corante de corrida (0,5% azul de bromofenol, 40% sacarose, 0,1 mol/L de EDTA, 5% de SDS) nos poços do gel.

f) Eletroforese em gel de gradiente de desnaturação – DGGE

O produto da amplificação da reação de PCR foi submetido à eletroforese em um gel de poliacrilamida com Gradiente de Desnaturação (DGGE) por 16 horas a 120 volts, utilizando uma cuba vertical contendo tampão TAE 0,5X aquecido a 60° C.

O objetivo é separar moléculas de tamanho similar, mas com seqüências diferentes, utilizando um gradiente com força crescente de desnaturação (formamida e uréia).

g) Coloração e descoloração do gel de poliacrilamida

A coloração do gel de poliacrilamida foi feita com AgNO₃ segundo CRESTE et al. (2001). Em seguida, o gel foi colocado para secar por aproximadamente 24h, e após este período o mesmo foi escaneado e a imagem gerada é utilizada na análise no Programa GelCompar II para obtenção dos dendogramas de similaridade.

h) Análise dos géis obtidos utilizando o programa GelCompar II

Os géis obtidos foram analisados utilizando o programa GelCompar II. A análise de presença/ausência de bandas (índice binário) foi feita através do índice de similaridade (S_j) de Jaccard (MUELLER-DOMBOIS & ELLEMBERG, 1974), considerando que cada banda refere-se a uma espécie diferente, já que a técnica é capaz de separar fragmentos com diferenças de dois pares de base. Após determinadas as similaridades, foram realizadas análises de agrupamento utilizando a média de grupo não ponderada- UPGMA (VALENTIN, 2000) com auxílio do programa GelCompar II. Foram gerados dois dendogramas um para cada experimento de inoculação.

O coeficiente de Jaccard é definido pela Fórmula: $S_j = a/(a+b+c)$, onde S_j: coeficiente Jaccard; a: número de espécies da parcela a; b: número de espécies da parcela b; c: número de espécies comum em ambas parcelas.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Sobrevivência da Bactéria em Turfa com Diferentes pH

No presente trabalho, verificou-se que os níveis de pH utilizados não interferiram na sobrevivência da estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* em substrato turfoso durante o período de armazenamento de 180 dias (**Figura 3**). Estes resultados foram semelhantes aos observados por Dobereiner et al. (1995), estes autores observaram que o pH ideal de crescimento desta estirpe em meio de cultura é de 5,3 a 8,0.

A qualidade do inoculante está condicionada ao tipo de veículo, umidade, aeração e fundamentalmente, pelas condições ambientais a que este é submetido até a sua utilização (ARAÚJO, 1993). Estes fatores podem afetar a sobrevivência e o efeito dessas bactérias sobre as plantas após a inoculação das sementes e plantio. Dentre esses fatores pode-se citar o veículo de inoculação, que está diretamente relacionado à manutenção da umidade e o pH (RELARE, 2004).

Contudo, os resultados mostraram que o número de células viáveis (método NMP), aos 180 dias após o preparo, ficou abaixo do mínimo estabelecido por lei (**Figura 3**), sugerindo que outros fatores, tais como umidade e o tipo de embalagem utilizada podem ter contribuído conforme será discutido a seguir.

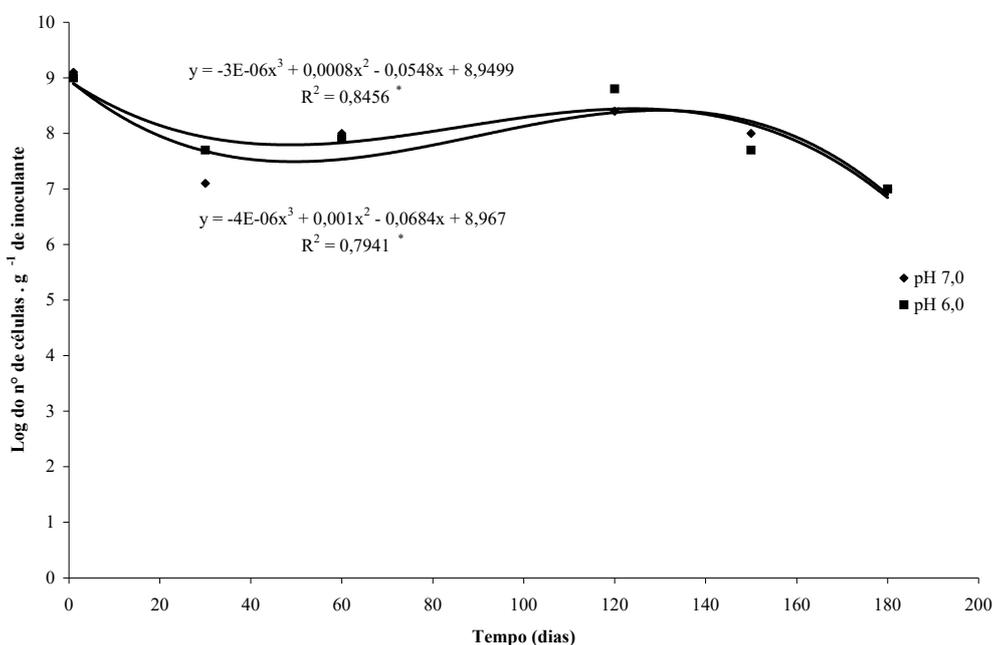


Figura 3: Sobrevivência da estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* em inoculante turfoso preparado utilizando turfa neutralizada com (CaCO₃) à pH 6,0 e 7,0 e teor de umidade de 43 %. Legenda: * significativo a 5 % de probabilidade.

4.2 - Sobrevivência da Bactéria em Inoculante com Diferentes Teores de Umidade e Tipo de Embalagem

Os resultados mostraram que os teores de umidade utilizados no preparo dos inoculantes devem estar entre 43 e 80 % de umidade, já que quando foram utilizados esses teores, o número de células viáveis ficou ao redor de 10^9 células . g⁻¹ de turfa (**Figura 4**). O inoculante preparado com a umidade de 20 % manteve o NMP em torno de 10^7 células viáveis . g⁻¹ de turfa aos 180 dias após o preparo.

Aos 180 dias, foi observado que a faixa de umidade a ser utilizada devem estar entre 43 e 80 %, já que a análise de regressão na (**Figura 5**) demonstrou que valores abaixo de 43 % e acima de 80 % de umidade o número de células viáveis ficou abaixo de 10^9 células . g⁻¹ de inoculante. Sendo assim, o teor de umidade ao redor de 60 % deve ser o mais apropriado para se trabalhar com esta estirpe, já que se posiciona no centro do intervalo de umidade recomendado, o que garantiu com certa segurança a qualidade e a manutenção do número de células viáveis do inoculante durante o período de armazenamento de 180 dias.

Os resultados foram semelhantes aos encontrados por ROUGHLEY (1968), que observou que teores de umidade entre 30% e 40% restringiram o número de células das estirpes de rizóbio SU47 e CB756, e valores de 30% de umidade restringiram o número de células da estirpe de rizóbio TA1 após uma semana. Teores de umidade de até 60% favoreceram a sobrevivência das estirpes SU47, CB756 e TA1 até 12 semanas.

Os dados obtidos nestes ensaios mostraram a importância dos teores de umidade sobre a sobrevivência da bactéria diazotrófica utilizada. Entretanto, a manutenção desta umidade durante o período de armazenamento é diretamente influenciada pelo teor de matéria orgânica da turfa utilizada, que por sua vez está diretamente ligada à capacidade de retenção de umidade. A importância desta variável tem sido observada por diversos autores, como FERREIRA (2004) que trabalhando com inoculantes preparado com turfas de duas origens, Canadá e Brasil com teores de matéria orgânica de 94 % e 72 %, respectivamente, observou, após 180 dias de armazenamento em geladeira, redução nos teores de umidade de 11 e 20 % nas turfas do Canadá e Brasil, respectivamente.

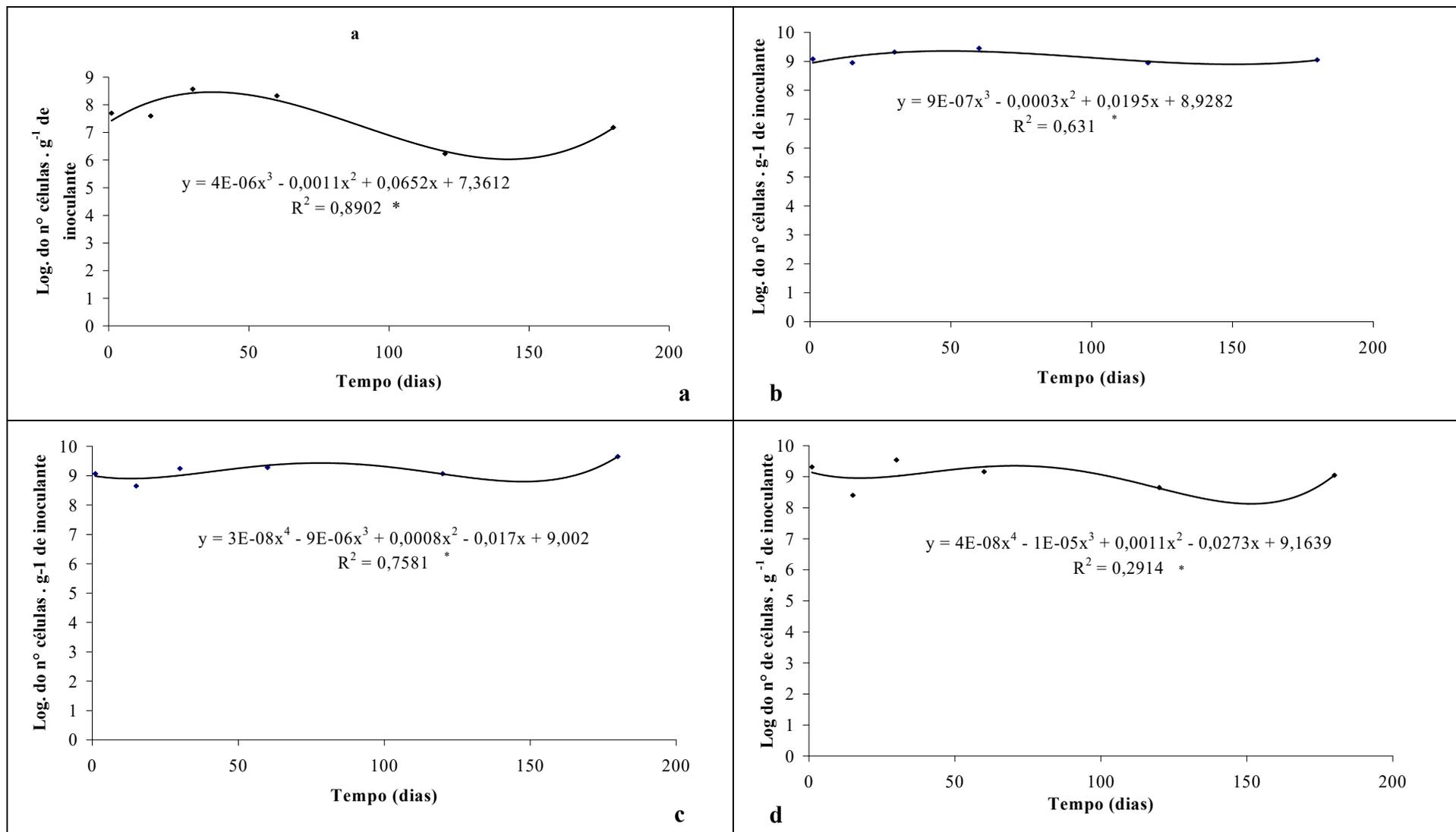


Figura 4: Sobrevivência da estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* em função do tempo nos diferentes teores de umidades (20 (a), 43 (b), 60 (c) e 80 % (d)) utilizados no preparo dos inoculantes. Legenda: * significativo a 5 % de probabilidade.

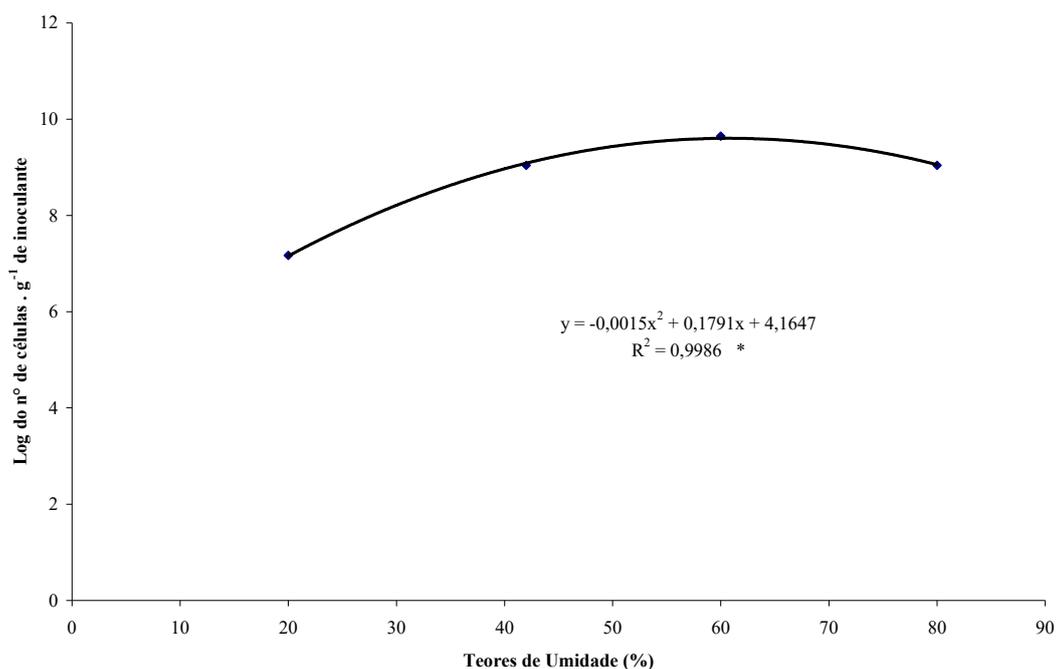


Figura 5: Sobrevivência da estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* em inoculante turfoso preparado com diferentes teores de umidade aos 180 dias de armazenamento em geladeira. Legenda: * significativo a 5 % de probabilidade.

Por outro lado, Lorda et al., 2007 observaram que a adição de goma xantana em inoculante preparados com turfa de alta capacidade de retenção de umidade não afetou a sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Sinorhizobium fredii*. Entretanto, quando utilizada a turfa com baixa capacidade de retenção de umidade foram observadas diferenças.

Uma estratégia importante que pode minimizar a perda de umidade quando se utiliza turfa, com baixa capacidade de retenção de umidade, seria o uso de embalagens menos permeáveis, como observado por FENG et al. (2002). Estes autores observaram que a umidade da turfa decresceu de 52% na fase inicial para 49% após 85 dias a 30° C, quando foram utilizados sacos com baixa permeabilidade às trocas gasosas. Resultados semelhantes a estes foram encontrados neste trabalho, onde o uso de embalagem com baixa permeabilidade à trocas gasosas permitiu uma redução de apenas 3 % no teor de umidade e a manutenção de 10⁹ células viáveis . g⁻¹ de inoculante aos 180 dias de armazenamento em geladeira (**Figura 6**).

Portanto, os resultados dos ensaios da sobrevivência da estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* mostraram que no preparo de inoculantes utilizando turfas, com baixa retenção de umidade, deve ser utilizado sacos com baixa permeabilidade e teores de umidade ao redor de 60 %, para manutenção da população de bactérias em torno de 10⁹ células viáveis . g⁻¹ de inoculante. Estes resultados foram superiores aos encontrados por FERREIRA et al. (2003), que trabalhando com sacos com alta permeabilidade a trocas gasosas e teores de umidade ao redor de 43 % o número de células viáveis ficou em torno de 10⁵ células viáveis . g⁻¹ de inoculante aos 180 dias de armazenamento em geladeira.

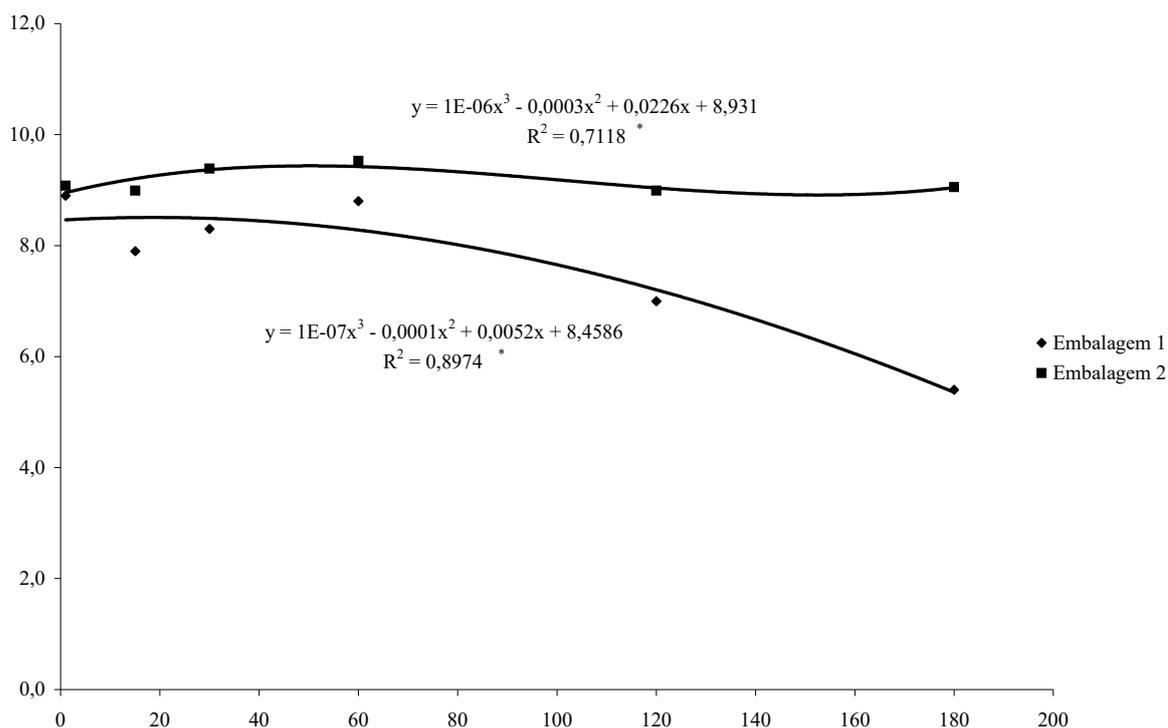


Figura 6: Sobrevivência da estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* em inoculante turfoso armazenados em dois tipos de embalagem: (1) mais porosa (2) menos porosa e mantidos em geladeira por 180 dias. Legenda: * significativo a 5 % de probabilidade.

4.3 - Experimento de Inoculação em Vasos

O número de bactérias diazotróficas presentes na parte aérea e raiz das plantas de arroz, quantificado pelo método do NMP no meio de cultura semi-sólido (JNFb), durante o estágio de desenvolvimento vegetativo, revelou a presença de bactérias diazotróficas em todos os tratamentos inoculados e também não inoculados. Entretanto, não houve variação entre os tratamentos inoculados e não inoculados (Tabela 6). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por BALDANI (1996) e FERREIRA (2004).

Tabela 6: Número de bactérias diazotróficas crescidas no meio de cultivo JNFb, presentes em raiz e parte aérea de arroz inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae*, variedade IAC4440, no estágio de desenvolvimento, vegetativo.

Tratamentos	Variedades	log. do nº de células/g de matéria fresca	
		Parte Aérea	RAIZ
Não Inoculado	IR42	6,0	6,7
	IAC4440	5,7	6,7
Inoculado	IR42	5,9	5,7
	IAC4440	6,4	6,2
Adubado	IR42	6,4	6,7
	IAC4440	6,0	6,0
Inoculado + Adubado	IR42	6,4	6,9
	IAC4440	6,0	6,4

Inoculado (estirpe ZAE94 de *H. seropedicae*); Adubado (Aplicação de 50 kg de N . ha¹)

Os resultados de acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas de arroz, variedades IR42 e IAC4440, mostraram uma interação significativa entre os fatores inoculação e adubação nitrogenada. Pode-se observar um efeito significativo da inoculação quando não é utilizada a adubação nitrogenada, enquanto o efeito desaparece quando é aplicado à dose equivalente a 50 kg de N mineral (**Tabelas 7 e 8**).

Tabela 7: Acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IR42 inoculadas com ou sem a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0 e 50 kg de N . ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio	
	0	50
	g/planta	
Não Inoculado	2,64 b B	3,96 a A
Inoculado	3,87 a A	3,97 a A

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de significância. Médias de 4 repetições. CV: 11,7%.

Tabela 8: Acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IAC4440 inoculadas com ou sem a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0 e 50 kg de N . ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio	
	0	50
	g/planta	
Não Inoculado	2,80 b A	3,10 a A
Inoculado	3,80 a A	3,10 a A

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de significância. Médias de 4 repetições. CV: 14,7%.

Os resultados observados para a produção de grãos das variedades IR42 e IAC 4440, foram semelhantes aos encontrados para o acúmulo de massa seca da parte aérea. A inoculação da bactéria sem a aplicação da adubação nitrogenada proporcionou uma produção de grãos significativamente igual à testemunha adubada e a inoculada e adubado. Estes resultados sugerem que a inoculação da estirpe ZAE 94 pode suprir até 50 kg de N/ha (**Tabelas 9 e 10**).

Resultados semelhantes foram encontrados por FERREIRA (2004), que observou que os tratamentos inoculados foram capazes de suprir até 40 kg de N . ha⁻¹, dependendo da variedade utilizada. DALLA SANTA et al. (2004b) em experimentos com milho em campo, por dois anos consecutivos, utilizando *Azospirillum* sp estirpes RAM-7 e RAM-5, observaram que o uso dessas estirpes foi capaz de reduzir em 40% a quantidade de fertilização nitrogenada recomendada em cada experimento.

Tabela 9: Produção de grãos das plantas de arroz da variedade IR42 inoculadas com ou sem a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0 e 50 kg de N . ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio	
	0	50
	g/planta	
Não Inoculado	7,10 b B	9,30 a A
Inoculado	9,40 a A	9,40 a A
Aumento (%)	32	1

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de significância. Médias de 4 repetições. CV: 14,7%.

Tabela 10: Produção de grãos das plantas de arroz da variedade IAC4440 inoculadas com ou sem a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* e com ou sem fertilizante (0 e 50 kg de N . ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio	
	0	50
	g/planta	
Não Inoculado	6,30 b B	9,40 a A
Inoculado	8,90 a A	9,430 a A
Aumento (%)	41	0

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de significância. Médias de 4 repetições. CV: 9,7%.

4.4 - Experimento de Inoculação de *H. seropedicae* (estirpe ZAE 94) em Condições de Campo.

O número de bactérias diazotróficas presentes na parte aérea e raiz das plantas de arroz, variedades IR42 e IAC4440, não variou com os estádios de desenvolvimento vegetativo e florescimento (**Tabela 11**). As diferenças observadas nas populações de bactérias diazotróficas, na parte aérea, são normalmente observadas na fase de enchimento dos grãos onde há maior translocação de nutrientes para os grãos diminuindo a quantidade disponível para estas bactérias.

Nas raízes a população de bactérias diazotróficas permaneceu estável independente da fase de desenvolvimento da planta, como encontrado por BARRAQUIO et al. (1997). Estes autores trabalhando com diversas variedades de arroz, observaram que o número de bactérias diazotrófica foi elevado nas raízes, as quais chegaram a até 10⁸ UFC por grama de raiz lavada. BRASIL (2005) observaram em gramíneas forrageiras maior número de bactérias diazotróficas nas raízes dessas plantas do que na parte aérea ou no solo.

Além disso, trabalhos realizados em gramíneas mostraram que a interação entre o genótipo da planta e a adubação nitrogenada influenciou na quantidade de microrganismos

diazotróficos endofíticos, presentes principalmente nas raízes (SALA et al., 2005). Em cana-de-açúcar, por exemplo, ficou evidenciado que doses elevadas de fertilizantes nitrogenados foram responsáveis pela diminuição na população de bactérias diazotróficas como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (REIS JÚNIOR et al., 2000; PERIN et al., 2004).

Neste trabalho não foram observados efeitos da adubação nitrogenada sobre a população de bactérias diazotróficas nas plantas de arroz, independente da parte da planta e variedade utilizada (**Tabela 11**). Entretanto, os resultados encontrados para a variedade IAC4440 diferem dos encontrados por GUIMARÃES (2001). O autor não observou alteração no número de bactérias durante todo o ciclo da cultura. Já RODRIGUES (2003), trabalhando com as variedades IR42 e IAC 4440 em solos do Rio de Janeiro e Goiás, obteve resultados semelhantes aos observados neste trabalho.

Tabela 11: Número de bactérias diazotróficas crescidas no meio de cultivo JNFb, presentes em raiz e parte aérea de arroz, variedades IAC4440 e IR42, inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae*, nos estádios de desenvolvimento vegetativo e florescimento (Primeiro ano).

Tratamentos	Variedades	Estádio Vegetativo		Estádio Florescimento	
		PA	R	PA	R
log. do nº de células/g de matéria fresca					
Não Inoc.	IR42	4,20	5,40	5,65	5,65
	IAC4440	4,65	6,04	4,98	7,04
20 kg N.ha⁻¹	IR42	5,88	6,65	3,85	6,18
	IAC4440	4,98	7,04	4,98	6,15
25 kg N.ha⁻¹	IR42	7,04	6,65	4,6	6,15
	IAC4440	4,65	7,04	4,65	7,04
50 kg N.ha⁻¹	IR42	5,48	6,65	3,95	6,15
	IAC4440	5,18	6,04	4,65	6,15
Inoc.	IR42	5,88	6,65	4,18	6,04
	IAC4440	4,98	7,04	5,98	7,15
Inoc + 20 kg N.ha⁻¹	IR42	5,40	7,15	5,4	6,15
	IAC4440	5,40	6,15	4,6	6,65
Inoc + 25 kg N.ha⁻¹	IR42	4,98	6,15	4,4	6,15
	IAC4440	5,40	6,65	4,6	7,04
Inoc + 50 kg N.ha⁻¹	IR42	4,98	6,15	4,18	6,04
	IAC4440	4,98	7,04	4,98	6,18

Inoc: Tratamentos inoculados com a estirpe ZAE 94, PA= Parte Aérea, R= Raiz.

Os resultados do experimento de inoculação, em campo, demonstraram que não houve diferença significativa no acúmulo de massa seca da parte aérea entre os tratamentos no período vegetativo e florescimento em ambas variedades de arroz utilizadas (**Tabelas 12, 13, 14 e 15**).

Entretanto, os tratamentos de inoculação da estirpe ZAE 94 acrescidos de 20 kg de N . ha⁻¹ apresentaram uma tendência em aumentar a massa seca da parte aérea de arroz em até 28 % em relação à testemunha absoluta. Já em relação à testemunha inoculada e não adubada, este aumento foi da ordem de 8 %, dependendo da variedade e estágio de desenvolvimento das plantas de arroz. Os maiores aumentos foram verificados no estágio vegetativo.

Estes resultados estão semelhantes aos encontrados por BALDANI et al. (2000), FERREIRA (2004) e GUIMARÃES (2006), que observaram aumentos progressivos no acúmulo de massa seca durante o estágio de desenvolvimento das plantas com a inoculação da

estirpe ZAE 94, em inoculante turfoso. A maior resposta à inoculação foi observada na fase de enchimento e maturação dos grãos em comparação aos demais tratamentos de inoculação. OLIVEIRA (1992) também trabalhando com bactérias diazotróficas em quatro variedades de arroz, não observou diferença no acúmulo de massa seca da parte aérea em todas as variedades utilizadas.

Tabela 12: Acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento vegetativo (80 DAP), inoculadas com a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio			
	0	20	25	50
	Kg . ha ⁻¹			
Não Inoculado	7.302,2 aA	7.800,0 aA	7.406,78 aA	8.736,3 aA
Inoculado	8.231,1 aA	8.776,3 aA	7.575,3 aA	7.415,3 aA

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD à 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 11,2 %.

Tabela 13: Acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IAC4440, no estágio de desenvolvimento vegetativo (80 DAP), inoculadas com a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio			
	0	20	25	50
	kg . ha ⁻¹			
Não Inoculado	5.822,2 bA	6.651,1 aA	7.026,7 aA	6.593,3 aA
Inoculado	7.100,0 aA	7.493,3 aA	6.886,7 aA	6.751,1 aA

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD à 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 10,72 %.

Tabela 14: Acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento florescimento, inoculadas com a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio			
	0	20	25	50
	kg . ha ⁻¹			
Não Inoculado	14.450,0 aA	13.968,9 aA	13.957,8 aA	14.140,0 aA
Inoculado	13.670,8 aA	14.823,8 aA	15.975,6 aA	14.075,6 aA

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD à 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 12,85 %.

Tabela 15: Acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IAC4440, no estágio de desenvolvimento florescimento, inoculada com a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio			
	0	20	25	50
	kg . ha ⁻¹			
Não Inoculado	11.073,3 aAB	11.447,4 aA	9.813,3 aB	10.826,7 aAB
Inoculado	10.340,0 aA	10.971,8 aA	9.964,4 aA	11.224,4 aA

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD à 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 7,93 %.

Da mesma forma, os resultados o nitrogênio total da parte aérea no estágio de desenvolvimento vegetativo e florescimento, mostraram comportamento semelhante aos parâmetros de massa seca da parte aérea. Embora não significativos estatisticamente, os tratamentos de inoculação com a estirpe ZAE94 acrescidos de 20 kg de N . ha⁻¹ apresentou uma tendência em aumentar o nitrogênio total da parte aérea de arroz em até 38 % em relação à testemunha absoluta. Já em relação a testemunha inoculada e não adubada, este aumento foi da ordem de 16 %, dependendo da variedade e estágio de desenvolvimento das plantas de arroz (**Tabelas 16, 17, 18 e 19**).

GUIMARÃES (2006) trabalhando com arroz em condições de casa de vegetação, observou aumentos de até 34 % no nitrogênio total da parte aérea, em relação à testemunha absoluta, de plantas de arroz inoculadas com a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* dependendo da cultivar de arroz utilizada. Em experimentos de inoculação conduzidos sob condições de vasos em casa de vegetação com as estirpes M130 (*Burkholderia* sp.), ZAE94 (*H. seropedicae*) e M209 (*Burkholderia* sp.), foi observado que houve uma contribuição variando de 11 % a 20 % no nitrogênio acumulado na massa seca das plantas de arroz (BALDANI et al., 2000). Esses autores observaram que não houve diferença significativa entre os tratamentos no aumento da produção dos grãos e que a contribuição da FBN por estas bactérias foi inferior a 5 %.

Tabela 16: Acúmulo de nitrogênio total da parte aérea das plantas de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento vegetativo, inoculadas com a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio			
	0	20	25	50
	kg . ha ⁻¹			
Não Inoculado	129,4 aA	148,9 aA	153,1 aA	143,3 aA
Inoculado	165,6 aA	164,9 aA	142,0 aA	143,3 aA

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD à 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 15,46 %.

Tabela 17: Acúmulo de nitrogênio total da parte aérea das plantas de arroz da variedade IAC4440, no estágio de desenvolvimento vegetativo, inoculadas com a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio			
	0	20	25	50
	kg . ha ⁻¹			
Não Inoculado	96,7 aB	115,2 aAB	114,2 aAB	126,1 aA
Inoculado	124,0 aA	132,8 aA	122,3 aA	125,5 aA

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD à 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 13,72 %.

Tabela 18: Acúmulo de nitrogênio total da parte aérea das plantas de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento florescimento, inoculadas com a estirpe ZAE 94 e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio			
	0	20	25	50
	kg . ha ⁻¹			
Não Inoculado	167,2 aA	180,4 aA	173,4 aA	195,7 aA
Inoculado	187,4 aA	201,2 aA	212,7 aA	171,7 aA

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD à 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 15,09 %.

Tabela 19: Acúmulo de nitrogênio total da parte aérea das plantas de arroz da variedade IAC4440, no estágio de desenvolvimento florescimento, inoculadas com a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio			
	0	20	25	50
	kg . ha ⁻¹			
Não Inoculado	146,8 aAB	155,1 aAB	126,4 aB	179,2 aA
Inoculado	138,4 aA	161,2 aA	154,9 aA	148,2 aA

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD à 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 14,11 %.

A máxima resposta à inoculação da variedade IR42 foi observada no tratamento inoculado, com a bactéria diazotrófica *H. seropedicae* (estirpe ZAE 94), acrescido de 20 kg de N . ha⁻¹ (**Figura 7**). Este tratamento aumentou em 88 % a produção de grãos em relação ao tratamento não inoculado e não adubado, 14 % em relação ao tratamento que recebeu somente a inoculação e 20,5 % em relação ao tratamento que recebeu 20 kg de N . ha⁻¹ (**Tabela 20**). Por outro lado, a máxima resposta à adubação foi obtida na dose de 100 kg de N . ha⁻¹, embora este tratamento tenha sido estatisticamente igual ao tratamento que recebeu a dose de 20 kg de N . ha⁻¹ (**Figura 7**).

Tabela 20: Produção de grãos das plantas de arroz da variedade IR42 inoculada com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio				MG
	0	20	50	100	
Não Inoculada	3.673,1 bB	5.306,4 bA	4.278,4 bAB	5.462,7 aA	4680,0 b
Inoculada	6.065,1 aAB	6.931,6 aA	5.829,3 aAB	5.607,7 aB	6108,0 a
Aumento (%)	65,11	20,5	36,3	2,64	30,5

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 12,55 %. MG: Média Geral dos tratamentos inoculado e não inoculado.

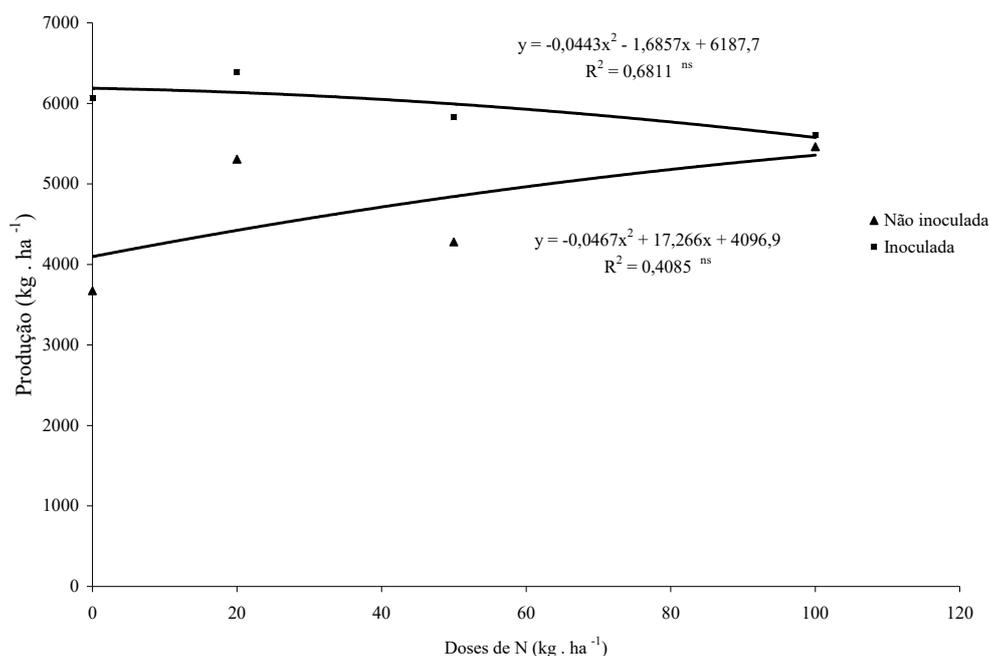


Figura 7: Análise de regressão da produção de grãos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 50 e 100 kg de N . ha⁻¹) na variedade IR42 inoculada ou não com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae*. Legenda: ns = não significativo a 5 % de significância.

Em relação ao tratamento não inoculado e não adubado, a inoculação da estirpe estudada aumentou a produção de grãos em torno de 65 %. Com base nesses resultados pode-se concluir que a inoculação desta estirpe pode contribuir com mais de 20 Kg de N . ha⁻¹ na variedade IR42.

Já na variedade IAC4440 foi observado que a produção de grãos dos tratamentos inoculado e inoculado mais adubação, não diferiu estatisticamente das respectivas testemunhas adubadas, exceto quando utilizada a dose de 100 kg de N . ha⁻¹. Embora a diferença não seja estatisticamente significativa, a inoculação da estirpe ZAE 94 acrescido de 20 kg de N . ha⁻¹ mostrou uma tendência em aumentar a produção de grãos em 8 e 18 %, em relação à testemunha absoluta e testemunha inoculada, respectivamente. Este também foi o tratamento que mais se aproximou do tratamento que recebeu a dose de 100 kg de N . ha⁻¹. (**Tabela 21**). Estes resultados demonstram que a máxima resposta à adubação, na variedade IAC440, foi obtida na dose de 100 kg de N . ha⁻¹ (**Figura 8**).

Tabela 21: Produção de grãos das plantas de arroz da variedade IAC4440 inoculadas com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio				MG
	0	20	50	100	
	kg . ha ⁻¹				
Não Inoculado	4386,7 aB	4448,9 aB	3570,7 aC	5293,3 aA	4424,7 a
Inoculado	4002,0 aA	4740,0 aA	4091,8 aA	4246,7 bA	4310,7 a
Aumento (%)	- 8,7	6,54	14,6	- 19,8	- 2,6

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 9,88 %. MG: Média Geral dos tratamentos inoculado e não inoculado.

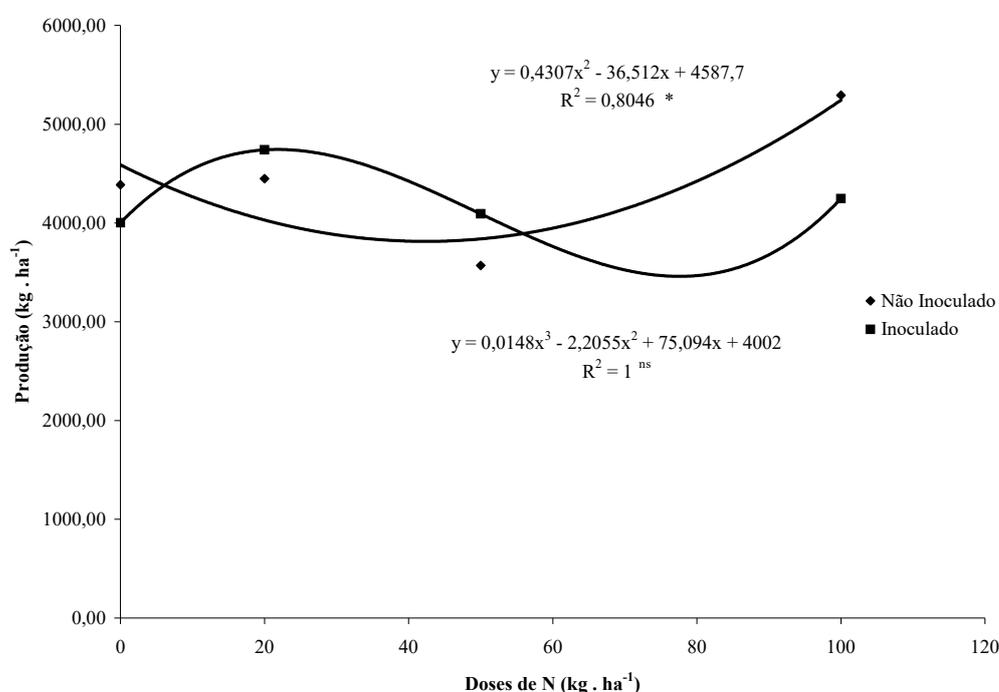


Figura 8: Análise de regressão da variável produção de grãos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha⁻¹) na variedade IAC4440 inoculada ou não com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae*. Legenda: ^{ns} não significativo a 5 % de probabilidade; * significativo a 5 % de probabilidade.

O efeito positivo da inoculação, com bactérias diazotróficas, também foi observado por diversos autores. FERREIRA et al. (2003) observaram em campo aumentos na produção de grãos de 38 e 18 %, na variedade IR42 e IAC4440, respectivamente, quando inoculado com a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* em relação ao controle não inoculado.

Em experimentos conduzidos em casa de vegetação com trigo, cevada e aveia, inoculados com *Azospirillum* sp. estirpe RAM-7 foi observado que a inoculação da estirpe aumentou a produtividade, porém, estas respostas variaram entre as culturas avaliadas. Para o trigo, os aumentos significativos foram obtidos quando a inoculação foi associada a 100% do nitrogênio recomendado. Já no tratamento que recebeu somente inoculação produziu 7,4%, embora a diferença não tenha sido significativo. Em cevada, a presença do inoculante foi

capaz de suprir 20% da adubação recomendada de nitrogênio. Para a aveia, a inoculação com *Azospirillum* sp. RAM-7 não proporcionou aumento significativo na produtividade. Em relação ao teor de nitrogênio total dos grãos, para as três culturas, também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos avaliados (DALLA SANTA et al. 2004a).

Já na cultura do milho, experimentos com o inoculante “Graminante”, a base de *Azospirillum* spp., mostraram que os tratamentos com inoculação e aplicação de adubação nitrogenada, aumentaram a produção em 30% (CAVALLET et al. 2000). Estes resultados foram próximos aos encontrados por DALLA SANTA et al. (2004b) em experimentos em campo, por dois anos consecutivos, com *Azospirillum* sp utilizando as estirpes RAM-7 e RAM-5. Os autores observaram que o uso dessas estirpes foi capaz de reduzir em 40% a quantidade de fertilizante nitrogenado recomendada em cada experimento.

As análises dos teores de nitrogênio total e proteínas total dos grãos mostraram, em ambas variedades, que a inoculação promoveu aumentos nestes parâmetros, porém foi dependente da variedade e dose de nitrogênio utilizada (**Tabelas 22, 23, 24, 25 e Figuras 9, 10, 11 e 12**). O comportamento observado nesses parâmetros foi semelhante ao verificado para a produção de grãos, onde a inoculação promoveu aumentos de até 52 % dependendo da dose de nitrogênio utilizada. Entretanto, o tratamento mais promissor foi a inoculação acrescida de 20 kg de N. ha⁻¹, que promoveu aumentos de 88 % em relação à testemunha absoluta, 24 % em relação ao tratamento que recebeu somente a inoculação e 39,4 % em relação ao tratamento que recebeu 20 kg de N . ha⁻¹ (**Tabelas 22 e 24**).

O comportamento dos parâmetros de nitrogênio total e proteína total dos grãos foi o mesmo observado para o parâmetro produção de grãos na variedade IAC4440. Portanto, nesta variedade, pode-se verificar que os tratamentos inoculado e inoculado mais a adubação não diferiram estatisticamente das respectivas testemunhas adubadas. Embora não tenham sido estatisticamente significativos, a inoculação promoveu aumentos de até 28 % para os parâmetros analisados, dependendo da dose de nitrogênio utilizada. A inoculação da estirpe ZAE 94 acrescido de 20 kg de N. ha⁻¹ mostrou uma tendência em aumentar esses parâmetros em 0,6 e 11 %, em relação à testemunha absoluta e testemunha inoculada, respectivamente. Entretanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas (**Tabelas 23 e 25**). Estes resultados demonstram que a máxima resposta à adubação, na variedade IAC440, foi obtida na dose de 100 kg de N . ha⁻¹, a partir da análise regressão (**Figuras 10 e 12**).

Em estudos de inoculação em trigo, DIDONET et al. (1996) observaram resultados semelhantes, onde a inoculação da estirpe JA04 de *A. brasilense* acrescido da adubação com 15 kg N.ha⁻¹ proporcionaram um aumento no conteúdo de nitrogênio total e produção de grãos, sendo este tratamento estatisticamente igual ao que recebeu 60 kg N.ha⁻¹.

Estudos em casa-de-vegetação, com a variedade de arroz IR 42, mostraram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho GUIMARÃES (2006). Foram observados incrementos no acúmulo de nitrogênio dos grãos de 64 % nas plantas inoculadas com a estirpe ZAE 94 e adubadas com 50 kg N . ha-1 em relação ao controle não inoculado nem adubado. Já na variedade IAC 4440, a inoculação da estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* aumentou em até 15 % o nitrogênio acumulado nos grãos. FERREIRA et al. (2003) também encontraram aumentos de 31 e 11 % no conteúdo de nitrogênio total dos grãos, em relação à testemunha absoluta nas variedades IR42 e IAC4440, respectivamente.

CAMPOS (1999), trabalhando com diferentes cultivares de arroz inundado sob condições de campo, observou que dentre as cultivares mais eficientes quanto ao índice de colheita de nitrogênio, a IR42 contribuiu com aumentos em torno de 60 %. Este autor ressaltou que quanto maior o índice de colheita de N, maior é a proporção de nitrogênio acumulado nos grãos em relação à parte aérea.

Tabela 22: Acúmulo de nitrogênio total dos grãos de arroz da variedade IR 42 inoculada com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio				MG
	0	20	50	100	
	kg . ha ⁻¹				
Não Inoculado	45,1 bB	60,5 bB	57,3 bB	79,3 aA	60,6 b
Inoculado	68,4 aB	84,5 aA	78,2 aA	70,6 aA	75,3 a
Aumento (%)	51,7	39,8	36,5	- 11,0	24,3

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 17, 5 %. MG: Média Geral dos tratamentos inoculado e não inoculado.

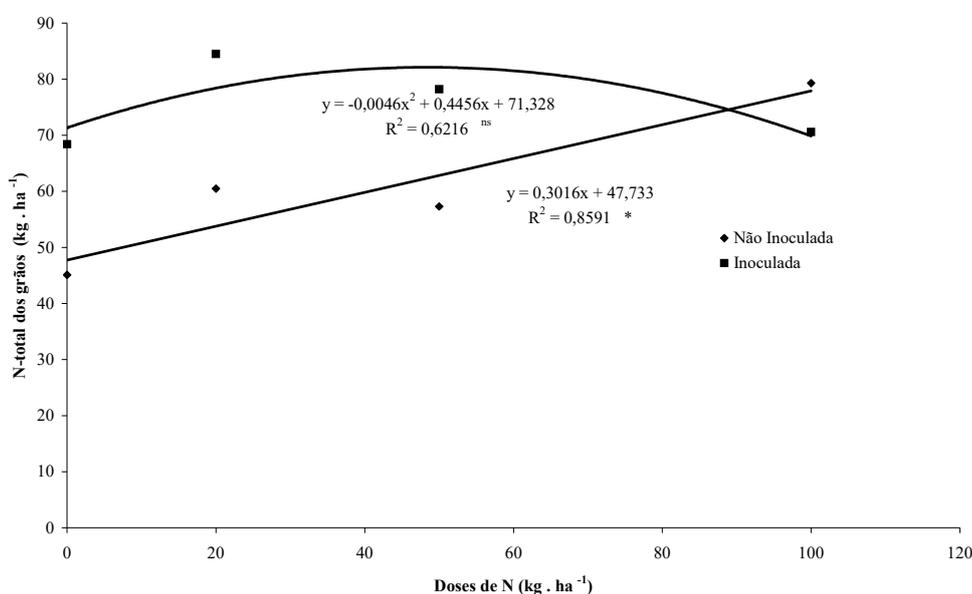


Figura 9: Análise de regressão da variável nitrogênio total dos grãos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha⁻¹) na variedade IR42 inoculada ou não com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae*. Legenda: ^{ns} não significativo a 5 % de de probabilidade; * significativo a 5 % de probabilidade.

Tabela 23: Acúmulo de nitrogênio total dos grãos de arroz da variedade IAC 4440 inoculada com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio				MG
	0	20	50	100	
	kg . ha ⁻¹				
Não Inoculado	51,6 aB	47,2 aB	44,2 aB	68,7 aA	52,8 a
Inoculado	46,7 aA	51,8 aA	56,4 aA	59,9 aA	53,4 a
Aumento (%)	- 9,5	9,8	27,52	-12,7	1,13

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 16,71 %. MG: Média Geral dos tratamentos inoculado e não inoculado.

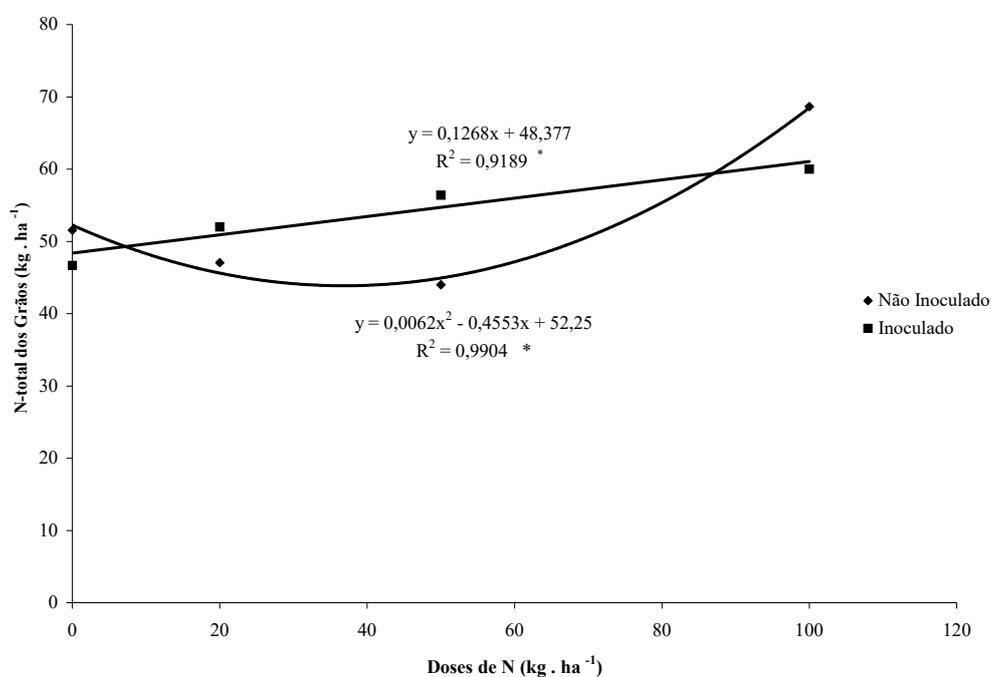


Figura 10: Análise de regressão da variável nitrogênio total dos grãos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha⁻¹) na variedade IAC440 inoculada ou não com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae*. Legenda: * significativo a 5 % de probabilidade.

Tabela 24: Acúmulo de proteína total dos grãos de arroz da variedade IR 42 inoculada com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio				MG
	0	20	50	100	
	kg . ha ⁻¹				
Não Inoculado	268,0 bB	360,0 bAB	340,0 aB	472,0 aA	360,0 b
Inoculado	406,7 aA	503,3 aA	464,7 aA	420,0 aA	448,7 a
Aumento (%)	51,7	39,8	36,7	-12,4	24,6

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 17,7 %. MG: Média Geral dos tratamentos inoculado e não inoculado.

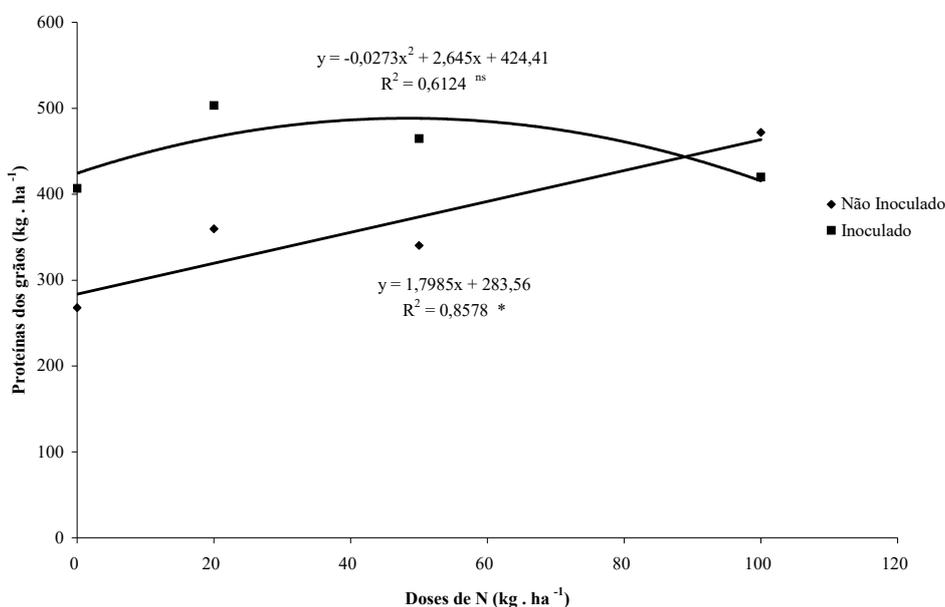


Figura 11: Análise de regressão da variável proteína total dos grãos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha⁻¹) na variedade IR42 inoculada ou não com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae*. Legenda: ^{ns} não significativo a 5 % de probabilidade; * significativo a 5 % de probabilidade.

Tabela 25: Acúmulo de proteínas dos grãos de arroz da variedade IAC 4440 inoculada com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha⁻¹).

Bactéria	Doses de Nitrogênio				MG
	0	20	50	100	
	kg . ha ⁻¹				
Não Inoculado	306,7 aB	280,7 aB	262,7 aB	408,7 aA	314,7 a
Inoculado	277,3 aA	308,7 aA	335,3 aA	356,7 aA	320,0 a
Aumento (%)	- 9,6	10	27,7	- 12,7	1,1

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de significância. Médias de 6 repetições. CV: 16,7 %. MG: Média Geral dos tratamentos inoculado e não inoculado.

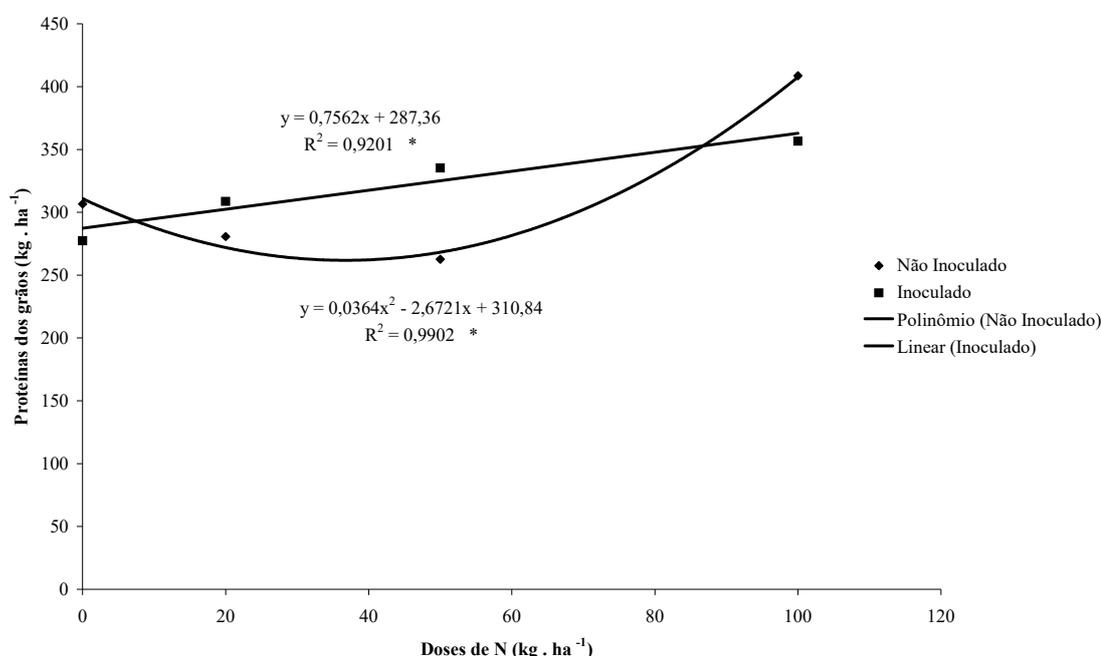


Figura 12: Análise de regressão da variável proteína total dos grãos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha⁻¹) na variedade IAC4440 inoculada ou não com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae*. Legenda: * significativo a 5 % de probabilidade.

As diferentes respostas à inoculação nas variedades IR42 e IAC4440, podem ser explicadas pelas diferenças encontradas por CAMPOS (2003) que observou uma baixa eficiência da variedade IAC4440 em se beneficiar da fixação biológica de nitrogênio, ou seja, possui maior capacidade de utilização do nitrogênio do solo. Outro fator que pode explicar estas diferenças é a afinidade entre estirpes e cultivares (OLIVARES et al., 1997; BASHAN & HOLGUIM, 1997; GUIMARÃES, 2001). Este fato também pode explicar as diferenças encontradas entre os resultados dos experimentos de inoculação em vasos, anteriormente discutidos (item 4.3), já que neste experimento foi utilizado um Planossolo série Ecologia e

no experimento em campo um Argissolo Vermelho Amarelo que apresentam diferentes características quanto aos teores de matéria orgânica e nutriente.

Alguns autores têm sugerido o uso de estirpes homólogas, isto é, isoladas do mesmo tipo de planta que se deseja inocular, especialmente quando a população nativa está presente (BALDANI, 1980; SUMNER, 1990). Entretanto em recente estudo, ALVES (2007) observou a não especificidade de um isolado de arroz (estirpe ZAE 94) quando inoculado em milho, onde este isolado aumentou a produtividade de grãos em até 34 % em combinações diferenciadas de genótipo e adubação. Este fato comprova a hipótese de que a interação genótipo x estirpe da bactéria é mais importante que a interação espécie de planta x estirpe da bactéria.

4.5 - Experimento de Reinoculação de *H. seropedicae* (estirpe ZAE 94) em Condições de Campo.

O número mais provável de bactérias diazotróficas, quantificadas pelo método do NMP, demonstrou no experimento de reinoculação, que todos os tratamentos apresentaram populações numericamente iguais, ou seja, não foram observadas diferenças entre os tratamentos inoculados e reinoculados (**Tabela 26**). A técnica de NMP foi capaz de revelar a presença de bactérias diazotróficas em todas as partes das plantas.

Entretanto, a técnica não é capaz de discriminar se a população existente foi oriunda da inoculação ou da população nativa ou até mesmo quais as espécies presentes nas plantas. Portanto, para responder a esta pergunta é necessário o uso de técnicas moleculares.

Tabela 26: Número de bactérias diazotróficas crescidas no meio de cultivo JNFb, presentes em raiz e parte aérea de arroz, variedades IAC4440 e IR42, inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae*, nos estádios de desenvolvimento, vegetativo e florescimento.

Tratamentos	Variedade	Estádio Vegetativo		Estádio Florescimento	
		PA	RAIZ	PA	RAIZ
Log. do n° de células/g de matéria fresca).					
Não Inoc.	IR42	4,40	5,65	4,88	6,15
	IAC4440	5,40	5,65	6,15	5,40
20 kg N.ha ⁻¹	IR42	4,65	5,40	4,48	6,15
	IAC4440	4,65	5,40	6,15	3,95
25 kg N.ha ⁻¹	IR42	4,18	5,15	4,30	6,15
	IAC4440	4,65	6,15	6,15	4,18
30 kg N.ha ⁻¹	IR42	4,18	5,40	4,98	6,15
	IAC4440	4,18	5,40	6,15	6,15
T1	IR42	5,04	5,04	6,15	6,04
	IAC4440	6,04	6,04	6,15	4,88
Inoc + 20 kg N.ha ⁻¹	IR42	3,95	5,40	3,95	6,15
	IAC4440	3,95	5,40	6,15	6,15
Inoc + 25 kg N.ha ⁻¹	IR42	3,95	5,18	4,18	6,04
	IAC4440	3,95	5,18	6,15	5,40
Inoc + 30 kg N.ha ⁻¹	IR42	4,40	5,15	4,18	6,04
	IAC4440	5,40	6,15	6,15	4,30
T2	IR42	4,65	5,04	4,65	6,15
	IAC4440	4,65	6,04	4,65	6,15
Reinoculação	IR42	4,18	5,04	4,18	6,15
	IAC4440	6,15	6,04	6,04	6,15

Inoc: Tratamentos inoculados com a estirpe ZAE 94 , PA= Parte Aérea, R= Raiz. T1= Sem inoculação no 1° ano e Inoculado no 2° ano. T2: Inoculado no 1° ano e não Inoculado no 2° ano.

Os resultados referentes ao acúmulo de biomassa seca e nitrogênio total da parte aérea das plantas de arroz, variedade IR42 no estágio de desenvolvimento vegetativo, mostraram que somente os tratamentos inoculados acrescidos de adubo (doses 20 e 25 kg de N . ha⁻¹) foram estatisticamente iguais a testemunha que recebeu a dose de 20 kg de N . ha⁻¹ (Tabela 27). Embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa, estes tratamentos aumentaram em até 12 e 16 % a biomassa seca e nitrogênio total da parte aérea, respectivamente, em relação aos tratamentos que receberam somente as respectivas doses do adubo. Em relação à testemunha não inoculada, estes tratamentos aumentaram em até 40 a biomassa seca e 55 % o nitrogênio total da parte aérea (Tabela 27).

Ainda nesta fase de desenvolvimento das plantas, não foram observadas diferenças significativas estatisticamente, entre os tratamentos que receberam a inoculação no segundo ano (T1) e o tratamento reinoculado para os parâmetros agrônômicos de acúmulo de biomassa seca e N-total da parte aérea, mesmo assim, estes tratamentos aumentaram, respectivamente, em até 14 e 12 % o acúmulo de biomassa seca da parte aérea e N-total, respectivamente em relação ao tratamento não inoculado.

No estágio de desenvolvimento florescimento, os tratamentos inoculados e adubados não diferiram estatisticamente dos tratamentos não inoculados. O tratamento de reinoculação apresentou uma tendência em aumentar o acúmulo de biomassa seca da parte aérea em até 42 %, embora estatisticamente a diferença não seja significativa. Por outro lado este tratamento tendeu a reduzir o nitrogênio total da parte aérea em 25 % em relação ao tratamento que recebeu a dose de 20 kg de N . ha⁻¹.

Tabela 27: Acúmulo de biomassa seca e nitrogênio total da parte aérea das plantas de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento vegetativo (80 DAP) e florescimento inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N . ha⁻¹) e tratamentos de reinoculação.

Tratamentos	Estádio Vegetativo		Estádio Florescimento	
	BSPA	N-total	BMSPA	N-total
	---kg . ha ⁻¹ ---			
.Não Inoc.	3400,00 b	56,55 b	7384,44 a	92,13 a
20 kg N.ha⁻¹	4206,67 a	75,10 a	9074,44 a	139,21 a
25 kg N.ha⁻¹	3683,33 b	63,43 b	8096,33 a	89,32 a
50 kg N.ha⁻¹	2973,33 b	48,74 b	6656,67 b	73,97 a
T1	3513,33 b	57,61 b	6148,89 b	97,56 a
Inoc + 20 kg N.ha⁻¹	4728,89 a	87,40 a	6290,00 b	69,93 a
Inoc + 25 kg N.ha⁻¹	4698,89 a	83,35 a	7775,56 a	97,60 a
Inoc + 50 kg N.ha⁻¹	3724,44 b	64,47 b	6562,22 b	67,86 a
T2	2915,56 b	40,15 b	5616,67 b	58,92 a
Reinoculação	3873,33 b	62,59 b	10477,78 a	104,45 a
CV (%)	19,3	22,2	12,20	34,41

Inoc: Tratamentos inoculados com a estirpe ZAE 94 , BSPA= Biomassa Seca da Parte Aérea, R= Raiz. T1= Sem inoculação no 1 ano e Inoculado no 2º ano. T2: Inoculado no 1 ano e não Inoculado no 2 ano. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 10% de significância. Médias de 6 repetições.

Os resultados obtidos para o acúmulo de biomassa seca e nitrogênio total da parte aérea no estágio de desenvolvimento vegetativo, na variedade IAC4440, foram semelhantes aos encontrados para a variedade IR42. Os melhores resultados foram obtidos para os tratamentos de inoculação acrescidos de adubo (doses 25 e 50 kg de N . ha⁻¹), além do que recebeu somente a inoculação no segundo ano (T1) e da testemunha que recebeu a dose de 20 kg de N . ha⁻¹. (**Tabela 28**). Ainda nesta fase de desenvolvimento, o tratamento de reinoculação foi estatisticamente igual ao tratamento não inoculado e que recebeu inoculação somente no primeiro ano (T2), porém o tratamento que recebeu inoculação no segundo ano (T2) foi estatisticamente igual a testemunha que recebeu a dose de 20 kg de N . ha⁻¹. Entretanto, este tratamento reduziu a biomassa seca da parte aérea em até 13 % em relação ao tratamento que recebeu a dose de 20 kg de N . ha⁻¹.

Já no estágio de desenvolvimento florescimento, os tratamentos inoculados acrescidos de adubo nitrogenado nas doses de 20 e 25 kg de N . ha⁻¹ foram estatisticamente iguais às testemunha que receberam as doses de 20, 25 e 50 kg de N . ha⁻¹. Estes tratamentos contribuíram com até 6 % da biomassa seca da parte aérea em relação à testemunha que recebeu a dose de 20 kg de N . ha⁻¹ e de até 32 % em relação a testemunha não inoculada

(Tabela 28). Para o acúmulo de nitrogênio total da parte aérea de todos os tratamentos não foram observadas diferenças significativas. Entretanto, os tratamentos inoculados e inoculados acrescidos de adubação nitrogenada tenderam em promover um aumento de até 67 % em relação a não inoculada.

Tabela 28: Acúmulo de biomassa seca da parte aérea das plantas de arroz da variedade IAC4440, no estágio de desenvolvimento vegetativo (80 DAP) e florescimento, inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 25 e 50 kg de N. ha⁻¹) e tratamentos de reinoculação.

Tratamentos	Estádio Vegetativo		Estádio Florescimento	
	BSPA	N-total	BMSPA	N-total
--- kg . ha ⁻¹ ---				
.Não Inoc.	3644,44 b	41,80 b	6055,56 b	62,47 a
20 kg N.ha⁻¹	5315,56 a	76,40 a	7753,33 a	74,46 a
25 kg N.ha⁻¹	4175,56 b	53,66 b	7124,44 a	70,15 a
50 kg N.ha⁻¹	4148,89 b	68,36 a	7274,22 a	89,63 a
T1	4633,33 a	49,31 b	6476,67 b	86,10 a
Inoc + 20 kg N.ha⁻¹	4106,67 b	59,86 b	7994,44 a	88,61 a
Inoc + 25 kg N.ha⁻¹	4557,78 a	68,76 a	7602,22 a	104,34 a
Inoc + 50 kg N.ha⁻¹	4660,00 a	79,98 a	5275,56 b	65,15 a
T2	3435,56 b	45,54 b	4653,33 b	46,62 a
Reinoculação	3712,22 b	56,23 b	6140,00 b	57,73 a
CV (%)	14,4	22,6	12,20	32

Inoc: Tratamentos inoculados com a estirpe ZAE 94 , BSPA= Biomassa Seca da Parte Aérea, R= Raiz. T1= Sem inoculação no 1º ano e Inoculado no 2º ano. T2: Inoculado no 1º ano e não Inoculado no 2º ano. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 10% de significância. Médias de 6 repetições.

A análise dos parâmetros agrônômicos produção de nitrogênio total e proteína total dos grãos na variedade IR42 mostrou que a inoculação da estirpe ZAE 94 proporcionou resultados superiores ao tratamento que não recebeu inoculação e foram estatisticamente iguais à testemunha que recebeu 20 e 100 kg de N. ha⁻¹ (Tabela 29). Este tratamento aumentou em até 19 % todos os parâmetros estudados em relação à testemunha não inoculada. Estes resultados indicam que a inoculação desta estirpe pode contribuir com até 20 kg de N . ha⁻¹ nesta variedade. Resultados semelhantes foram encontrados por FERREIRA (2004) trabalhando com arroz irrigado em casa de vegetação.

Entretanto, não foram observadas diferenças significativas estatisticamente entre os tratamentos de inoculação (T1) e reinoculação nos parâmetros estudados na variedade IR42. Estes tratamentos foram estatisticamente iguais à testemunha que recebeu 20 kg de N . ha⁻¹ e superiores aos tratamentos que não recebeu inoculação.

Tabela 29: Produção, nitrogênio total e proteína bruta total dos grãos das plantas de arroz da variedade IR42 inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha⁻¹) e tratamentos de reinoculação.

Tratamentos	PG	N- total	PTG
		---kg . ha ⁻¹ ---	
Não Inoc.	3423,33 b	42,00 a	125,28 a
20 kg N.ha⁻¹	3966,67 a	50,67 a	150,42 a
50 kg N.ha⁻¹	3006,67 b	42,00 a	125,47 a
100 kg N.ha⁻¹	3346,67 a	48,00 a	143,70 a
T1	4046,67 a	50,00 a	148,50 a
Inoc + 20 kg N.ha⁻¹	3640,00 a	44,00 a	132,86 a
Inoc + 50 kg N.ha⁻¹	4041,33 a	47,33 a	140,96 a
Inoc + 100 kg N.ha⁻¹	3180,00 b	42,00 a	130,69 a
T2	3469,33 b	44,00 a	131,64 a
Reinoculação	3686,67 a	48,67 a	144,06 a
CV (%)	10,4	13,4	13,52

Inoc: Tratamentos inoculados com a estirpe ZAE 94; PG: Produção Grãos; PTG: Proteínas Total Grãos , T1= Sem inoculação no 1º ano e Inoculado no 2º ano. T2: Inoculado no 1º ano e não Inoculado no 2º ano. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 10% de significância. Médias de 6 repetições.

A análise dos parâmetros agrônômicos de produção, nitrogênio total e proteína total dos grãos na variedade IAC4440, mostrou que a inoculação da estirpe ZAE 94 proporcionou resultados superiores aos tratamentos que não receberam inoculação e foram estatisticamente iguais a testemunha que receberam 20 e 50 kg de N. ha⁻¹ (**Tabela 30**). A inoculação e reinoculação aumentaram a produção, nitrogênio total e proteína total dos grãos em até 40, 51 e 45 %, respectivamente, em relação à testemunha não inoculada. Estes resultados indicam que a inoculação e reinoculação da estirpe estudada podem contribuir com até 50 kg de N.ha⁻¹ na variedade IAC4440. Resultados semelhantes foram encontrados por FERREIRA (2004) e FERREIRA et al., 2003 trabalhando com arroz irrigado em casa de vegetação e em campo.

Tabela 30: Produção, nitrogênio total e proteína total dos grãos das plantas de arroz da variedade IAC4440 inoculadas ou não com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* e com ou sem fertilizante nitrogenado (0, 20, 50 e 100 kg de N. ha⁻¹) e tratamentos de reinoculação.

Tratamentos	PG	N- total --- kg . ha ⁻¹ ---	PTG
Não Inoc.	3143,33 b	31,00 b	186,07 c
20 kg N.ha⁻¹	4088,89 a	51,00 a	303,48 a
50 kg N.ha⁻¹	4548,89 a	57,33 a	340,71 a
100 kg N.ha⁻¹	3393,33 b	42,67 a	252,80 b
T1	4115,56 a	46,00 a	272,90 b
Inoc + 20 kg N.ha⁻¹	3377,78 b	38,67 b	222,59 c
Inoc + 50 kg N.ha⁻¹	3486,67 b	50,00 a	298,01 a
Inoc + 100 kg N.ha⁻¹	3151,11 b	46,67 a	278,33 b
T2	3131,33 b	35,67 b	212,03 c
Reinoculação	4393,33 a	47,00 a	272,56 b
CV (%)	10,4	13,4	11,8

Inoc: Tratamentos inoculados com a estirpe ZAE 94; PG: Produção Grãos; PTG: Proteínas Total Grãos , T1= Sem inoculação no 1° ano e Inoculado no 2° ano. T2: Inoculado no 1° ano e não Inoculado no 2° ano. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 10% de significância. Médias de 6 repetições.

Os resultados obtidos na produção, nitrogênio total e proteínas dos grãos, no experimento do segundo ano (reinoculação), em ambas variedades de arroz, mostraram que a inoculação da estirpe ZAE 94 se faz necessária em todos os anos de plantio, já que o tratamento de reinoculação foi estatisticamente igual ao tratamento que recebeu a inoculação desta estirpe no segundo ano (T1) e estatisticamente superior aos tratamentos não inoculado e que recebeu inoculação somente no primeiro ano (T2). Reforçando esta observação, está o fato de que os tratamentos que receberam inoculação somente no primeiro ano (T2) e não inoculado foram estatisticamente iguais em ambas variedades de arroz utilizadas.

Os resultados obtidos nestes experimentos demonstram que a inoculação, com a estirpe ZAE 94, é uma prática importante e que pode contribuir com parte do nitrogênio necessário ao desenvolvimento da cultura de arroz, dependendo das variedades e condições utilizadas.

4.6 - Análise da Comunidade Microbiana Presente em Plantas de Arroz Crescidas em Condições de Campo e Inoculadas e Reinoculadas com a Estirpe de *H. seropedicae* (estirpe ZAE 94).

4.6.1 – Sequenciamento da região 16S DNAr da estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* utilizada nos ensaios de inoculação e reinoculação.

Anteriormente ao estudo de análise da comunidade microbiana presentes na parte aérea das plantas de arroz, foi feito o sequenciamento do DNA ribossomal (16S rRNA) da estirpe ZAE 94 e o respectivo alinhamento da sequência obtida com outras bactérias do gênero *H. seropedicae* depositadas no GenBank. Os números de acesso e respectiva

identificação das estirpes das espécies do gênero *Herbaspirillum* consultadas no GenBank encontram-se na **Tabela 31**. O objetivo desta etapa foi caracterizar a bactéria alvo do estudo, além de verificar a possibilidade de se construir um iniciador “estirpe específico” utilizando a região 16S rRNA, de modo a facilitar o monitoramento desta estirpe nas plantas inoculadas em condições de campo.

Tabela 31: Número do acesso e respectiva identificação das estirpes das espécies do gênero *Herbaspirillum* depositadas no GenBank e utilizadas no alinhamento da 16S DNAr.

Número do acesso	Espécie	Estirpe
AJ238361	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Z67
Y10146.1	<i>H. seropedicae</i>	
AF164062	<i>H. seropedicae</i>	BA153
AF164065.2	<i>H. seropedicae</i>	X8
AY191276.2	<i>H. seropedicae</i>	M2
AY191275.1	<i>H. seropedicae</i>	Z78
AY191274.1	<i>H. seropedicae</i>	ZA95
Y191273.1	<i>H. seropedicae</i>	Z152
AY191272.1	<i>H. seropedicae</i>	ZA69
Y486380.1	<i>H. seropedicae</i>	AU4872
	<i>H. seropedicae</i>	ZAE 94
AB109890.1	<i>H. putei</i>	
AB094401.1	<i>H. chlorophenolicum</i>	
AF137508.1	<i>H. rubrisubalbicans</i>	
AY043372.1	<i>H. frisingense</i>	
AJ238359.1	<i>H. frisingense</i>	Mb11
AJ238358.1	<i>H. frisingense</i>	GSF30
AJ238357.1	<i>H. frisingense</i>	75B
AJ238356.1	<i>H. rubrisubalbicans</i>	M4
AB021424.1	<i>H. rubrisubalbicans</i>	ATCC 19308T

Entretanto, a análise da seqüência de 16S DNAr obtida para a estirpe ZAE 94, bem como o seu alinhamento com outras bactérias da espécie *H. seropedicae*, demonstrou a ocorrência de 99% de similaridade com a estirpe padrão Z67 de *H. seropedicae*. Esta característica dificultou o desenho de um iniciador estirpe específico para monitorar o estabelecimento da estirpe ZAE94 usada no inoculante, sugerindo assim a necessidade do uso de regiões com menor grau de similaridade como por exemplo a região 23S rRNA ou até mesmo a região intergênica (16S e 23S DNAr).

O alinhamento da região 16S rRNA da estirpe ZAE 94 com outras espécies de *H. seropedicae* também mostrou que a mesma apresenta alta similaridade com outras estirpes desta mesma espécie como pode ser visto pelo grupo formado pelas estirpes ZAE 94, Z67, Y10146.1, BA153, AU4872 (**Figura 13**).

Resultados semelhantes foram encontrados por BRASIL (2005) e RODRIGUES (2003). Estes autores observaram que os isolados obtidos dos cultivares de arroz IR42 e IAC4440, quando amplificados com iniciadores específicos para a espécie *H. seropedicae* foram 100 % similares à estirpe tipo da espécie (Z67), concluindo assim que os isolados

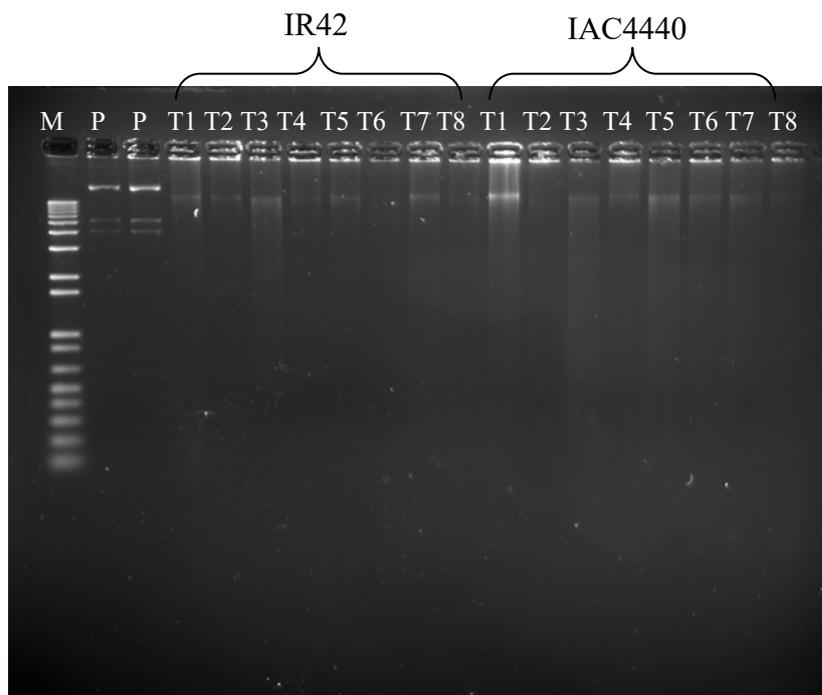


Figura 14: DNA total extraído dos tecidos do colmo das plantas de arroz (primeiro experimento de campo). M: Marcador Molecular; P1: Marcador de 100ng; P2: 200ng; T1: Não Inoculado; T2: Inoculado; T3: Inoculado + 20 kg de N . ha⁻¹; T4: Inoculado + 25 kg de N . ha⁻¹; T5: Inoculado + 50 kg de N . ha⁻¹. T6: 20 kg de N . ha⁻¹; T7: 25 kg de N . ha⁻¹; T8: 50 kg de N . ha⁻¹.

Cerca de 80 ng do DNA total dos tecidos do colmo das plantas de arroz, de cada tratamento foi utilizado na reação de PCR com os iniciadores 799f e 1492r para a região 16S rDNA. A amplificação da região 16S rDNA gerou fragmentos do tamanho esperado, ou seja com aproximadamente 700 pb (**Figura 15**). O objetivo da pré-amplificação foi minimizar o efeito da competição causado pela presença do DNA de plastídeos das plantas (OSBORNE et al., 2005).

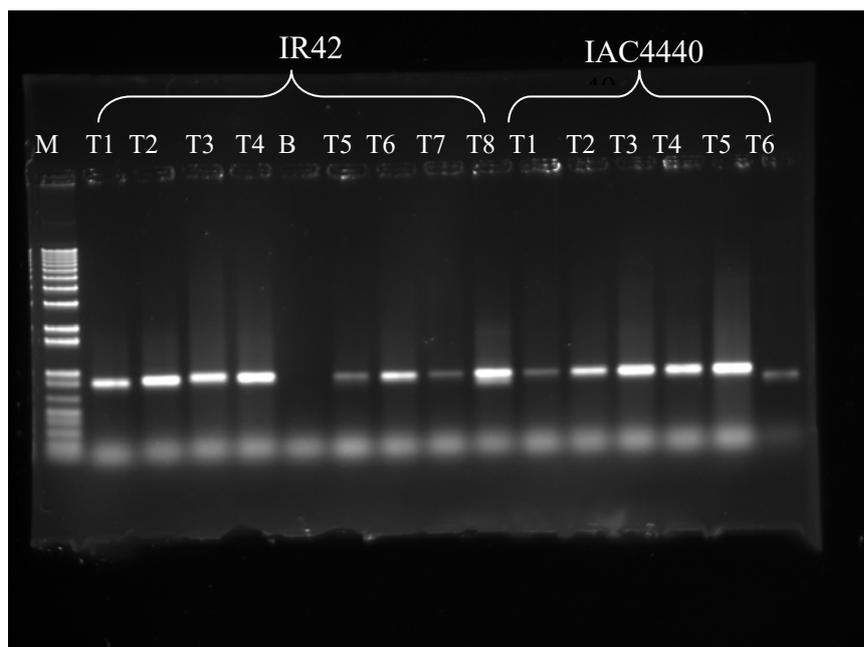


Figura 15: Fragmentos de 700 pb obtidos a partir da reação de PCR da região de 16s rRNA utilizando os primers específicos 799f e 1492r (material amplificado do primeiro experimento de campo). M: Marcador Molecular de 1kb; T1: Não Inoculado; T2: Inoculado; T3: Inoculado + 20 kg de N . ha⁻¹; T4: Inoculado + 25 kg de N . ha⁻¹; B: Branco; T5: Inoculado + 50 kg de N . ha⁻¹. T6: 20 kg de N . ha⁻¹; T7: 25 kg de N . ha⁻¹; T8: 50 kg de N . ha⁻¹.

Após a visualização do produto da amplificação em gel de agarose, aproximadamente 5 µL de cada tratamento foram utilizados na reação de PCR com os iniciadores universais para DGGE 968f(GC) e 1401r. Esta reação de amplificação gerou fragmentos com aproximadamente 430 pb conforme pode ser visualizado em gel de agarose (**Figura 16**). O produto foi então utilizado na eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE).

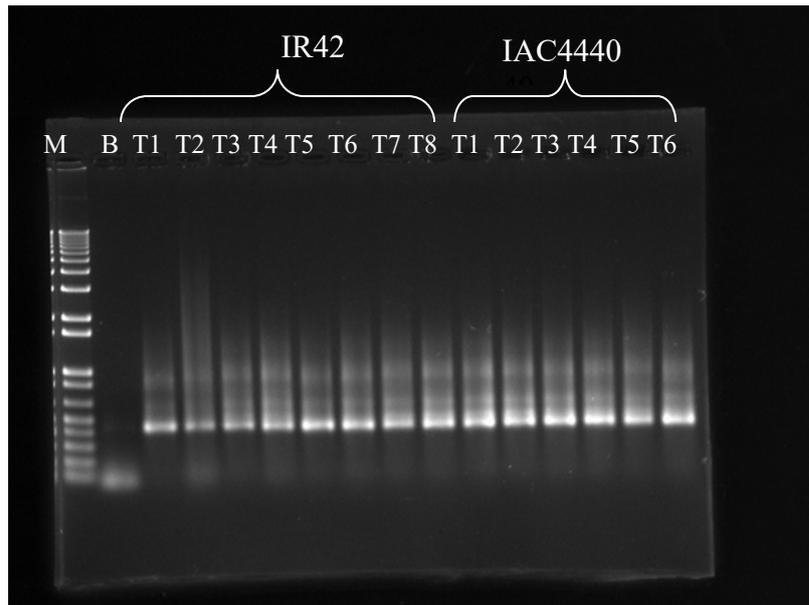


Figura 16: Produto de amplificação da região de 16s rDNA utilizando os primers específicos 968f(GC) e 1401r (material amplificado do primeiro experimento de campo). M: Marcador Molecular de 1kb; B: Branco; T1: Não Inoculado; T2: Inoculado; T3: Inoculado + 20 kg de N . ha⁻¹; T4: Inoculado + 25 kg de N . ha⁻¹; T5: Inoculado + 50 kg de N . ha⁻¹. T6: 20 kg de N . ha⁻¹; T7: 25 kg de N . ha⁻¹; T8: 50 kg de N . ha⁻¹.

Os resultados das análises de similaridade, nos experimentos de inoculação e reinoculação, mostraram que os tratamentos se agruparam em função das variedades de arroz utilizadas, sendo ao nível de 40-50 % para a variedade IR42 e 50 a 60 % para a variedade IAC4440 no experimento de inoculação (**Figura 17**).

Já no experimento de reinoculação, o nível de similaridade dos tratamentos da variedade IR42 foi de 30-40 % e na variedade IAC4440 foi de 40-50 % (**Figura 18**). Estes valores sugerem que a interação genótipo x estirpe da bactéria é uma variável importante e que a planta exerce uma forte influência sobre a comunidade de bactérias presentes nas plantas devendo, portanto, ser considerada nos experimentos de inoculação.

Resultados semelhantes também foram encontrados por REIS Jr et al. (2006) que caracterizando a diversidade de isolados de *Azospirillum amazonense* utilizando-se a análise de restrição da região intergênica 16S-23S DNAr. Estes autores observaram que os isolados separaram-se em dois grupos com 56% de similaridade influenciados pelas espécies de *Brachiaria ssp.*. A maioria dos isolados oriundos de *B. decumbens* e *B. brizantha* está inserida no primeiro grupo, enquanto os oriundos de *B. humidicola* concentram-se no segundo grupo.

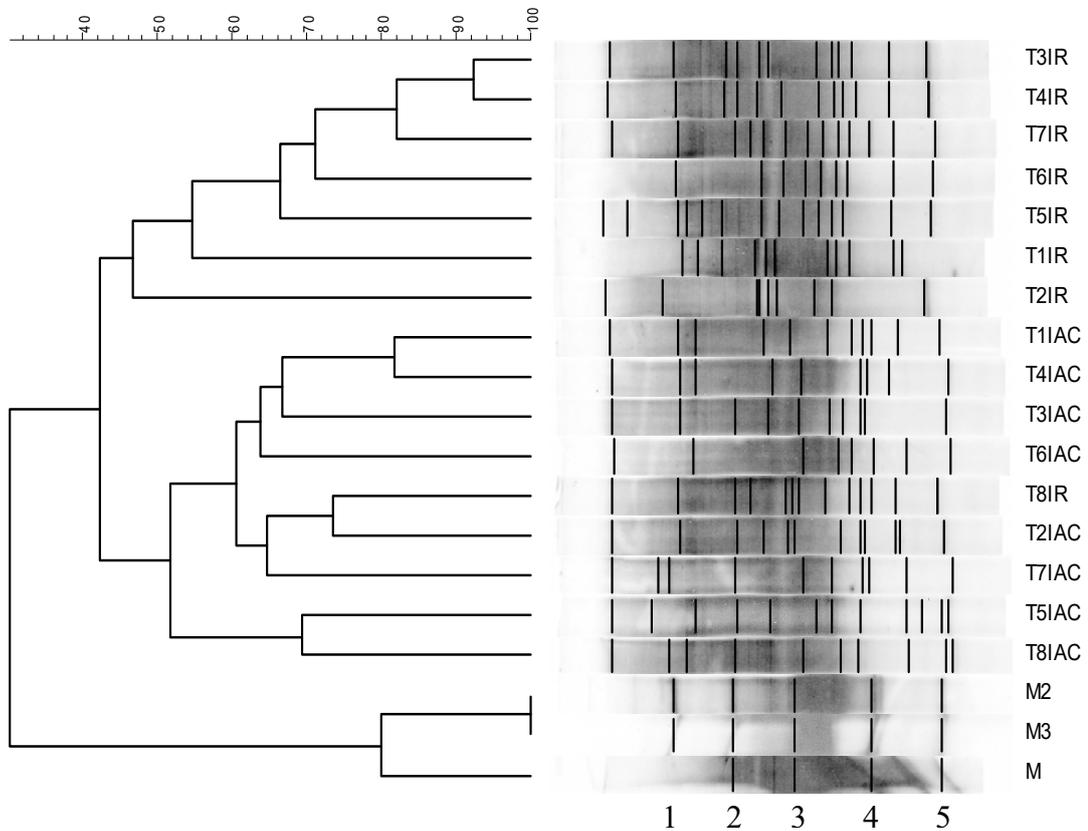


Figura 17: Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelComparII. Experimento de Inoculação. Legenda: Os números referem-se às bandas dos marcadores M, M2, M3: 1: estirpe HCC 103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, 2: estirpe HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*; 3: estirpe CbamC de *Azospirillum amazonense*; 4: estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*; 5: estirpe Ppe 8 de *Burkholderia tropica*; IR: variedade IR42; IAC: variedade IAC4440; T1: Não Inoculado; T2: Inoculado; T3: Inoculado + 20 kg de N . ha⁻¹; T4: Inoculado + 25 kg de N . ha⁻¹; B: Branco; T5: Inoculado + 50 kg de N . ha⁻¹. T6: 20 kg de N . ha⁻¹; T7: 25 kg de N . ha⁻¹; T8: 50 kg de N . ha⁻¹.

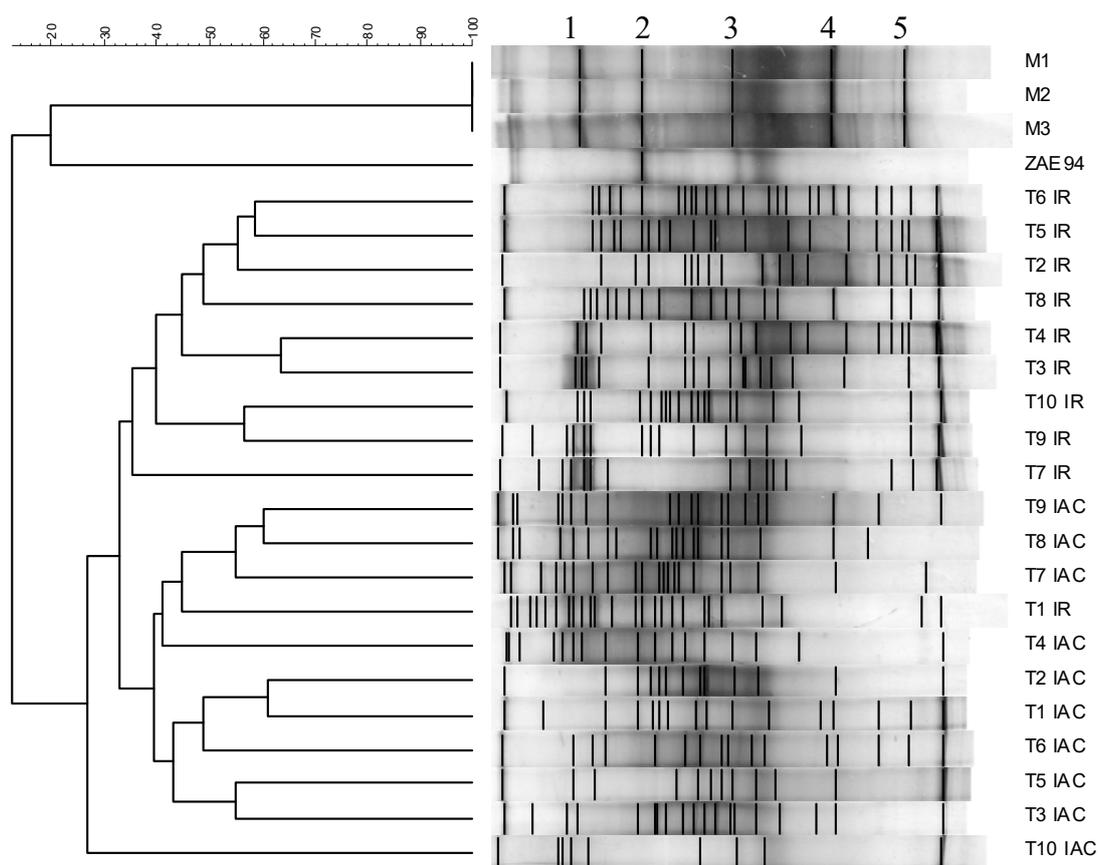


Figura 18: Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelComparII. Experimento de Reinoculação. Legenda: Os números referem-se às bandas dos marcadores M1, M2, M3: 1: estirpe HCC 103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, 2: estirpe HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*; 3: estirpe CbamC de *Azospirillum amazonense*; 4: estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*; 5: estirpe Ppe 8 de *Burkholderia tropcai*; IR: variedade IR42; IAC: variedade IAC4440; T1: Não Inoculado; T2: 20 kg de N . ha⁻¹; T3: 25 kg de N . ha⁻¹; T4: 50 kg de N . ha⁻¹. T5: Não Inoculado no primeiro ano e inoculado no segundo ano; T6: Inoculado + 20 kg de N . ha⁻¹; T7: Inoculado + 25 kg de N . ha⁻¹; T8: Inoculado + 50 kg de N . ha⁻¹; T9: Inoculado no primeiro ano e não inoculado no segundo ano; T10: Reinoculado.

A análise da comunidade microbiana através da técnica de DGGE permitiu demonstrar uma ampla ocorrência de bandas semelhantes às observadas para as estirpes HRC 54, ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae*, HCC 103 de *H. rubrisubalbicans* e CbamC de *Azospirillum amazonense*, indicando uma ampla ocorrência de bactérias desses gêneros nos tecidos do colmo das variedades de arroz utilizadas (**Figuras 19 e 20**). Foram encontradas, embora em menor número, bandas semelhantes às observadas para as estirpes Ppe 8 de *Burkholderia tropica* e PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Também foi observada a ocorrência de um número considerável de bandas distintas dos padrões utilizados, sugerindo que as plantas de arroz são colonizadas por uma ampla variedade de bactérias.

BALDANI (1986) também observou um grande número de bactérias do gênero *Azospirillum* isoladas das variedades (IR42 e IAC4440), apesar desse gênero não ser

considerado endofítico por alguns autores. As espécies *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense* já foram isoladas de raízes, colmo e folhas de plantas de arroz (LADHA et al., 1982; BALDANI, 1986). BRASIL (2005) obteve maior número de isolados caracterizados como pertencentes à espécie *A. amazonense*. Este mesmo autor agrupou 168 isolados de plantas de arroz através de características morfológicas em 4 gêneros: *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Azospirillum* e *Sphingomonas*.

Embora bactérias do gênero *Herbaspirillum* sejam de ampla ocorrência e em números elevados em plantas de arroz, RODRIGUES (2003) encontrou valores considerados baixos, 3 % e 18 %, para o primeiro e segundo experimentos, respectivamente nas variedades IR42 e IAC4440. Além disso, não foram obtidos isolados da cultivar IAC4440 no primeiro experimento. A autora argumentou que o não isolamento dessas bactérias foi em consequência do longo período de incubação no meio JNFB na fase inicial de isolamento, favorecendo assim o desenvolvimento de outras bactérias, como por exemplo, o *Azospirillum* que utiliza a mesma fonte de carbono (ácido málico).

No experimento de inoculação foi observada uma ampla ocorrência de bandas semelhantes às obtidas para as estirpes HRC 54 e ZAE 94 nas duas variedades de arroz, exceto para os tratamentos não inoculados (T1) e o que recebeu a dose de 20 kg de N. ha⁻¹. Estes resultados podem ser explicados pela baixa população de bactérias presentes nas plantas não inoculadas ou ao estabelecimento da bactéria em outras partes da planta, já que a mesma apresenta diferentes sítios de infecção (SILVA, 2001) e neste trabalho foi utilizado somente o colmo das plantas. A ocorrência de bactérias nos demais tratamentos que não receberam a inoculação pode ser devido às diferentes formas de disseminação da bactéria (**Figura 19**) conforme já relatado por REIS JR (2002).

Já no experimento de reinoculação, pode-se verificar uma menor ocorrência de bandas semelhantes às obtidas para as estirpes HRC 54 e ZAE 94 nos diferentes tratamentos. Entretanto, na variedade IR42 foi observado uma maior ocorrência de bandas semelhantes à espécie estudada em quase todos os tratamentos que foram inoculados com a estirpe ZAE 94. Em contraste, na variedade IAC4440 foram observadas bandas semelhantes a da espécie inoculada somente no tratamento inoculado acrescido da dose de 25 kg de N . ha⁻¹ (T7) (**Figura 20**).

As diferenças observadas na comunidade microbiana podem ser decorrentes do modo de colonização e estabelecimento da associação com a planta dos dois genótipos utilizados, já que o gênero *Herbaspirillum* tem capacidade de estabelecimento endofítico (SCHLOTTER et al., 1994; BALDANI, 1996; PERIN et al., 2003), colonizando diferentes tecidos nas plantas.

Outro fator que pode explicar as diferenças observadas entre as espécies é a seleção natural exercida pelos genótipos de arroz utilizados, já que BALDANI et al. (2000) verificaram, em experimentos de inoculação em arroz, que as plantas inoculadas com as estirpes isoladas de milho apresentavam um incremento na biomassa da parte aérea menor que no tratamento inoculado com estirpes isoladas de arroz e sorgo. Em contraste, ALVES (2007) não observou a especificidade de um isolado de arroz (estirpe ZAE 94), quando inoculado em milho. O isolado aumentou a produtividade de grãos em até 34 % em combinações diferenciadas com o genótipo e adubação utilizada. Estes dados sugerem que a interação genótipo x estirpe da bactéria é mais importante que a interação espécie de planta x estirpe da bactéria.

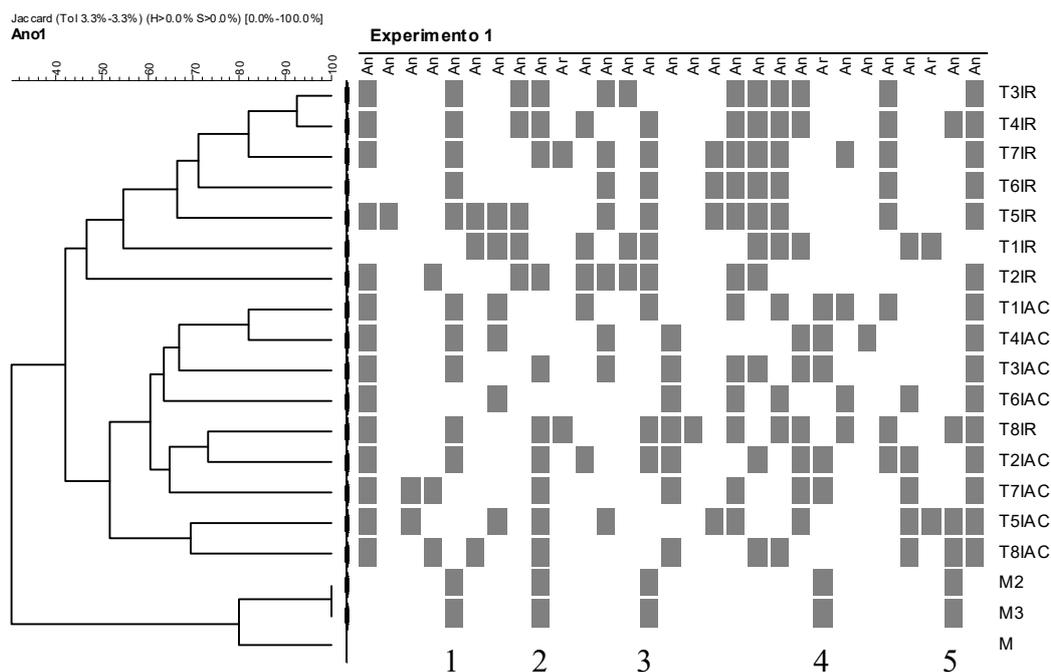


Figura 19: Dendrograma de similaridade (UPGMA) e alinhamento das bandas obtido a partir de análise do gel de DGGE utilizando o programa GelComparII. Experimento de Inoculação. Legenda: Os números referem-se às bandas dos marcadores M, M2, M3: 1: estirpe HCC 103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, 2: estirpe HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*; 3: estirpe CbamC de *Azospirillum amazonense*; 4: estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*; 5: estirpe Ppe 8 de *Burkholderia tropica*; IR: variedade IR42; IAC: variedade IAC4440; T1: Não Inoculado; T2: Inoculado; T3: Inoculado + 20 kg de N . ha⁻¹; T4: Inoculado + 25 kg de N . ha⁻¹; T5: Inoculado + 50 kg de N . ha⁻¹. T6: 20 kg de N . ha⁻¹; T7: 25 kg de N . ha⁻¹; T8: 50 kg de N . ha⁻¹.

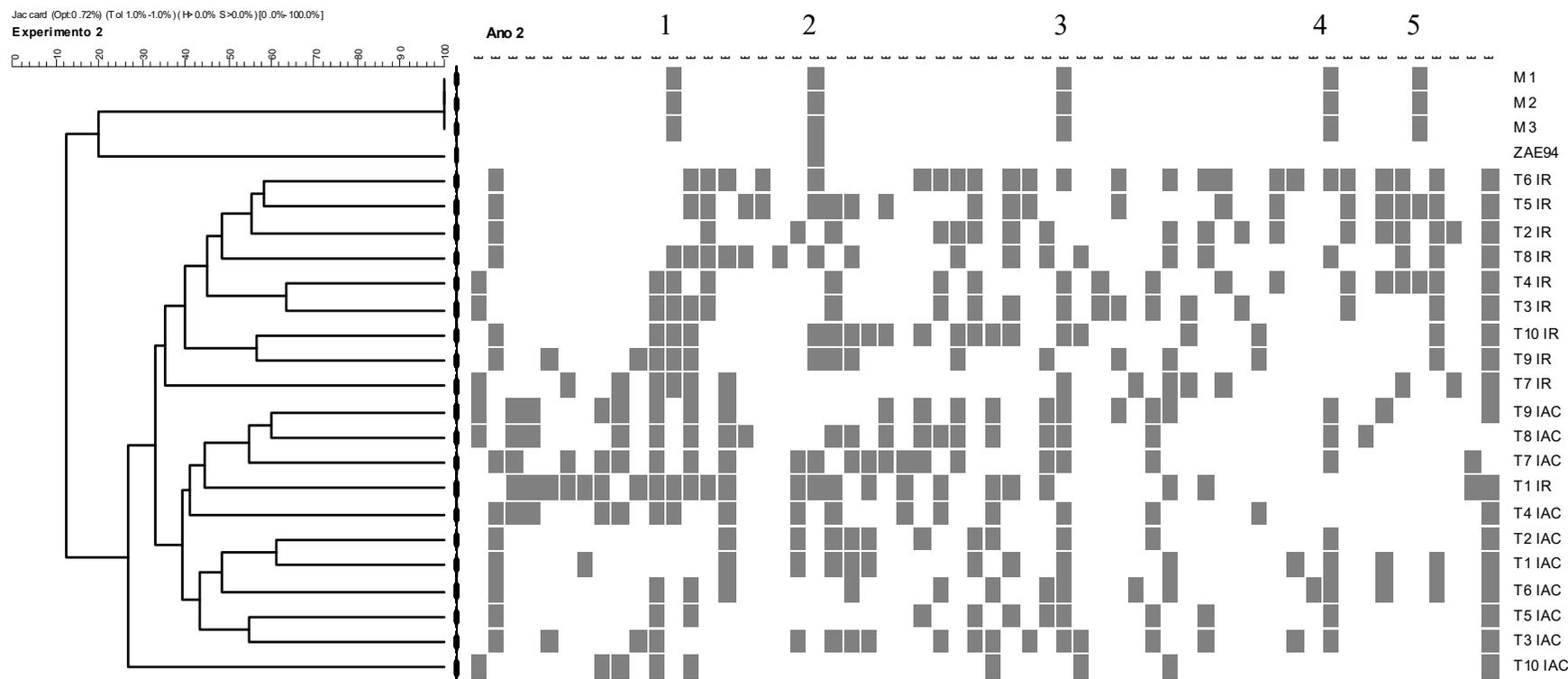


Figura 20: Dendrograma de similaridade (UPGMA) e alinhamento das bandas obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelComparII. Experimento de Reinoculação. Legenda: Os números referem-se às bandas dos marcadores M1, M2, M3: 1: estirpe HCC 103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, 2: estirpe HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*; 3: estirpe CbamC de *Azospirillum amazonense*; 4: estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*; 5: estirpe Ppe 8 de *Burkholderia tropica*; IR: variedade IR42; IAC: variedade IAC4440; T1: Não Inoculado; T2: 20 kg de N . ha⁻¹; T3: 25 kg de N . ha⁻¹; T4: 50 kg de N . ha⁻¹. T5: Não Inoculado no primeiro ano e inoculado no segundo ano; T6: Inoculado + 20 kg de N . ha⁻¹; T7: Inoculado + 25 kg de N . ha⁻¹; T8: Inoculado + 50 kg de N . ha⁻¹; T9: Inoculado no primeiro ano e não inoculado no segundo ano; T10: Reinoculado.

A análise do experimento de inoculação mostra um contraste entre os tratamentos não inoculado (T1), inoculado (T2) e adubado (T8) em função das variedades de arroz utilizadas. De modo geral, o tratamento inoculado e não inoculado apresentaram maior similaridade em função da variedade. Na variedade IAC 4440 a similaridade entre esses dois tratamentos foi em torno de 45 % e na variedade IR 42 de 22 %. Estes resultados sugerem que a inoculação teve uma baixa influência sobre a comunidade de bactérias presentes no colmo das plantas. Entretanto, as principais respostas foram observadas no tratamento adubado, já que este tratamento apresentou baixa similaridade (< 10 %) nas duas variedades utilizadas (**Figura 21**).

No experimento de reinoculação (**Figura 22**), quando analisado o tratamento não inoculado (T1), inoculado acrescido da dose de 50 kg de N .ha⁻¹ (T8) e o reinoculado (T10), observou-se que a reinoculação (T10) apresentou uma similaridade menor que 20 % quando comparado com o tratamento adubado (T8) e menor que 10 % com o tratamento não inoculado (T1) para a variedade IAC 4440. Já na variedade IR 42, estes tratamentos agruparam entre si com similaridade de 40 a 45 %. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados no experimento de inoculação, onde a similaridade entre o tratamento inoculado e não inoculado foi baixa. Porém, a similaridade entre o tratamento reinoculado e não inoculado foi maior que o observado para o tratamento inoculado e não inoculado na variedade IR42, no experimento de inoculação. Na variedade IAC 4440 os valores de similaridade entre esses tratamentos foram menores que no experimento de inoculação.

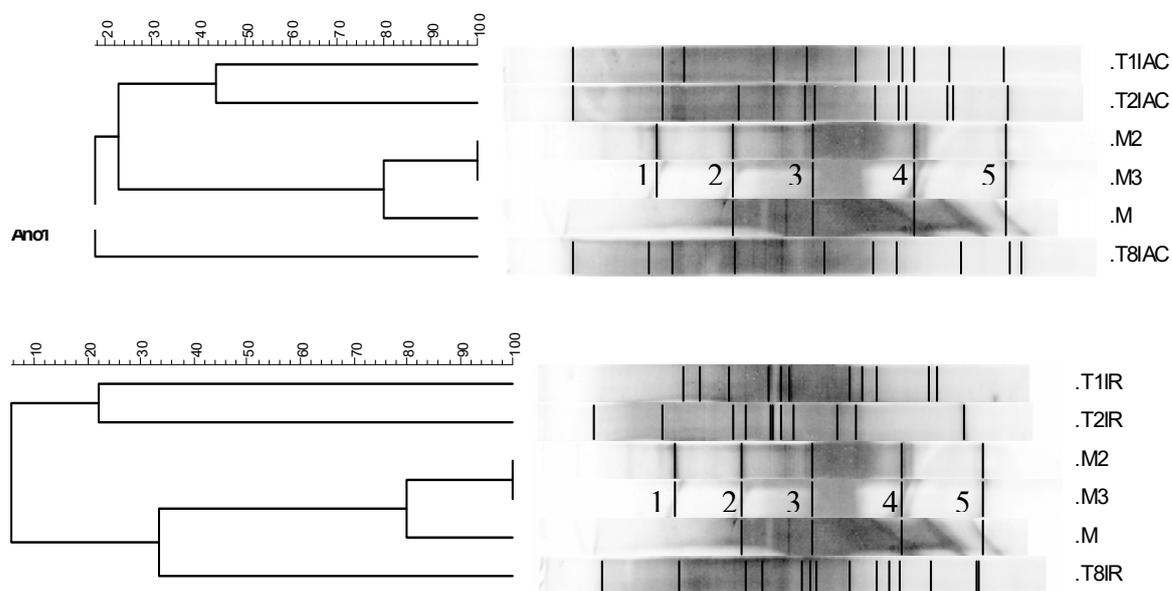


Figura 21: Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelComparII. Experimento de Inoculação. Legenda: Os números referem-se às bandas dos marcadores M, M2, M3: 1: estirpe HCC 103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, 2: estirpe HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*; 3: estirpe CbamC de *Azospirillum amazonense*; 4: estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*; 5: estirpe Ppe 8 de *Burkholderia tropica*; IR: variedade IR42; IAC: variedade IAC4440; T1: Não Inoculado; T2: Inoculado; T8: 50 kg de N . ha⁻¹.

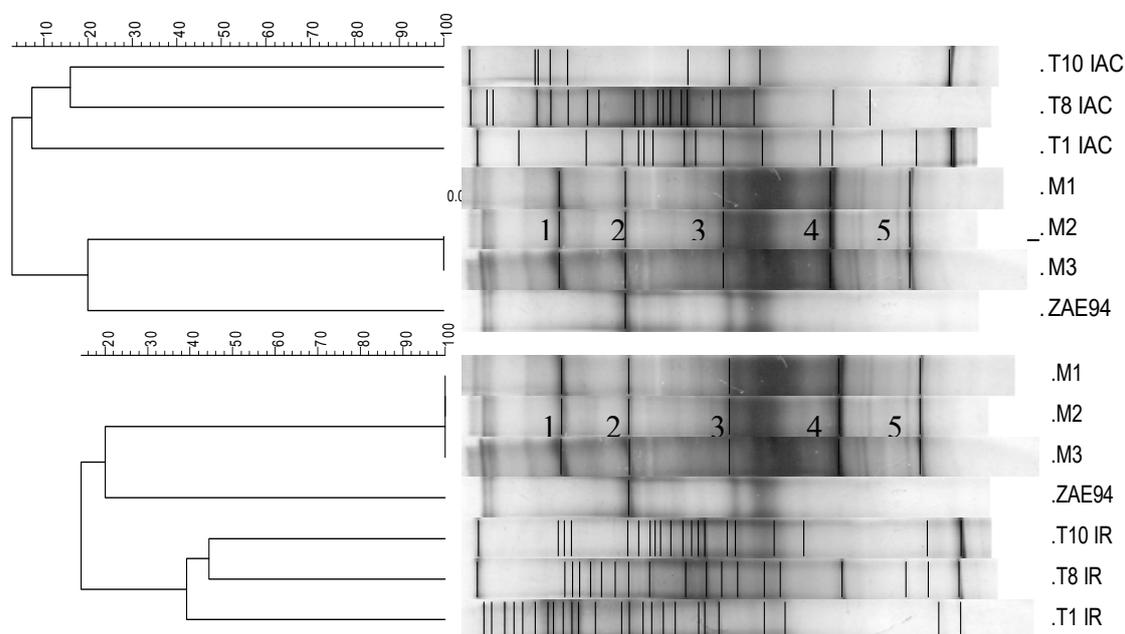


Figura 22: Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelComparII. Experimento de Reinoculação. Legenda: Os números referem-se às bandas dos marcadores M1, M2, M3: 1: estirpe HCC 103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, 2: estirpe HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*; 3: estirpe CbamC de *Azospirillum amazonense*; 4: estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*; 5: estirpe Ppe 8 de *Burkholderia tropica*; IR: variedade IR42; IAC: variedade IAC4440; T1: Não Inoculado; T10: Reinoculado.

Os resultados encontrados, neste trabalho, mostraram que o uso da técnica de DGGE foi superior à técnica de isolamento em meio de cultura, já que foi observada a ocorrência de um número considerável de bandas semelhantes à espécie de *H. seropedicae*. As técnicas de cultivo em meio de cultura, tradicionalmente utilizadas, no isolamento destas bactérias nem sempre é eficiente, já que apenas 10 % da população total destas bactérias podem ser cultivada (COWAN, 2000). Isto significa, que um grande número de bactérias, com grande potencial de utilização na agricultura, pode ainda não ter sido isolada. Além disso, algumas estirpes poderiam estar em estado não cultivável no ambiente, sendo então excluídas das análises (ROSADO, 2000).

Resultado semelhante foi encontrado por KUKLINSKY-SOBRAL et al. (2005), estes autores trabalhando com a diversidade de bactérias, através da técnica de DGGE e cultivo em meio de cultura, presentes no interior de tecidos de plantas de soja, cultivadas com e sem a aplicação de glifosato, verificaram diferenças nos gêneros isolados pelas duas técnicas. O que pode ser explicado em função das fontes de nutrientes utilizados pelo meio de cultura, e pelo fato de que na técnica de DGGE pode-se utilizar o DNA total extraído diretamente das plantas, não beneficiando grupos específicos de microrganismos. Estes autores também observaram a ocorrência do gênero *Herbaspirillum* quando utilizado a técnica de DGGE, porém não foi observado a presença deste gênero quando utilizado o isolamento em meio de cultura.

As diferenças observadas também podem ser devidas ao modo de colonização e estabelecimento da associação com a planta dos dois gêneros utilizados, já que o gênero *Herbaspirillum* tem capacidade de estabelecimento endofítico (SCHLOTTER et al., 1994; BALDANI, 1996; PERIN et al., 2003), colonizando preferencialmente tecidos vegetais internos, enquanto que *Burkholderia* coloniza mais superficialmente, com caráter rizosférico ou associativo indicando que esta bactéria coloniza provavelmente a rizosfera, e posteriormente, o interior das plantas (BALDANI, 1996). Outro fator que pode explicar as diferenças observadas entre as espécies é a seleção natural exercida pelos genótipos de arroz utilizados.

A técnica utilizada foi capaz de demonstrar uma ampla ocorrência de bactérias diazotróficas nos colmos das plantas de arroz utilizadas, o que corrobora com os resultados encontrados por BARRAQUIO et al. (1997). Entretanto, a técnica de DGGE não foi capaz de separar as estirpes de HRC 54 e ZAE94 de *Herbaspirillum seropedicae* nas condições testadas.

5- CONCLUSÕES

a) O pH não influenciou na sobrevivência da estirpe ZAE 94 durante o período de armazenamento de 180 dias.

b) Os resultados indicam que deve ser utilizado teor de umidade ao redor de 60 % para os inoculantes preparados com a turfa e bactéria diazotrófica utilizada neste trabalho.

c) A inoculação da estirpe ZAE 94 foi capaz de suprir até 50 kg de N .ha⁻¹ dependendo da cultivar utilizada.

d) Não foi observado efeito da reinoculação sobre os parâmetros estudados nas condições testadas, indicando que a inoculação deve ser feita em todos os plantios.

e) O estudo da diversidade mostrou que os genótipos de arroz e estirpe utilizados influenciaram a comunidade de bactérias presentes nas plantas de arroz.

f) O uso da técnica de DGGE mostrou uma ampla ocorrência de bandas na mesma altura da espécie *Herbaspirillum seropedicae*, mostrando que esta bactéria tem grande capacidade de colonizar a planta hospedeira.

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a sobrevivência das bactérias diazotróficas em veículo turfoso foi mantida por períodos de até 180 dias em geladeira, com população de bactérias diazotróficas ao redor de 10^9 células/g de turfa nas condições testadas. Entretanto, estudos com diferentes temperaturas de armazenamento devem ser considerados de modo a determinar a validade do produto em prateleira.

Os resultados mostraram também que a inoculação das bactérias diazotróficas em veículo turfoso, apresentou resultados estatisticamente iguais às testemunhas adubadas com 20 e 50 kg de $N \cdot ha^{-1}$, sugerindo então, que a inoculação pode suprir 20 $kg \cdot ha^{-1}$ ou mais de N, dependendo da variedade de arroz, bem como, das condições de plantio, como por exemplo, tipo de solo, clima, entre outros. Embora resultados promissores tenham sido obtidos neste trabalho e em muitos outros experimentos de inoculação, faz-se necessário ainda, para a recomendação e adoção da prática de inoculação em condições de campo, ensaios em diferentes regiões produtoras de arroz, além da utilização de cultivares adaptadas as estas condições regionais. O ideal é que o experimento seja conduzido por ciclos consecutivos da cultura.

A dosagem dos inoculantes turfosos foi em torno de 250 g de inoculante, com $10^9/10^{10}$ células/g de inoculante, para 20 kg de sementes de arroz, utilizando goma arábica com adesivo. O aumento da dosagem do inoculante nas sementes é uma estratégia interessante e deve ser considerada para aumentar a eficiência do processo de inoculação destas bactérias diazotróficas.

Os resultados encorajam os estudos de inoculação, bem como o isolamento e seleção de novas estirpes eficientes que possam ser utilizadas nas mais diferentes culturas de plantas não leguminosas. Vale lembrar, que uma redução mínima de 20 kg de $N \cdot ha^{-1}$, considerando a área plantada no Brasil com culturas como milho, trigo, cana-de-açúcar e arroz a economia com a aplicação de N seria na casa dos bilhões de reais ao ano.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROLINK. O portal do conteúdo Agropecuário. Acessado em 27 de agosto de 2007. Disponível na Internet: <http://www.agrolink.com.br/noticias/Noticialista.aspx>.

ALMEIDA, D.L.; SANTOS, G.A.; DE-POLLI, H.; CUNHA, L.H.; FREIRE, L.R.; SOBRINHO, N.M.B.A; PEREIRA, N.N.C; EIRA, P.A.; BLOISE, R.M. & SALEK, R.C. ARROZ (*Oryza sativa*). In: DE-POLLI, H. (Coordenador). **Manual de adubação e calagem para o estado do Rio de Janeiro**. Editora Universidade Rural, Seropédica, p. 93-94, 1988.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. V.25, p. 3389-3402, 1997.3

ALVES, G.C. **Efeito da inoculação de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do milho**. 2007, 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

ARAÚJO, A. C. B., **Inoculante oleoso e sobrevivência do rizóbio submetido à seca e a alta temperatura após a semeadura do feijoeiro**. 1993, 110f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1993.

BALDANI, J. I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz**. 1984, 110f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1984.

BALDANI, J. I.; DE AZEVEDO, M. S.; REIS, V.M.; DOS S. TEIXEIRA, K.R.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: Avanços e aplicações. In: Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (eds.), p. 621-666, 1999.

BALDANI, J. I; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen Fixation Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86-93, 1986.

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

BALDANI, V.L.D., OLIVEIRA, E., BALOTA, E., BALDANI, J.I., KIRCHHOF, G., DOBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 69, n. 1, p. 116, 1997.

BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 433-439, 1980.

BALDANI, V.L.D.; **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum spp.* no processo de colonização e infecção de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 1996, 223f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1996.

BARRAQUIO, W.L., LADHA, J.K., REVILLA, L. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil.** v. 194, p.15-24, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.

BOA SORTE, P. M. F.; OLIVEIRA, A. L. M.; SILVA, J. F. E BALDANI, J. I. **Estudo da Transmissibilidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas inoculadas em cana-de-açúcar crescidas sob condições de campo.** XXVII Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, XI Reunião Brasileira Sobre Micorrizas, IX Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, VI Reunião Brasileira de Biologia Do Solo – Fertbio – Bonito-MS, 2006.

BRASIL, M. da S. **Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz.** 2005, 105f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

BRASIL, M.S., BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo.** v.29, p. 179-190, 2005.

CAMPOS, B. C. de, Dose de inoculante turfoso para soja em plantio direto. **Revista Ciência Rural.** v. 29, n. 3, p. 423-426, 1999.

CAMPOS, B. C. de; GNATTA, V. Inoculantes e fertilizantes foliares na soja em área de populações estabelecidas de *Bradyrhizobium* sob sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v. 30, p. 69-76, 2006.

CAMPOS, B. C. de; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante Graminante na cultura do milho. **Revista Ciência Rural.**v 30, n. 4, p. 713-715, 2000.

CAMPOS, B. C. de; THEISEN, S.; GNATTA, V. Inoculante Graminate nas culturas de trigo e aveia. **Revista Ciência Rural.** v 29. p. 401-407, 1999.

CAMPOS, D. V-B. **Identificação de genótipos de arroz irrigado com potencial para fixação biológica do nitrogênio.** 1999, 94f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1999.

CARETTA, C.L. Dinâmica do Nitrogênio em Sistemas de Produção na Região Sul do Brasil. **Workshop Nitrogênio na sustentabilidade de sistemas intensivos de produção agropecuária,** pg. 32-50, Dourados-MS, 2000.

CAVALLET, L.E.; PESSOA, A.C. DOS S.; JAIME JOSÉ HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R. & CHARLES FABIANO OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum spp.* **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.1, p.129-132, 2000.

CHELIUS, M.K & TRIPLETT, E.W. The diversity of Archea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**.v. 41, p. 252-263, 2001.

COWAN, D.A. Microbial genomes – the untapped resource. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.18, p. 14-16, 2000.

CRESTE, S, NETO, AT, FIGUEIRA, A Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining . **Plant Molecular Biology Report** v. 19, p.299-306, 2001.

DA SILVA, J.G.; SERRA, G.E.; MOREIRA, J.R.; GONÇALVES,J.C.; GOLDEMBERG,J. Energy balance for ethyl alcohol production from crops. **Science**, V.210, p. 903-906, 1978.

DALLA SANTA, O.R, SOCCOL, C.R., JUNIOR, P.R., HERNÁNDEZ, R.H, ALVAREZ, G.L.M, DALLA SANTA, H.S. and PANDEY, A. Effects of inoculation of *Azospirillum sp.* in maize seeds under field conditions. **Food, Agriculture & Environment**, vol.2, n. 1, p. 238-242, 2004.

DALLA SANTA, O.R.; HERNÁNDEZ, R.H.; ALVAREZ, G.L.M.; JUNIOR, P.R. AND SOCCOL, C.R. *Azospirillum sp.* Inoculation in Wheat, Barley and Oats Seeds Greenhouse Experiments. **Brazilian archives of biology and technology** vol.47, n. 6, p. 843-850, 2004.

DELL'AMICO, E.; CAVALCA & ANDREONI, V. Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, p. 153-162, 2005.

DIDONET, A.D.; DIDONET, C.C.G.M E GOMES, G.F. Avaliação de Linhagens de Arroz de Terras Altas Inoculadas com *Azospirillum lipoferum* Sp59b e *A.brasilense* Sp245. **Comunicado Técnico 69**, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, 2003.

DIDONET, A.G.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.9, p. 645-651, 1996.

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

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Protocolo de extracción de ADN de plantas: Metodo CTAB para matrial vegetal fresco. **Phytochemical Bulletin**, vol 19 (1): 11-15, 1987.

DUARTE, G. F.; ROSADO, A. S.; SELDIN, L.; DE ARAUJO, W.; VAN ELSAS, J. D.Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 4, p. 1052-1062, 2001.

EL FANTROUSSI, S.; VERSCHUERE, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16s rna gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 3, p. 982-988, 1999.

FAGES, J.; MULARD, D. Isolement de bactéries rhizosphériques et effect de leur inoculation and pots chez *Zea mays*. **Agronomie**, Paris, v. 8, p. 309-315, 1988.

FENG, L.; ROUGHLEY, R.J.; COPELAND, L. Morphological Changes of Rhizobia in Peat Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1064-1070, 2002.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In...45a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, p.255-258, 2000.

FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de veículos para inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Revista Agronomia**, UFRRJ, v. 37, n. 2, p. 6-12, 2003.

FERREIRA, J.S. **Seleção e avaliação de veículos para inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz inundado**. 2004, 44f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do solo), Instituto de Agronomia, Departamenro de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.

GUIMARÃES, E.P.; SANT' ANA, E.P. Sistemas de cultivo. In: VIEIRA, N.R. de A. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 18-32, 1999.

GUIMARÃES, S.L. **Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral**. 2006, 88f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

GUIMARÃES, S.L. **Seleção de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas para inoculação em três cultivares de arroz inundado**. 2001, 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. & JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n.3, p. 393-398, 2007.

GUIMARÃES, S.L.; GRAÇA, C.O. DA; SILVA, R. A. DA; SANTOS, C.C.R. Dos; Baldani, V.L.D.; Baldani, J.I.& Dobereiner, J. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas na cultura de arroz sob condições de campo. **Fertbio98**. Interrelação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas: Consolidando um Paradigma. Caxambu, 11 a 16 de Outubro, Resumo 737, p. 791, 1998.

HEUER, H., SMALLA, K., Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), **Modern Soil Micro-biology**, Marcel Dekker, New York, pp. 353-373, 1997.

HEUER, H.; KROPPESTEDT, R. M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1325-1335, 2002.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.E. Fixação biológica do nitrogênio com a cultura de soja. **Workshop Nitrogênio na sustentabilidade de sistemas intensivos de produção agropecuária**, pg. 51-75, Dourados-MS, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **IBGE**, 2006. Acesso em 28 de outubro de 2006. Disponível na Internet: <http://www.ibge.gov.br>.

JULIANO, B. O. **Polysaccharides, proteins and lipids of rice**. In: JULIANO, B. O. (Ed.). *Rice: chemistry and technology*. 2nd ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. p. 59-175, 1985.

KREMER, R. J.; PETERSON, H. L. Effect of inoculant carrier on Survival of Rhizobium on inoculated seed. **Soil Science**, Baltimore, v.134, n. 2, p.117-125, 1982.

KREMER, R. J.; PETERSON, H. L. Effect of inoculant carrier on Survival of Rhizobium on inoculated seed. **Soil Science**, Baltimore, v.134, n. 2, p.117-125, 1982.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, v. 273, p. 91–99, 2005.

KUMAR, S.; TAMURA, K & NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, p150-163, 2004.

KUNDU, D. K.; LADHA, J. K. Efficient management of soil and biologically fixed nitrogen in intensively cultivated rice fields. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, n. 4/5, p. 431-439, 1995.

MAJOR FOOD AND AGRICULTURAL COMMODITIES AND PRODUCERS. **FAO**, 2004. Capturado em 19 dez. 2005. Online. Disponível na internet: <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.jsp?commodity=236&lang=EN&year=2004>.

MELO, J.L. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Embrapa-CNPMA, 1998, p. 87-116.

MOREIRA, M.F.; KLUGE, R.A. **Arroz**. In: CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R. A. (Eds) *Ecofisiologia de cultivos anuais: Trigo, Milho, Soja e Mandioca*. São Paulo, Nobel, 1999.

MUELLER-DOMBOIS, D. & ELLEMBERG, H. **Aims and methods of vegetation ecology**. New York, John Wiley, 1974.

MUYZER, G, SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, n. 1, p.127-141, 1998.

MUYZER, G., HOTTENTRÄGER, S., TESKE, A., WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA: A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J. (Eds.), **Molecular Microbial Ecology Manual**, 3.4.4, Kluwer, Dordrecht, pp. 1–27, 1996.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

MYERS, R.M.; MANIATIS, T.; LERMAN, L.S. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. **Methods in Enzymology**, v.155, p.501-527, 1987.

NISHI, C.Y.M.; HUNGRIA, M. Efeito da reinoculação na soja [*Glycine max* (L.) Merrill] em um solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* com as estirpes SEMIA 566, 586, 587, 5019, 5079 E 5080. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, n.5, p. 359-368, maio 1996.

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

OLIVARES, F. L., BALDANI, V. L. D., REIS, V. M, BALDANI, J. I., DÖBEREINER, J., Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Graminae. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, p.197-200, 1996.

OLIVARES, F.L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum sp. híbrido*) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. 1997, 353f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1997.

OLIVARES, F.L.; JANES, E.K.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Colonization of vascular tissue by *Herbaspirillum* spp. in Sorghum and sugar cane, **Fitopatologia Brasileira**, V.18, p.313, Suplemento n.290, 1993.

OLIVEIRA, E. **Estudo da associação entre bactérias diazotróficas e arroz irrigado**. 1994, 96f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1994.

OSBORNE, C.A ; GALIC, M.; SANGWAN, P. & JANSSEN, P.H. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**. V. 248 p. 183–187, 2005.

PERIN, L., BALDANI, J.I., REIS, V.M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39,n. 8, p.763-770, 2004.

PERIN, L.; SILVA, M.F. DA; FERREIRA, J.F.; CANUTO, E.L.; MEDEIROS, A.F.A.; OLIVARES, F.L.; REIS, V. M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de

estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia**, v. 37, p. 47-53, 2003.

PIMENTEL, C. **Metabolismo do Carbono na Agricultura tropical**. Ed. EDUR, 1998, 159p.

PINZAN, N.R. **Manual técnico das culturas**. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Departamento de Extensão Rural. Centro de Adaptação e Transferência de Tecnologia da Produção Vegetal, Campinas, p. 81-99, 1986.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Amsterdam v. 151, n. 3 p.167–177, 2000.

REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO DE ESTIRPES. **RELARE**. 2006, Capturado em 28 de outubro de 2006. Disponível na Internet: <http://www.relare.org.br>

REIS JÚNIOR, F.B., SILVA, L.G., REIS, V.M., DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.35, p. 985-994, 2000.

REIS JÚNIOR, F.B.; REIS, V.M. & TEIXEIRA, K.R. S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v .41, n .3, 2006.

REIS, Jr.; SILVA, L.G. da; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J., Ocorrência de Bactérias Diazotróficas em diferentes Genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.5, p. 985-994, 2000.

REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Improved methodology for endophytic habitat. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.10, p.401-405, 1994.

REIS, V.M.; O, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L. & BALDANI, J.I. **Fixação Biológica de Nitrogênio Simbiótica e Associativa**. In: FERNANDES, M.S. (Ed) **Nutrição Mineral de Plantas**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa-MG,. p. 153-174, 2006.

RELARE, Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola, Protocolo para Análise de Inoculantes, Estirpes e outras Tecnologias Relacionadas ao Processo de Fixação Biológica do Nitrogênio em Plantas não Leguminosas, **X RELARE**, maio de 2004.

RICCI, M. DOS S. F.; COSTA, J.R.; REIS, V.M.; DA SILVA, M.F. E RODRIGUES, L.F.da C. Promoção de Crescimento de Mudas de Café (*Coffea arabica*) Inoculadas com *Azospirillum brasilense* Estirpe Cd. **Circular Técnico 11**, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, 6p., 2005.

RODRIGUES, L. da S. **Estudo da diversidade de bactéria diazotróficas endofíticas associadas a variedades de arroz inundado**. 2003, 84f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2003.

RONCHI, A.L.; BALETTI, A. Production of inoculants. In: BALATTI, A.; JARDIM FREIRE, J.R. **Legume inoculants. Selection and characterization of strains. Production, use and management**. Ed. 6, n° 221, La Plata. Buenos Aires, Argentina, p.39-47, 1996.

ROSADO, A.S. Diversidade e ecologia de microrganismos do solo. In: XXII Reunião Brasileira de Fertilidade e Nutrição de Plantas, VII Reunião Brasileira sobre Micorrizas, V Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, II Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 2000, Santa Maria. **Anais...**, Santa Maria: UFSM, 2000. CD-ROM.

ROUGHLEY, R.J. Some factors influencing the growth and survival of the root nodule bacteria in peat culture. **The Journal of Applied Bacteriology**. v. 31, p. 259-265, 1968.

SCHLOTTER, M.; BODE, W.; HARTMANN, A. & BEESE, F. Sensitive chemoluminescence-based immunological quantification of bacteria in soil extracts with monoclonal antibodies. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, n. 5, p. 399-403, 1992.

SILVA, R. A. da. **Caracterização anatômica da interação entre bactérias diazotróficas endofíticas e plântulas de arroz** (*Oryza sativa*). 2001, 82f., Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M.S. (Ed) **Nutrição Mineral de Plantas**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa-MG, 2006. p. 215-252.

STEIBORN, J.; ROUGHLEY, R.J. Toxicity of sodium and chloride ions to *Rhizobium* spp. in broth and peat culture. **The Journal of Applied Bacteriology**. v.39, n° 2, p.133-138, 1975.

SUMNER, M.E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Sciences**, New York, v. 12, p. 54-123, 1990.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Assimilação de Nutrientes. In: TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3a edição. Porto Alegre-RS, ed. Artmed, p. 286-298, 2004.

TEDESCO, M. J. **Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de planta por H₂O₂-H₂SO₄**. UFRGS. (Informativo Interno, 1), 1982. 23p.

THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Influence of size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.19-28, 1991.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. V.22, p. 4673-4680, 1994.

VALENTIM, J.L. **Ecologia numérica: uma introdução a análise multivariada de dados ecológicos**. Rio de Janeiro, Interciência, 2000.

VARGAS, M.A.T.; MENDES, I. de C.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica de nitrogênio. In: Simpósio sobre a cultura da soja nos cerrados, 1., Uberaba. **Anais...**Piracicaba: POTAFOS, p.159-182,1992.

VICENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria.** International Biological Programme handbook, n. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England. p. 113-131, 1970.

VIDEIRA, S.S.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Identity and genetic variability of isolates of nitrogen-fixing bacteria associated rice (*Oryza sativa*). In: 22nd Latin-american Conference on Rhizobiology and 1st Brazilian Conference on Biological Nitrogen Fixation. **Book Abstracts.** p. 69, 2004.

WAKELIN, S.A.; COLLOFF, M.J.; HARVEY, P.R.; MARSCHNER, P.; GREGG, A.L. & ROGERS, S.L. The effects of stubble retention and nitrogen application on soil microbial community structure and functional gene abundance under irrigated maize. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, p. 661-670, 2007.

WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology.** V. 52, p. 659-688, 2001.

WU, P.; ZHANG, G.; LADHA, J.K.; MCCOUCH, S.R.; HUANG, N. Molecular-marker-facilitated investigation on the ability to stimulate N₂ fixation in the rhizosphere by irrigated rice plants. **Theoretical Applied Genetics**, n.91, p.1177-1183, 1995.

ZILLI, J. **Avaliação do impacto de herbicidas à base de Glyphosate e imazaquin na comunidade bacteriana do solo e associada às raízes de plantas de soja.** 2004, 114f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.

8- APÊNDICE

Meios de cultura e soluções utilizados (composição por litro)

Meio de cultura JNFb

5,0g	ácido málico
0,6g	K ₂ HPO ₄
1,8g	KH ₂ PO ₄
0,2g	MgSO ₄ .7H ₂ O
0,1g	NaCl
0,2g	CaCl ₂ .2H ₂ O
2mL	solução de micronutrientes*
2mL	azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)
4mL	FeEDTA (solução 1,64%)
1mL	solução de vitaminas**
4,5g	HOH

Ajustar o pH para 5,8 com KOH e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Adicionar 1,9g e 17g de agar/L para meio semi-sólido e sólido respectivamente. Ao meio sólido adicionar 20mg de extrato de levedura.

NFb sólido (3 vezes)

Ácido málico		5 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10 %	6 mL
Mg SO ₄ .7H ₂ O	sol. 10 %	2 mL
NaCl	sol. 10%	1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol. 1 %	2 mL
FeEDTA	sol. 1,4 %	4 mL
Azul de bromotimol, solução 0,5 % em 0,2 N de KOH		6 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
KOH		4,5 g
Extrato de levedura		20 mg

Completar para 1 L com água destilada.

Ajustar o pH para 6,5 a ou 6,8 com NaOH e completar o volume para 100 mL.

Adicionar 15 g de agar.

DYG'S

Glicose	2,0 g
Ácido málico	2,0 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Ácido glutâmico	1,5 g
Água destilada	1000 mL
pH 6,0 para <i>Herbaspirillum</i> .	
pH 5,5 para <i>Burkholderia</i>	

* - Solução de micronutrientes

0,04g	CuSO ₄ .5H ₂ O
1,20g	ZnSO ₄ .7H ₂ O
1,40g	H ₃ BO ₃
1,00g	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
1,75g	MnSO ₄ .H ₂ O

Completar o volume para 1000mL com água destilada.

** - Solução de vitaminas

10mg	de biotina
20mg	de piridoxol – HCl

Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100mL com água destilada e manter a solução em geladeira.

Ajustar o pH para 4,2-4,5 com KOH e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Adicionar 1,6g e 25g de agar/L para meio semi-sólido e sólido respectivamente. Ao meio sólido adicionar 100mg de extrato de levedura.

Solução salina para diluição

3,4g	KH ₂ PO ₄
0,2g	MgSO ₄ .7H ₂ O
0,1g	NaCl
0,02g	CaCl ₂ .2H ₂ O
2mL	solução de micronutrientes
4mL	FeEDTA (solução 1,64%)
4,5g	KOH

Ajustar o pH para 7,0 com KOH e completar o volume para 1000mL com água destilada.