

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz  
(*Oryza sativa* L.) em associação com bactérias  
diazotróficas endofíticas**

**Daniele Cristina Costa Sabino**

**2003**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS DE ARROZ**  
**(*Oryza sativa* L.) EM ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS**  
**DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS**

**DANIELE CRISTINA COSTA SABINO**

*Sob a orientação do Dr.*

**José Ivo Baldan**

*e Co-orientação da Dra.*

**Vera Lúcia Divan Baldani**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de “**Mestre em**  
**Ciências**” em Fitotecnia, Área de  
Concentração em Fisiologia da  
Produção

**Seropédica, RJ**  
**Fevereiro de 2003**

633.18 Sabino, Daniele Cristina Costa, 1979-  
S116m Metabolismo de nitrogênio em plantas de  
T arroz (*Oryza sativa* L.) em associação com  
bactérias diazotróficas endofíticas /  
Daniele Cristina Costa Sabino. - 2003.  
52f. : grafs., tab.

Orientador: José Ivo Baldani.

Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto  
de Agronomia.

Bibliografia: f. 40 - 47.

1. Arroz - Cultivo - Teses. 2. Nitrogênio  
- Fixação - Teses. 3. Microorganismos  
fixadores de nitrogênio Teses. 4. Plantas -  
Efeito do nitrogênio - Teses. I. Baldani,  
José Ivo, 1953- II. Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Instituto de  
Agronomia. III. Título.

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

**DANIELE CRISTINA COSTA SABINO**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Produção Vegetal, como requisito parcial para obtenção do grau de “**Mestre em Ciências**”, em Fitotecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/02/2003.

---

José Ivo Baldani (Ph.D.) Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Manlio Silvestre Fernandes (Ph.D.) UFRRJ

---

Bruno José Rodrigues Alves (Ph.D.) Embrapa Agrobiologia

## **O SEGREDO DA EXPANSÃO ESTÁ NA FORTE VONTADE DE CRESCER**

Existe um único ponto de vital importância. É a forte vontade de crescer e expandir custe o que custar. Esta atitude é fundamental. O pior pensamento a seu próprio respeito é achar que “não tenho capacidade”. Pense: “Eu também sou um ser humano. Se aquela pessoa está fazendo, eu também serei capaz de fazer”.

A pessoa que nunca desiste, com uma forte determinação para realizar o seu trabalho – mesmo que seja ridicularizada pelos outros – certamente crescerá bastante. Eu próprio trabalho com esta atitude. Porém aquela que desiste após o primeiro fracasso não serve, de fato, para o trabalho.

Há um provérbio que diz: “A resignação é importante”. Em algumas circunstâncias isso é verdadeiro mas, neste caso, “a não resignação é fundamental”. Portanto, deve-se desistir quando a causa não for boa e, pelo contrário, ter forte determinação para as boas causas.

Mokiti – Okada

“As coisas mais importantes são as mais difíceis de se expressar. São coisas das quais você se envergonha, pois as palavras as diminuem – as palavras reduzem as coisas que pareciam ilimitáveis quando estavam dentro de você à mera dimensão normal quando são reveladas. Mas é mais que isso, não? As coisas mais importantes estão muito perto de onde o seu segredo está enterrado, como pontos de referência para algum tesouro que seus inimigos adorariam roubar. E você pode fazer revelações que lhe são muito difíceis e as pessoas o olharem de maneira esquisita, sem entender nada do que você disse nem porque eram tão importantes que você quase chorou enquanto estava falando. Isso é o pior, eu acho. Quando o segredo fica trancado lá dentro não por falta de um narrador, mas de alguém que compreenda”.

Trecho extraído do livro “Outono da Inocência”,  
de Stephen King.

***In memoriais* de meu pai,**  
**Albino da Silva.**

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

### **A Deus:**

“Por que razão o homem nasce? Enquanto não compreender isso, o homem não poderá ter comportamento correto nem verdadeira tranquilidade, estando sujeito a levar uma vida vazia e ociosa.”

Meishu-Sama

Obrigada por guiar a minha vida nesta estrada que venho seguindo. A estrada é longa e por muitas vezes sinuosa, mas sigo ao encontro de Sua Luz. Que cada dia da minha vida possa ser útil na materialização da minha missão.

**À Odette Costa Sabino (*In memoriais*):** Vó, esta conquista não é só minha. Sei que mesmo de longe você está comigo.

**À Solange:** Todos esses anos foram muito longos, quantas dificuldades passei, por vezes achei que ia desistir...mas a cada fraqueza, a cada escorregão, sabia que você estava torcendo por mim, comemorando a cada vitória. Mãe, obrigada por ter sido a base do meu caminhar, por orientar os meus primeiros passos para que eu pudesse seguir ao longo dessa caminhada.

**À Ana e Marcio:** Eu sei que não deve Ter sido fácil me aturar, afinal eu estava “fazendo minha Tese”! Valeu pela paciência, maninhos!

**Ao Min. Marcos Lopes:** Muito mais do que me “ensinar a pescar”, por quantas vezes me carregaste no colo, quantas vezes um merecido “puxão de orelha”. Mil palavras não demonstrarão minha gratidão, mas acima de tudo: Obrigado por ser minha bússola durante a tempestade!...

**À Dra. Vera Baldani:** Orientadora, mestre, mãe e amiga! Obrigada pela paciência e pela dedicação ao longo destes 4 longos anos (iniciação e mestrado), mas tenho que dizer que, goste ou não, pelos próximos 4 anos (doutorado), você terá a minha companhia Obrigada, Vera!

**Ao Dr. José Ivo Baldani:** Obrigado por ter me acolhido e me orientado até os últimos momentos.

**Ao Dr. Bruno Alves:** A interpretação dos resultados não foi fácil, mas em nenhum momento você perdeu a paciência e a vontade de me ajudar. Obrigada pela preciosa colaboração!

**À Prof. Sônia Regina e ao Prof. Manlio Fernandes:** Obrigada pelo ensino das metodologias.

**Aos meus grandes amigos de turma (Agronomia 96/1):** Claudemar (Clóvis), Denis, Élide (Edinha), Marcio Piratello, Nicomedes (Nico), Rejane (Janes), Salomão (Baiano)\*, Viviane (Vivica), Wilson (Maranhão)! Foram cinco longos anos, e não será aqui em tão poucas linhas que vou resumir a saudade que sinto. Que Deus permita que não desistamos de nossos sonhos. Amo vocês!

\*Baiano, você sempre quis ser desta turma, pelo menos no meu coração você sempre será.

**Ao Wagner Sebastian:** Obrigada pela paciência e carinho, principalmente nestes 2 últimos anos. E, meu amor, esteja preparado para os próximos 4 anos. Te amo!

**A Janes, Patrícia, Vivica e Nico:** Estes 2 últimos anos foram maravilhosos. A *casa no 49*, as festas e, como faz parte, os estresses de cada um com suas respectivas teses. Foi difícil, mas conseguimos!

**Ao José Marcos:** “Tem pessoas que a gente não esquece nem se esquecer, o primeiro namorado, uma estrela da tv, personagens do meu memórias que um dia rasguei do meu cartaz, entre todas as novelas e romances de você me lembro mais”.

**À Viviane Aguiar:** Poucos pessoas conseguiram me aturar por tanto tempo, mas uma grande amizade resiste a tudo. Valeu, Vi!

**Ao pessoal do laboratório de Gramíneas:** Obrigada pelo apoio e ajuda nos experimentos e análises! Especialmente ao Joilson, Marcela e Salomão, valeu por toda ajuda e companheirismo!

**À galera do alojamento da Embrapa:** Apesar dos pouco tempo que eu fiquei no alojamento, foram momentos muito alegres e inesquecíveis. Marinete, valeu por dividir e me aturar no quarto!

**Ao pessoal da casa de vegetação:** Valeu pelo apoio com os meus “poucos” vasos e experimentos!

**Aos “meninos da limpeza”:** Quantas noites e noites no laboratório, noites que se tornaram alegres graças a vocês.

**Às instituições:** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRuralRJ) e Embrapa Agrobiologia

**À CAPES:** Pela bolsa de estudo concedida.

**A todos** que ao longo de minha vida, de uma maneira ou de outra, contribuíram para que hoje eu realizasse esta conquista. Muito Obrigada!



## **BIOGRAFIA DA AUTORA**

Nascida aos 14 dias do mês de abril de 1979, no bairro de Santa Cruz, na cidade do Rio de Janeiro – RJ, filha de Solange Costa Sabino e Albino da Silva, concluiu em 1995, o ensino médio no Colégio Estadual Barão do Rio Branco. Em 1996, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRuralRJ), onde foi bolsista de iniciação científica do CNPq de março de 1999 a fevereiro de 2001, quando obteve a titulação de Engenheira Agrônoma. Logo em seguida, iniciou o curso de Mestrado em Fitotecnia desta instituição, sendo seu trabalho desenvolvido na Embrapa Agrobiologia-CNPAB, sob orientação do Dr. José Ivo Baldani e da Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Divan Baldani. Em janeiro de 2003, foi aprovada para o curso de doutorado em Agronomia, área de concentração Ciência do Solo, da UFRuralRJ.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>2</b>
1.1 Cultura do arroz .....	2
1.2 Nitrogênio .....	3
1.3 Relações entre o metabolismo de carbono e nitrogênio .....	6
1.4 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) .....	8
1.5 Fixação Biológica e metabolismo de nitrogênio .....	10
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
2.1 Cultivares utilizadas .....	12
2.2 Experimento em condições de vasos .....	12
2.3 Determinações .....	13
2.3.1 Contagem do Número Mais Provável de bactérias .....	13
2.3.2 Acúmulo de matéria seca .....	13
2.3.3 Conteúdo de nitrogênio .....	13
2.3.4 Extração alcóolica .....	14
2.3.5 Nitrato .....	14
2.3.6 Aminoácidos livres .....	14
2.3.7 Açúcares solúveis .....	14
2.3.8 Análise estatística .....	15
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>16</b>
3.1 Contagem do Número Mais Provável de bactérias diazotróficas .....	16
3.2 Produção de matéria seca .....	19
3.3 Percentagem de nitrogênio .....	21
3.4 Acúmulo total de nitrogênio .....	23
3.5 Compostos nitrogenados .....	24
3.5.1 Nitrato .....	24
3.5.2 Aminoácidos livres .....	28
3.5.3 Açúcares solúveis .....	32
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>37</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>38</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>
<b>7 ANEXO .....</b>	<b>48</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Análise química do solo Planossolo .....	12
<b>Tabela 2:</b>	Contagem do número de bactérias diazotróficas crescidas nos meios JNFb e JMV, presentes em raiz e parte aérea das cultivares de arroz IR42 e IAC4440, no período vegetativo, sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	17
<b>Tabela 3:</b>	Contagem do número de bactérias diazotróficas crescidas nos meios JNFb e JMV, presentes em raiz e parte aérea das cultivares de arroz IR42 e IAC4440, no período de florescimento, sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	18

## ÍNDICES DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Variações na temperatura e insolação durante o ano de 2002. As coletas foram realizadas durante os meses de Maio, Junho e Julho. Dados obtidos do Inmet/Pesagro-RJ .....	12
<b>Figura 2:</b>	Peso da matéria seca (g/planta) da parte aérea das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	19
<b>Figura 3:</b>	Peso da matéria seca (g/planta) da parte aérea das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	20
<b>Figura 4:</b>	Percentagem de nitrogênio (%N) da parte aérea das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	21
<b>Figura 5:</b>	Percentagem de nitrogênio (%N) da parte aérea das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	22
<b>Figura 6:</b>	Acúmulo total de nitrogênio (N-Total) da parte aérea das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	23
<b>Figura 7:</b>	Acúmulo total de nitrogênio (N-Total) da parte aérea das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	24
<b>Figura 8:</b>	Teor de nitrato ( $\mu$ moles/g de matéria fresca) presente nas raízes das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	25
<b>Figura 9:</b>	Teor de nitrato ( $\mu$ moles/g de matéria fresca) presente nas folhas das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	26

<b>Figura 10:</b>	Teor de nitrato ( $\mu\text{moles/g}$ de matéria fresca) presente nas raízes das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	27
<b>Figura 11:</b>	Teor de nitrato ( $\mu\text{moles/g}$ de matéria fresca) presente nas folhas das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	28
<b>Figura 12:</b>	Teor de aminoácidos livres ( $\mu\text{moles/g}$ de matéria fresca) presente nas raízes das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	29
<b>Figura 13:</b>	Teor de aminoácidos livres ( $\mu\text{moles/g}$ de matéria fresca) presente nas folhas das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	30
<b>Figura 14:</b>	Teor de aminoácidos livres ( $\mu\text{moles/g}$ de matéria fresca) presente nas raízes das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	31
<b>Figura 15:</b>	Teor de aminoácidos livres ( $\mu\text{moles/g}$ de matéria fresca) presente nas folhas das cultivares de arroz 1842 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	32
<b>Figura 16:</b>	Teor de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles/g}$ de matéria fresca) presente nas raízes das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	33
<b>Figura 17:</b>	Teor de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles/g}$ de matéria fresca) presente nas folhas das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	34
<b>Figura 18:</b>	Teor de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles/g}$ de matéria fresca) presente nas raízes das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	35
<b>Figura 19:</b>	Teor de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles/g}$ de matéria fresca) presente nas folhas das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições .....	36

## RESUMO

SABINO, Daniele Cristina Costa. **Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas**. Seropédica: UFRRJ, 2003. 65p. (Dissertação, Mestrado em Fitotecnia).

O arroz (*Oryza sativa* L.) é colonizado por bactérias diazotróficas que, podem atuar como promotoras de crescimento das raízes, assim como melhorar a nutrição da planta através do N<sub>2</sub> fixado biologicamente. No entanto, estas associações podem modificar a fisiologia das plantas, uma vez que as bactérias diazotróficas para fixarem o nitrogênio necessitam de carboidratos e outros componentes, competindo, deste modo, com as plantas hospedeiras. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas "*Burkholderia brasilensis*" e *Herbaspirillum seropedicae* no metabolismo de nitrogênio de duas cultivares de arroz adubadas ou não com nitrogênio mineral. Um experimento em condições de vasos foi realizado na área experimental da Embrapa Agrobiologia com as cultivares de arroz IR42 e IAC4440. A inoculação consistiu no uso das estirpes ZAE94 de *Herbaspirillum seropedicae*, e M130 de "*Burkholderia brasilensis*", a mistura destas duas estirpes e da testemunha (controle não inoculado). A adubação na forma de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, foi aplicada nas concentrações de 0, 40 e 80 kgN/ha. As coletas foram realizadas no período vegetativo (45 dias) e no florescimento (de acordo com o ciclo de cada cultivar). Os parâmetros avaliados foram a presença das bactérias nos tecidos das plantas, o acúmulo de matéria seca da parte aérea, o acúmulo de N, e a concentração dos compostos nitrogenados na planta. Os resultados mostraram que não houve diferenças nas populações das bactérias em função da inoculação, porém, o número de bactérias na raiz foi ligeiramente maior do que na parte aérea. Foi também observado uma redução na população no período de florescimento, em relação ao período vegetativo. De um modo geral, a cultivar IR42 apresentou maiores respostas à inoculação, quando comparada com a cultivar IAC4440. O acúmulo de matéria seca da cultivar IR42 no período vegetativo, variou com a inoculação e a dose de nitrogênio aplicada. Porém, a percentagem de nitrogênio (%N) acumulada na parte aérea destas plantas, foi maior nos tratamentos inoculados com a estirpe ZAE94, independente da dose de nitrogênio aplicada. As plantas que receberam 40 kgN/ha e foram inoculadas com a mistura, apresentaram as maiores concentrações de nitrato, aminoácidos livres e açúcares solúveis na parte aérea. Os resultados obtidos sugerem que a inoculação das bactérias diazotróficas modifica o metabolismo de nitrogênio e que este efeito foi diferenciado em função da variedade e da dose de nitrogênio aplicada.

**Palavras chave:** Fixação Biológica de Nitrogênio, inoculação, metabolismo de nitrogênio.

## ABSTRACT

SABINO, Daniele Cristina Costa. **Nitrogen metabolism in rice plants (*Oryza sativa*, L.) inoculated with endophytic diazotrophic bacteria.** Seropedica: UFRRJ, 2003. 65p. (Dissertation, Master Science in Crop Science).

Rice is colonized by diazotrophic bacteria that can act as root growth promoting, as well as to increase plant nutrition through the biological nitrogen fixation process. These associations can modify the plant physiology since they compete for carbohydrate and other compounds necessary to host plants. The aim of this work was to evaluate the influence of the endophytic diazotrophic bacteria, "*Burkholderia brasilensis*" and *Herbaspirillum seropedicae* on nitrogen metabolism of two rice cultivars (IR42 and IAC4440). The experiment was carried out in pots containing 3 kg of soil, fertilized with 3 nitrogen levels (0, 40, and 80 kg N) as  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and three inoculation treatments (*H. seropedicae* (ZAE94), *B. brasilensis* (M130) and the mixture of both). The plants were harvested at vegetative (45 days of inoculation) and flowering stages (according to the cycle of each cultivar). Bacterial counting, dry matter, N content and the concentration of nitrogen compounds were measured at each harvest. The results showed no statistical differences on bacterial counting. The number of root bacteria was higher than in shoots. A population reduction occurred on the flowering stage as compared to vegetative one. Cultivar IR42 responded to inoculation more noticeably than IAC4440. The dry matter accumulation of the IR42 cultivar at the vegetative stage varied with inoculation and nitrogen dose applied. This cultivar accumulated higher amounts of nitrogen when inoculated with ZAE94 strain, independent of the nitrogen applied. Concentrations of nitrate, free amino acid and soluble sugar in the aerial parts were higher in plants fertilized with 40kgN/ha and inoculated with the mixture of bacteria. These results suggested that the diazotrophic bacteria inoculation could modify the plants nitrogen metabolism and these effects were variable according to the rice cultivars and nitrogen fertilization level applied.

**Key words:** Biological Nitrogen Fixation, inoculation, nitrogen metabolism.

## INTRODUÇÃO

O arroz é uma espécie hidrófila que, em função do seu processo evolutivo, é capaz de se adaptar às mais variadas condições ambientais (VIEIRA, 1999). Depois da água, o nitrogênio é o fator mais crítico para o crescimento desta cultura (OLIVEIRA, 1994) e neste sentido, as alternativas que visem aumentar a disponibilidade de nitrogênio, e diminuir a dependência dos adubos nitrogenados, tem sido amplamente pesquisadas. O grande desafio para a pesquisa é aumentar a participação da fixação biológica de nitrogênio (FBN) nos sistemas produtivos, garantindo-lhes a produtividade e a auto sustentabilidade.

Embora a contribuição do processo de FBN já esteja sendo estudado, o processo fisiológico da associação entre bactérias diazotróficas e plantas de arroz ainda não está bem esclarecido. Em 1993, o IRRI traçou metas de longo prazo, visando tornar a cultura do arroz autosustentável em relação ao nitrogênio, através da fixação deste elemento pelas bactérias diazotróficas que se associam a esta cultura. Esse processo deu origem a quatro possibilidades. Segundo FISCHER (2000), essas metas são: i) associações não nodulares – melhorar as associações entre arroz e bactérias diazotróficas do solo, pela obtenção de estirpes adequadas na infecção e colonização de raízes de arroz; ii) associações nodulares (como em leguminosas) colocando como suporte para a engenharia de plantas de arroz capazes de “nodulação” – essa abordagem inclui a identificação de estirpes de *Rhizobium* e variedades de arroz compatíveis e examinando as respostas defensivas do arroz, para evitar respostas que poderiam inibir a simbiose ou o processo de fixação; iii) transferência de genes *nif* – transformar plantas de arroz com genes *nif* para assegurar a expressão da nitrogenase, proteção da nitrogenase pela inativação do oxigênio, e uma energia suplementar para fixação de N<sub>2</sub> sem comprometer a produção da cultura; iv) fixação de CO<sub>2</sub> e eficiência no uso de N aumentar o conhecimento do metabolismo de N em arroz e o impacto da fixação de N<sub>2</sub> sobre o balanço de carbono e acúmulo de energia.

Entretanto, estas associações podem alterar a fisiologia da planta. A atividade da nitrato redutase da parte aérea de plântulas de trigo inoculadas com estirpes mutantes de *Azospirillum brasilense*, deficientes na atividade da nitrato redutase, foi maior do que a das plantas controle (FERREIRA et al., 1987). OLIVARES et. al. (2002), em experimento com cana-de-açúcar em condições axênicas, verificou que durante a fase inicial do estabelecimento endofítico das bactérias *Herbaspirillum seropedicae* e *Glucanoacetobacter diazotrophicus*, houve um aumento na atividade da -ATPase, comparada com o controle não-inoculado, que estavam relacionados com o aumento na absorção de nutrientes e mudanças na fisiologia das plantas inoculadas.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da inoculação das bactérias diazotróficas *Herbaspirillum seropedicae* e “*Burkholderia brasilensis*”, no metabolismo de nitrogênio das cultivares de arroz IR42 e IAC4440, contrastantes quanto ao potencial de fixação biológica de nitrogênio.



## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Cultura do arroz

O arroz, uma monocotiledônea da família *Poaceae*, pertence ao gênero *Oryza*, que tem cerca de 20 espécies conhecidas. A espécie *Oryza sativa*, à qual pertence a grande maioria das variedades cultivadas no mundo, originou-se no sudoeste da Ásia. As três subespécies mais importantes são a *indica*, com grãos longos e finos, a *japonica*, com grãos curtos e arredondados e a *javanica*, com grãos longos e espessos. A subespécie *Oryza sativa indica* é utilizada nas regiões mais quentes, tais como o sudoeste da Ásia e regiões tropicais da América e da África (LU, 1999). Devido a sua extrema adaptabilidade, o arroz é hoje cultivado no mundo todo, sendo cultivado desde 53° de latitude Norte até 40° de latitude Sul (LU & CHANG, 1980), suportando, portanto, uma grande diversidade ambiental (VICENTE, 1993).

O arroz ocupa uma posição de destaque na dieta do povo brasileiro, sendo consumido por todas as classes sociais, principalmente pelas de baixa renda. É cultivado em praticamente todos os estados brasileiros, tanto em sistema de sequeiro quanto de inundação, ocupando uma área total de 49 milhões de ha, com uma produção de 2 milhões de toneladas de grãos, e um rendimento médio de 2,8 ton/ha (IBGE, 2003). O arroz de sequeiro caracteriza-se pela condição aeróbica de desenvolvimento radicular da planta. Sob condições de solo inundado, como ocorre no sistema de cultivo irrigado, a conseqüente criação de uma condição anaeróbica implica numa série de transformações químicas, microbiológicas e físicas que influenciam, não só o desenvolvimento da planta de arroz, como também a absorção de nutrientes e o manejo do solo (VIEIRA, 1999).

O ciclo de vida da planta do arroz pode ser dividida em três fases: a) fase vegetativa, que corresponde ao período compreendido entre a germinação da semente e a iniciação da panícula, sendo modificada pela temperatura e pelo fotoperíodo. Diferenças varietais na duração do crescimento, devem-se basicamente a diferenças nesta fase; b) fase reprodutiva, que vai da iniciação da panícula ao florescimento, tendo duração relativamente constante de cultivar para cultivar; e c) fase de maturação, etapa final do ciclo de vida da planta de arroz, compreende o período de florescimento até a maturação dos grãos, dividindo-se em grão ceroso, leitoso e maduro (MOREIRA E KLUGE, 1999).

A produtividade do arroz é afetada por diversos fatores ambientais, tais como temperatura, fotoperíodo, radiação solar e disponibilidade de água.

De um modo geral, para as principais regiões produtoras do país, o fotoperíodo não chega a ser um fator limitante, desde que sejam respeitadas as épocas de plantio e as variedades recomendadas para a região. A temperatura média durante o desenvolvimento do arroz deve estar entre 20°C e 35°C, sendo que o arroz não tolera extremos de temperatura (alta ou baixa), porém a sensibilidade da cultura varia com a fase fenológica da planta. A radiação solar tem grande importância na produtividade, uma vez que regula a taxa fotossintética da planta. No entanto, a fase vegetativa apresenta pouca sensibilidade ao sombreamento, porém quando este ocorre nas fases reprodutiva e de maturação, o número de espiguetas e a percentagem de grãos obtida é significativamente reduzida (VIEIRA, 1999).

## 1.2. Nitrogênio

Apesar de o nitrogênio molecular ( $N_2$ ) constituir cerca de 78% da atmosfera, as plantas vivem em uma situação de escassez, porque o  $N_2$  não reage quimicamente sob condições naturais, como ocorre com outras moléculas diatômicas. Nos solos, o nitrogênio (N) pode ocorrer como N-orgânico ou N-mineral, predominando as formas de nitrato ( $NO_3^-$ ) e amônio ( $NH_4^+$ ) (FERNANDES E ROSSIELLO, 1995). A maior parte do N mineral nos solos, disponível para as plantas, é derivado da matéria orgânica dos solos, através do processo de mineralização (URQUIARGA et al., 1993).

O ciclo interno do nitrogênio nos solos controla a disponibilidade de nitrogênio para as plantas, sendo que a maioria dos processos de transformações são realizadas por microrganismos, principalmente os fungos e as bactérias, ou seja são influenciados por fatores que afetam a atividade microbiana, tais como clima e solo. As transformações do nitrogênio no solo, podem ser divididas em 3 processos principais: (a) mineralização, que compreende a transformação do N orgânico em nitrato através da amonificação e nitrificação; (b) imobilização, que é caracterizada pela utilização do nitrogênio mineral, durante o metabolismo microbiano e ocorre simultaneamente a mineralização; (c) desnitrificação que é um processo de respiração anaeróbia que resulta em perdas gasosas de nitrogênio (VICTORIA et al., 1992).

A amonificação representa a transformação do N orgânico em  $NH_4^+$ , que é o primeiro produto nitrogenado mineral que aparece no solo. Durante a nitrificação, o amônio, resultante da amonificação ou incorporado ao solo via fertilização, é oxidado a nitrito ( $NO_2^-$ ) e depois a  $NO_3^-$ . A nitrificação, diferentemente da amonificação, é um processo estritamente aeróbio, ou seja, só ocorre na presença de oxigênio. Em solos alagados, como por exemplo na cultura de arroz em condições de inundação, a nitrificação só ocorre na fina camada oxidativa da superfície do solo e na rizosfera oxidada das plantas em crescimento (URQUIARGA et al., 1993). A desnitrificação é um processo de respiração anaeróbia, realizada por microrganismos capazes de utilizar nitrato ou o nitrito como aceptores finais de elétrons em lugar do oxigênio, formando óxidos gasosos ( $NO$ ,  $N_2O$ ) que podem ser novamente reduzidos para  $N_2$ . (VICTORIA et al., 1992). Quando cultivado em condições de inundação, o arroz apresenta condições favoráveis para as perdas de nitrogênio por desnitrificação. O solo do arroz inundado apresenta duas camadas características, uma fina camada superficial ( $< 2$  cm) oxidada e outra inferior reduzida (anaeróbia). Quando um fertilizante amoniacal é aplicado na superfície do solo (aeróbia) ocorre o processo de nitrificação, sendo que o nitrato produzido é rapidamente difundido para a camada reduzida (anaeróbia), onde ocorre a desnitrificação. Cabe ressaltar que a rizosfera apresenta uma interface anaeróbia/anaeróbia, favorecendo a desnitrificação e portanto as perdas de nitrogênio (URQUIARGA et al., 1993).

A cultura do arroz absorve altas quantidades de nutrientes, o que gera a necessidade de suprir o solo com adubações e corretivos. Contudo, a eficiência da planta na recuperação do adubo adicionado é bastante baixa, sendo que a taxa de utilização de nitrogênio, raramente ultrapassa 20-40% (DE DATTA, 1981; WESTCOTT et al., 1986). Isso pode ser explicado pela elevada taxa de lixiviação e desnitrificação das fontes de N aplicadas às culturas (FRANCO & BALIEIRO, 1999). O nitrato e amônia são as maiores fontes de nitrogênio inorgânico absorvidos pelas raízes das plantas superiores (MARSCHNER, 1995).

O nitrogênio é o nutriente mais exportado como produto colhido, e é admitido, em regra geral, como o elemento com maior capacidade de aumentar a produção de grãos (MALAVOTA & FORNASIERI, 1983; MACHADO, 1985). Sendo que o arroz precisa de 1 kg de N, para produzir 15-20 kg de grãos e, em termos de custo, o fertilizante nitrogenado

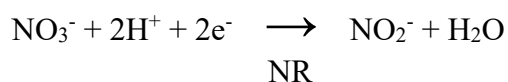
é o mais importante insumo da produção de arroz. Esta importância origina-se do fato que o N é o maior fator limitante do crescimento, sobre a maioria das condições. O desenvolvimento das variedades responsivas aos fertilizantes, na Revolução Verde, juntamente com a compreensão dos agricultores da importância do N, tem levado aos altos índices de uso dos fertilizantes nitrogenados no arroz (DAWE, 2000).

Sendo o nitrogênio um dos fatores mais limitantes ao crescimento das plantas, estas desenvolveram vários mecanismos para a máxima eficiência no uso deste elemento, como por exemplo a formação de sistemas de absorção, assimilação e mobilização que evitam o desperdício de N e energia. Estes complexos sistemas são resultados de uma progressiva adaptação das plantas as condições ambientais de baixo suprimento de N (FERNANDES, 1978).

O nitrato é a principal fonte de nitrogênio para a maioria das plantas, especialmente os cereais e culturas graníferas, usadas como fonte de alimento em grande parte do mundo (CAMPBELL, 1988). A maior parte do amônio absorvido é incorporado em compostos orgânicos diretamente nas raízes, enquanto o nitrato é translocado para a parte aérea, podendo também ser estocado nos vacúolos das raízes e folhas. O nitrato acumulado no vacúolo pode ser considerado importante no balanço cátion-ânion para a osmoregulação da planta. Contudo, para ser incorporado dentro das estruturas orgânicas e cumprir sua função como nutriente essencial para a planta, o nitrato precisa ser reduzido a amônio. A importância da redução e assimilação do nitrato na vida da planta, é similar ao da redução e assimilação de CO<sub>2</sub> na fotossíntese (MARSCHNER, 1995). A conversão do nitrato à amônio, ocorre em um processo de redução que ocorre em duas etapas e envolve 8 elétrons. Na primeira, ocorre a redução de nitrato para nitrito, com um consumo de dois elétrons, sendo esta reação catalisada pela enzima nitrato redutase e, na segunda etapa o nitrito é convertido para amônia, pela nitrito redutase, com um gasto de 6 elétrons (SOLOMONSON & BARBER, 1990; LEA, 1993).

A Nitrato Redutase (NR) é uma enzima citossólica, passível de indução pelo substrato (nitrato), sendo controlada por fatores genéticos, morfogênicos e hormonais, bem como por fatores ambientais, tais como intensidade luminosa, disponibilidade de NO<sub>3</sub> e água. (BANDURSKI, 1965; BEEVERS & HAGEMAN, 1969; FERNANDES, 1978, MARSCHNER, 1995).

A redução do nitrato nas plantas segue a seguinte reação:



Nos tecidos da parte aérea de plantas de metabolismo “C<sub>3</sub>”, como o arroz, a redução de nitrato está associada com a oxidação de metabólitos gerados pela fotossíntese e transportados ao citossol, através da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e em plantas de metabolismo “C<sub>4</sub>”, esta reação está acoplada à reação catalisada pela enzima NADH-malato desidrogenase. Nas raízes das plantas, as fontes de carbono e energia para a redução do nitrogênio são supridas pela fotossíntese, sendo que os carboidratos e ácidos orgânicos são transportados via floema, existindo uma estreita correlação entre os níveis de carboidratos e a capacidade dos tecidos da raiz de reduzir NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (MAGALHÃES, 1993a).

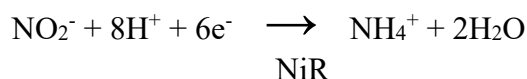
A capacidade das raízes e da parte aérea das plantas em reduzir o nitrato absorvido varia amplamente com a espécie vegetal, sendo possível observar na seiva do xilema, correlações entre os níveis de NR das raízes e a relação N-orgânico:N-nitrato. A atividade da nitrato redutase

(ANR) é baixa nas folhas em início de expansão, atinge valores máximos quando elas se tornam expandidas e declina posteriormente, com a idade. Isto causa uma distribuição escalonada da ANR na parte aérea das plantas, sendo que em plantas anuais a atividade enzimática é maior nas folhas apicais, totalmente expandidas, declinando nos pares de folhas mais basais. Nas raízes, ocorre uma situação semelhante à observada na parte aérea, pois os valores mais elevados de ANR ocorrem nas regiões mais apicais da raiz (MAGALHÃES, 1993b).

Sob condições de excesso de N, o nitrato pode ser acumulado nos vacúolos ("pool" de reserva), e mais tarde ser metabolizado para o crescimento das plantas (FERNANDES & ROSSIELO, 1995). HIREL et al. (2001), demonstraram que aumentos na produtividade do milho, podem ser obtidos pela seleção de genótipos, que durante a fase vegetativa tenham baixa capacidade para reduzir o nitrogênio inorgânico, acumulando o  $\text{NO}_3^-$  nas folhas e, que durante a fase de enchimento de grãos, sejam capazes de reduzir e remobilizar este nitrogênio para os grãos.

A Nitrito Redutase (NiR) é a enzima responsável pela redução do  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NH}_4^+$ , sendo passível de indução tanto por  $\text{NO}_2^-$  quanto por  $\text{NO}_3^-$ . Está particularmente localizada no cloroplasto das folhas, e nos plastídeos das raízes e de outros tecidos não fotossintetizantes (MARSCHNER, 1995). Nas folhas verdes, o doador de elétrons é a ferredoxina reduzida (Fdred), gerada no Fotossistema I, enquanto que em tecidos não-fotossintetizantes é gerada através do NADPH, na via das pentoses-fosfato, por ação da ferredoxina NADP<sup>+</sup> redutase (SOUZA et al., 2002).

A redução do nitrito nas plantas segue a seguinte reação:



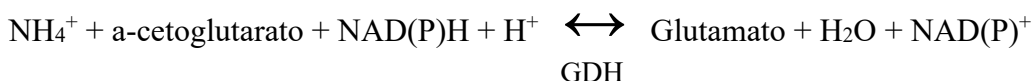
Em diferentes tecidos e células das plantas, o nível de NiR, é muito maior do que o de NR, evitando assim o acúmulo tóxico do nitrito. Deste modo, percebesse que o controle da redução do nitrato nas plantas, ocorre na etapa de redução do nitrato a nitrito através da NR e não na redução do nitrito a amônio pela NiR (SOUZA et al., 2002).

O amônio, produto final da redução do nitrato, é incorporado a compostos orgânicos pela conversão do nitrogênio-amônio em nitrogênio-amino. Esta conversão é feita pela ação conjunta do sistema enzimático glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (LEA, 1993).

O glutamato é o primeiro substrato utilizado na assimilação do amônio, através da GS, formando a glutamina. Em seguida, o grupamento amino da glutamina, é transferido para o a-cetoglutarato, pela GOGAT, formando duas moléculas de glutamato (SOUZA et al., 2002).

O ciclo de assimilação do amônio via GS/GOGAT, pode ser considerado hoje como a principal rota de assimilação de  $\text{NH}_3$  em plantas superiores. A GS parece estar distribuída em toda a planta, porém a atividade específica da enzima, em geral, é maior na parte aérea do que nas raízes. A GS é considerada a enzima chave na assimilação do amônio nas folhas do arroz. E preciso considerar, que a GOGAT sempre opera em conjunto com a GS, havendo muita semelhança no comportamento das duas enzimas, em diferentes estádios de desenvolvimento das plantas e em diferentes concentrações de amônio (MAGALHÃES, 1993b).

A enzima glutamato desidrogenase (GDH), catalisa a reação do a-cetoglutarato com o amônio produzindo o glutamato, bem como a reação reversa, que resulta na desaminação do glutamato, utilizando como doador de elétrons NADH ou NADPH (SOUZA et al., 2002), conforme a reação:



A afinidade da GDH pelo  $\text{NH}_4^+$  é baixa, variando de acordo com a localização da enzima no tecido vegetal (MIFLIN E LEA, 1977). O maior  $K_m$  da GDH para o amônio em relação a GS, indica que ela não estaria atuando no sentido de aminação, pois nas plantas superiores, a concentração de  $\text{NH}_4^+$ , normalmente é baixa. Deste modo a GS, devido a sua maior afinidade pelo  $\text{NH}_4^+$  (menor  $K_m$ ), seria a enzima mais apropriada para catalisar esta reação. Enquanto, a GDH parece estar relacionada com a assimilação de altos níveis de amônio, como ocorre na fotorrespiração e durante o metabolismo de senescência. Existem indícios de que o real substrato da GDH, seria a amônia ( $\text{NH}_3$ ) e não o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), porém, como a amônia reage rapidamente com a água formando o amônio, tem sido difícil determinar o real substrato desta enzima. Uma vez assimilado em glutamato e glutamina, por ação das enzimas GS, GOGAT e GDH, o nitrogênio pode ser distribuído para outros compostos por ação das enzimas aminotransferases ou transaminases (SOUZA et al., 2002).

### 1.3. Relações entre o metabolismo de carbono e nitrogênio

Com a diminuição da disponibilidade de N, um declínio na atividade fotossintética pode ser observado. Este declínio é mais acentuado nas plantas  $\text{C}_3$  do que nas plantas  $\text{C}_4$ , que são mais eficientes no uso fotossintético de N. Em plantas  $\text{C}_3$ , a enzima rubisco, responsável pela assimilação de carbono na fotossíntese, corresponde a mais de 50% do N foliar. Porém, a assimilação do N depende de ácidos orgânicos e do ATP e NADH, produzidos no catabolismo de carboidratos que ocorre durante a formação dos aminoácidos (PIMENTEL, 1995). Assim, o processo de assimilação do nitrogênio inorgânico depende da disponibilidade de energia e de esqueletos de carbono, provenientes da fotossíntese. Porém, o processo fotossintético depende diretamente da atividade de proteínas e outros compostos nitrogenados, derivados do nitrogênio inorgânico. Deste modo, a harmonia entre o metabolismo de carbono e nitrogênio é fundamental para o desenvolvimento dos vegetais em geral (SILVEIRA, 1993).

A planta de arroz exhibe durante as várias fases de desenvolvimento, variações quanto ao padrão de absorção de nutrientes e metabolismo. Na fase vegetativa, os nutrientes, incluindo o N, P, K e S são intensamente absorvidos, enquanto fotoassimilados são produzidos e proteínas são sintetizadas, de forma a sustentar os processos de perfilhamento e de expansão foliar. Durante a fase reprodutiva, os fotoassimilados são transformados em componentes da parede celular, como lignina e celulose. Os fotoassimilados em excesso, são armazenados nos colmos e bainhas, na forma de amido. Na fase de maturação, a morfogênese já se completou e os fotoassimilados acumulam-se nas panículas na forma de amido. À medida que este processo avança, os carboidratos, proteínas e minerais acumulados nas folhas movem-se para as panículas e a planta entra em senescência (VIEIRA, 1999).

Um modelo para a absorção de nitrogênio e crescimento de plantas sob regime de competição, foi proposto por BALDWIN (1976) citado por GOMES (2002). Este modelo demonstra que quando os carboidratos estão em excesso, a absorção de nitrogênio é favorecida, uma vez que o sistema radicular se apresenta mais desenvolvido em função do carbono disponível. Ao passo que, se o nitrogênio se encontra em excesso, teremos um menor crescimento radicular, permitindo um maior acúmulo de fotoassimilados nas folhas. Neste sentido, a relação carboidratos/nitrogênio pode ser caracterizada em três situações:

a) A disponibilidade de nitrogênio é baixa, mas existe uma adequada síntese de carboidratos e umidade no solo – o crescimento vegetativo será lento e a frutificação será pobre ou inexistente, tendo estas plantas uma aparência verde-amarelada, com abundância em carboidratos de reserva (amido, açúcares redutores e sacarose); b) O nitrogênio encontra-se em excesso no solo e existem condições apropriadas para a fotossíntese – as plantas apresentarão um bom crescimento vegetativo, com uma grande formação de flores, que em sua maior parte abortarão. São plantas com uma característica coloração verde-escuro, sendo ricas em nitrogênio, porém pobres em carboidratos solúveis e amido; c) As concentrações de nitrogênio e carboidratos estão em estado de equilíbrio adequado – configura-se a condição ideal para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Apesar de a maioria dos fotoassimilados contidos nos grãos de arroz, serem provenientes da fotossíntese realizada durante a fase de maturação, parte dos carboidratos acumulados nas bainhas das folhas e nos colmos, antes do florescimento, é translocado para a panícula. Ou seja, o carboidrato acumulado nos grãos, pode ser dividido entre aqueles acumulados antes do florescimento (carboidrato de reserva) e os resultante da fotossíntese realizada após o florescimento. Estima-se que 68% dos carboidratos armazenados na fase vegetativa sejam remobilizados para os grãos. Em cultivares anãs de arroz, uma menor partição de fotoassimilados para o crescimento de órgãos vegetativos, resultou em maior acúmulo de carboidratos não estruturais nos caules e bainhas antes do florescimento. Essa fração composta por amido, açúcares e aminoácidos pode atingir até 2t/ha, sendo prontamente translocada para as panículas e utilizadas no enchimento dos grãos (VIEIRA, 1999).

PAVLOV & IVANOV (1960) citados por FERNANDES & SOUZA (1993), trabalhando com milho, demonstraram a necessidade de esqueletos de carbono para a incorporação do nitrogênio aplicado. Neste trabalho, as plantas receberam simultaneamente uréia foliar e  $\text{NH}_4^+$  via sistema radicular, e foi observado que a assimilação do  $\text{NI-I}_4^+$  absorvido pela raiz era reduzida, devido a retenção de açúcares na parte aérea, em virtude da aplicação de uréia.

Entre os diversos testes utilizados na determinação do teor de nitrogênio no tecido da planta, o mais simples consiste em calcular o conteúdo total de nitrogênio do tecido vegetal, independentemente da forma sob a qual este nitrogênio possa estar. Sendo obtido como resultado, a percentagem de nitrogênio em relação ao peso seco, que é utilizada para o cálculo de proteína bruta, usando-se um fator de conversão, baseado no teor médio de nitrogênio das proteínas da espécie considerada. Porém, em determinadas circunstâncias, até 50% do nitrogênio total das plantas pode estar sob a forma livre. Deste modo, este teste fornece uma indicação muito imprecisa do teor de proteínas das plantas, além disso parte do nitrogênio poderia estar na forma reduzida, potencialmente nociva a vários processos metabólicos. Ou seja, o simples conhecimento do teor total de nitrogênio, não é uma indicação segura das condições gerais do metabolismo de N nas plantas. Então, a combinação do estudo da atividade da nitrato redutase com o fracionamento do N da planta, seria uma melhor forma de conhecer o correto status de N das plantas (FERNANDES, 1978).

Em cana-de-açúcar, nas fases iniciais de crescimento, SILVEIRA & CROCOMO (1981) citados por GOMES (2002), observaram aumentos na atividade da nitrato redutase e taxas de acúmulo de nitrogênio que estavam relacionadas com baixas concentrações de açúcares solúveis e altas concentrações de N-amino no colmo.

#### 1.4. Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

A associação com bactérias diazotróficas, ou seja, bactérias que são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico, tornando-o assimilável, permite que algumas plantas obtenham o nitrogênio, quando este encontra-se escasso nos solos. Todas as bactérias diazotróficas, possuem um complexo enzimático chamado nitrogenase, que dentre outros substratos alternativos, reduz o nitrogênio atmosférico até amônio (NEVES, 1993).

A incorporação de nitrogênio aos diferentes ecossistemas, via FBN, representa uma redução substancial na quantidade de energia a ser empregada no processo de Harber-Bosch, para a produção de fertilizantes nitrogenados. Como a ligação tripla que une os dois átomos de nitrogênio é muito forte, para o seu rompimento através da fixação industrial, são necessárias temperaturas ( $>400^{\circ}\text{C}$ ) e pressões elevadas ( $>10^7$  Pascal), obtidas através de derivados de petróleo, o que eleva os custos de produção (MOREIRA E SIQUEIRA, 2002).

A enzima nitrogenase catalisa o processo de redução do nitrogênio atmosférico a  $\text{NH}_4^+$ , sendo esta, uma reação acoplada a produção de  $\text{H}_2$ . Duas unidades básicas compõem a enzima: uma ferro-proteína que coleta a força redutora e outra ferro-molibdênio, proteína que coleta e reduz o substrato. Outros dois tipos de nitrogenase independentes de molibdênio são também conhecidos, uma contendo vanádio no lugar de molibdênio e outra contendo apenas ferro. A nitrogenase é uma enzima extremamente versátil, pois além do  $\text{N}_2$ , catalisa a redução de vários outros substratos, tais como o acetileno. Em função disto, a atividade de redução do acetileno ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) a etileno ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ), tem particular importância no estudo dos sistemas fixadores de  $\text{N}_2$  (MOREIRA E SIQUEIRA, 2002).

Dentre os sistemas agrícolas que contribuem para a reciclagem do nitrogênio perdido para a atmosfera, os mais importantes são as simbioses que ocorrem nas plantas leguminosas. Entretanto, outras associações menos perfeitas, como as que ocorrem principalmente com cereais e gramíneas, estão rapidamente ganhando importância, pois os cereais representam a base alimentar, principalmente dos países em desenvolvimento (DOBEREINER, 1993).

As bactérias diazotróficas associadas as plantas da família das gramíneas, apresentam comportamento diferente daquelas associadas aos representantes da família das leguminosas, que apresentam uma associação caracteristicamente simbiótica. No caso da simbiose entre leguminosas e *Rhizobium*, o estudo é facilitado pela ocorrência de nódulos, onde localizam-se os bacteróides, responsáveis pela FBN. Nos processos de associações entre gramíneas e bactérias diazotróficas, a ausência de estruturas específicas, a variabilidade no estabelecimento e no funcionamento da associação e as dificuldades na quantificação da fixação de  $\text{N}_2$  no campo, têm dificultado a investigação (PATRIQUIN et al, 1983).

Vários estudos têm mostrado a presença de bactérias fixadoras de  $\text{N}_2$ , junto às raízes de gramíneas. Em 1977, DE POLLI et al. citado por SIQUEIRA E FRANCO (1988), mediram pela primeira vez, a fixação de  $\text{N}_2$  em *Paspalum notatum* usando  $^{15}\text{N}$ , tendo sido estimada uma fixação em torno de  $40 \text{ kgN/ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$ . Fixação esta, suficiente para manter, com esta espécie, gramados verdes o ano inteiro, sem adição de fertilizantes nitrogenados.

Geralmente, as bactérias diazotróficas associadas às gramíneas, podem exibir um caráter endofítico ou não (BALDAM et al., 1997). Segundo BALDAM et al., (1983), as bactérias diazotróficas podem trazer benefícios para as plantas com as quais se associam, seja através da FBN, pela produção de fitohormônios ou pela assimilação de

nitrogênio. Bactérias do gênero *Azospirillum*, aumentam a massa e o volume das raízes, proporcionando mudanças na morfologia destas e dos pêlos radiculares (TIEN et al, 1979; JAIN & PATRIQUIN, 1984; KAPULHIK et al, 1985). Diversos mecanismos podem atuar na promoção do crescimento radicular, tais como, indução da expressão de genes responsáveis pelo crescimento dos pêlos radiculares, devido a mudanças nos níveis de fitohormônios (JAIN & PATRIQUIN, 1985), mudanças na absorção de nutrientes (LIN et al., 1983) ou através da indução da extrusão de prótons (BARSHAN, 1990). Porém, BALOTA et al (1994), observaram que certas substâncias excretadas pelas bactérias diazotróficas podem apresentar efeito diferenciado (tanto estimulatório como inibitório) no desenvolvimento das plantas, em função da espécie utilizada.

Uma das razões para considerar o arroz como um dos promissores candidatos para a pesquisa de fixação de nitrogênio é a observação que o status de N das terras inundadas, sob cultivo de arroz, é sustentado devido à alta atividade das bactérias fixadoras de nitrogênio, que encontram um ambiente favorável para o seu crescimento nos sistemas submersos de arroz (MIRZA et al., 2000). Um grande número de bactérias fixadoras de nitrogênio, estão presentes na cultura do arroz irrigado. Sendo que os gêneros presentes variam em função do nincho, aeróbio (raiz da planta e superfície da água) ou anaeróbio (água, superfície e dentro do solo). Esta diversidade de microrganismos fixadores de N<sub>2</sub>, dificulta individualizar a participação de cada um sem alterar os demais. Desta forma em experimentos conduzidos principalmente no Japão e na Filipinas, a contribuição da fixação foi feita pelo balanço de N, onde o N inicial e o final do solo e o removido nos grãos, foram computados durante vários anos de cultivo. Em todos os casos, o arroz cultivado sem aplicação de nitrogênio, mostrou um saldo positivo, que variou de 25 a 146 kg de nitrogênio, incorporado ao sistema, por ano de fixação de N<sub>2</sub>. Entretanto, a incorporação deve ter sido maior, para compensar o que foi perdido por volatilização, desnitrificação e na água de irrigação, que não foram computados nestes estudos (SIQUEIRA E FRANCO, 1988).

Dentre os microrganismos fixadores de nitrogênio que são capazes de crescer em cultivos de arroz de sequeiro e inundado, alguns colonizam o interior da planta, enquanto que outros, como *Azospirillum* spp, *Pseudomonas diazotrophicus*, *Enterobacter* spp. formam associações na superfície das raízes (LADHA, 1986; VOSE, 1993). Contudo, o papel desses organismos presentes nas plantas ainda não foi bem identificado, com exceção para a estirpe Sp245 (*Azospirillum brasilense*) em trigo, onde foi demonstrado que a bactéria aumenta a assimilação de nitrato do solo devido a maior atividade da nitrato redutase (BALDAM et al., 1983). A população de microrganismos diazotróficos endofíticos, ocorre em maior número nas raízes do que na parte aérea, e podem ser potencialmente promotoras de crescimento dessas plantas, além de atuarem no controle biológico de fitomoléstias (BALDANI, 1996). OLIVEIRA (1992), reportou a ocorrência de altas populações de alguns microrganismos diazotróficos em raízes, base dos colmos e folhas de arroz. Esta autora, também verificou que um maior número desses microrganismos, foram encontrados na base do colmo, principalmente na época de florescimento quando comparado com a época de enchimento dos grãos. Dentre as bactérias diazotróficas detectadas estava presente a “*Burkholderia brasilensis*” (BALDANI et al, 1996) e que inicialmente foi denominada de bactéria E (OLIVEIRA, 1992). O gênero *Burkholderia* inclui atualmente 22 espécies descritas e 3 espécies em descrição ou validação por parte do comitê internacional responsável, incluindo as espécies “*B. brasilensis*” e “*B. tropicalis*”. Estas duas espécies tem como meio semi-seletivo o JMV semi-sólido, que usa manitol como fonte de carbono e pH ao redor de 5,0. Este meio, acrescido de 100 mg.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, tem permitido o isolamento, principalmente de “*B. brasilensis*”. Ambas as espécies são capazes de crescer



em meio contendo 50 g.L<sup>-1</sup> de açúcar cristal, mas somente “*B. tropicalis*” tolera 100 g.L<sup>-1</sup> deste açúcar, usando a formulação do meio LGI-P (REIS E TEIXEIRA, 2002).

Uma outra bactéria, considerada endofítica, o *Herbaspirillum seropedicae*, tem sido encontrada em associação natural com raízes e caules de arroz e cana-de-açúcar, bem como em outras plantas não-leguminosas (OLIVARES, 1997). Estudos de monitoramento através de contagem em meio JNFb semi-sólido, têm demonstrado que esta bactéria apresenta uma baixa sobrevivência, quando inoculado no solo natural ou esterilizado (OLIVARES et al., 1996). No entanto, os autores conseguiram reisolar a bactéria do solo, quando sementes de sorgo desinfestadas superficialmente (livres de bactérias) foram germinadas neste solo, sugerindo que a bactéria pode estar em estágio viável mas não culturável. Esta pode ter sido uma das razões da mesma ter sido inicialmente isolada de solo de rizosfera de milho, sorgo e arroz (BALDANI et al., 1986). No caso do gênero *Herbaspirillum*, existem dificuldade para distinguir entre o *H. seropedicae* e o *H. rubrisubalbicans*. Além disso, o isolamento do *Herbaspirillum* é dificultado uma vez que pode ser confundido com *Azospirillum*, principalmente àquelas bactérias capazes de tolerar o pH inicial mais ácido do meio JNFb. Deste modo, a formação de película no meio JNFb, *per si*, não indica a presença de bactérias das espécies de *Herbaspirillum* (REIS E TEIXEIRA, 2002).

Dos nutrientes minerais, o nitrogênio é o que tem o maior efeito sobre a FBN, de modo que a fixação só ocorre em situações de deficiência de N, pois a abundância de nitrogênio mineral reduz ou mesmo suprime a FBN. O grau de inibição pode variar de acordo com a fonte de nitrogênio aplicada, porém, é necessário que haja disponibilidade de N para o crescimento e desenvolvimento da planta, até o início da fixação de N<sub>2</sub> (FRANCO E NEVES, 1992). Em leguminosas, o nitrogênio, mais especificamente o nitrato, afeta a simbiose retardando a infecção do pêlos radiculares pelo rizóbio, inibe o crescimento dos nódulos e a atividade da nitrogenase propriamente dita e, além disso, provoca a senescência precoce dos nódulos já formados (NEVES, 1993). Pequenas doses de nitrogênio, podem beneficiar a FBN, funcionando como uma dose de arranque em determinadas culturas, principalmente naquelas que têm nodulação tardia ou fixam N durante um curto período do seu ciclo, como o feijão (MOREIRA E SIQUEIRA,

2002). Em gramíneas, estirpes mutantes (deficientes na atividade da enzima nitrato redutase) foram capazes de fixar N<sub>2</sub> em associação com plantas de trigo cultivadas em sistema monoaxênico, mesmo na presença de 280 ppm de nitrogênio na forma de nitrato (FERREIRA, 1985). A bactéria diazotrófica, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que tem sido encontrada em associação com gramíneas, tais como cana-de-açúcar, tem uma certa tolerância a amônio e não apresenta inibição da atividade da nitrogenase por nitrato, isto apresenta uma vantagem ecológica e agrônômica, porque permite complementar a contribuição da fixação biológica com a fertilização nitrogenada colocada no solo (BODDEY et al. 1991). Ou seja, tanto a necessidade de nitrogênio da cultura pode ser suprida, como a quantidade de fertilizantes colocada no solo pode ser reduzida.

### 1.5. Fixação biológica e metabolismo de nitrogênio

Ao contrário das bactérias diazotróficas de vida livre, que fixam o nitrogênio em quantidade suficiente apenas para suprir suas necessidades proteicas, as bactérias que vivem em simbiose com outros organismos transferem, parcial ou totalmente, para o hospedeiro o nitrogênio que fixam, isto ocorre porque as enzimas que assimilam o amônio (GS, GOGAT e GDH) passam a ser controladas pela planta hospedeira. Por exemplo, nas associações de cianobactérias com *Azolla* não só a quantidade mas também a atividade das enzimas

assimiladoras de amônia são bem menores do que as apresentadas pela cianobactéria em vida livre (NEVES & FRANCO, 1993).

Em leguminosas, os produtos sintetizados nos nódulos são exportados rapidamente para a parte aérea do hospedeiro, via xilema, pelo fluxo da transpiração, e tem sido sugerido que a análise dos compostos nitrogenados da seiva do xilema, tanto em condições de campo como em casa de vegetação, poderia ser utilizada para a quantificação da fixação biológica do N<sub>2</sub>. Isto foi proposto, principalmente para as leguminosas que transportam ureídeos pois, em diversos experimentos, foi encontrada uma correlação positiva e significativa entre a concentração de ureídeos na seiva do xilema e as estimativas do N<sub>2</sub> proveniente da fixação, obtidas pelas técnicas de redução do acetileno, diluição isotópica de <sup>15</sup>N e acúmulo de N-total nos tecidos (HUNGRIA, 1994).

Experimentos de inoculação com *Herbaspirillum* spp. em solo não-esterilizado, sob condições de casa de vegetação, têm demonstrado que este diazotrófico endofítico, pode realmente ser introduzido dentro das plantas de arroz, pela aplicação de culturas de bactérias nas sementes de arroz antes da germinação (OLIVARES et al., 1993 citado por LADHA E REDDY, 2000). A inoculação promove aumento no crescimento e na produção das plantas de arroz, mas não de forma uniforme. As maiores respostas à inoculação tem sido observados na presença de níveis moderados de adubação nitrogenada (RAO et al, 1987). Estudos realizados por DOBEREINER & BALDANI (1995) mostraram que a inoculação com estirpes de *Herbaspirillum* spp. em plântulas de arroz, crescidas em solução de Hoagland contendo nitrogênio marcado, proporcionou um aumento, derivado da FBN, de 40% no N-total das plantas. Em condições de vaso, também foram verificados aumentos variando de 11 a 20% na produção de arroz, quando as plantas foram inoculadas com estirpes de “*Burkholderia brasilensis*”, e de 17 a 19% quando inoculadas com estirpes de *H. seropedicae* (BALDANI et al., 2000).

Apesar de diversos experimentos de inoculação de plantas de arroz, terem sido realizados, poucos indicam que os efeitos obtidos com a inoculação sejam devidos a FBN (RAO et al., 1987). Isto porque, a simples presença da bactéria diazotrófica não implica necessariamente que a planta obtenha grande contribuição da FBN (BODDEY, 1995). Deste modo, o desenvolvimento de métodos quantitativos do conteúdo de N, são de suma importância para avaliar os benefícios da associação entre planta e bactérias diazotróficas. Nesse sentido, OLIVEIRA (1994) utilizando a técnica de diluição isotópica de <sup>15</sup>N em tanque contendo solo marcado, constatou que nas cultivares utilizadas de arroz inundado, houve uma contribuição da FBN variando de 6 a 29%. Utilizando a mesma técnica e trabalhando com diversos genótipos de arroz, CAMPOS et al. (1995), verificaram que a cultivar IR42 obteve a maior contribuição da FBN, indicando um sistema com alta eficiência de FBN, enquanto que a cultivar IAC4440, apresentou o maior enriquecimento de <sup>15</sup>N, sugerindo um sistema com baixa eficiência.

Um dos poucos trabalhos envolvendo o estudo do metabolismo de nitrogênio em plantas inoculadas com bactérias diazotróficas foi desenvolvido por FERREIRA et al., (1987). Neste trabalho, em sistema monoaxênico, foi observado que as plantas de trigo inoculadas com estirpes mutantes de *Azospirillum brasilense*, deficientes na NR, apresentaram ANR na parte aérea maior do que as plantas inoculadas com a estirpe original. Os autores sugeriram que este comportamento pode ter sido devido a uma maior translocação do NO<sub>3</sub> para a parte aérea, nas plantas inoculadas com as mutantes e ao contrário, uma maior redução de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes, em função da inoculação com a estirpe original. Ou seja, a bactéria reduziria o nitrato na raiz, favorecendo a translocação do nitrogênio, já incorporado em cadeias de carbono, para a parte aérea.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Cultivares utilizadas

Foram utilizadas duas cultivares de arroz, contrastantes quanto ao potencial de Fixação Biológica de Nitrogênio, avaliadas através da técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ :

IR42 – Alto potencial para Fixação Biológica de Nitrogênio.

IAC4440 – Baixo potencial para Fixação Biológica de Nitrogênio.

### 2.2. Experimento em condições de vasos

Foi realizado um experimento em condições de vasos com solo (Planossolo), na área experimental da Embrapa Agrobiologia. As sementes das cultivares de arroz IR42 e a IAC4440, foram inoculadas através de peletização, com turfa contendo as bactérias diazotróficas, “*Burkholderia brasilensis*” (M130), *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94), a mistura de ambas ou o controle (não-inoculado).

A adubação foi feita mediante análise de solo (Tabela 1), acrescida de 1 mL/kg de solução de micronutrientes para cultivo em vasos (FRANCO E DOBEREINER, 1967). Em cada vaso foram plantadas 5 sementes, ficando com 4 plantas após o desbaste. Foram aplicadas três doses de nitrogênio (0, 40 e 80 KgN/ha), na forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , parceladas em 2 aplicações aos 20 e 60 dias após o plantio. Vinte dias após a germinação das sementes, foi colocada uma lâmina d’água de 2 cm que foi mantida até o final do experimento.

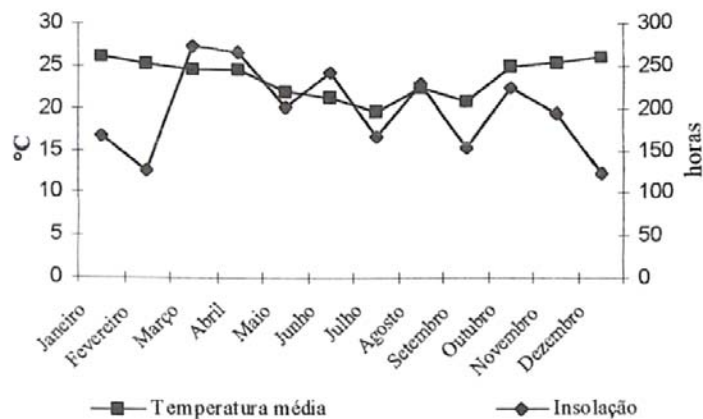
**Tabela 1:** Análise da amostra do Planossolo utilizado na montagem do experimento em condições de vasos.

pH em água	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>				mg/dm <sup>3</sup>	
	Al	Ca + Mg	Ca	Mg	P	K
5,8	0,0	2,4	1,7	0,7	8	26

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com um arranjo fatorial com 2 cultivares, 4 tratamentos de inoculação, 3 doses de nitrogênio, 2 épocas de coleta e 4 repetições.

As coletas foram realizadas no período vegetativo (50 dias) e no florescimento, que variou de acordo com o ciclo de cada cultivar.

A variação na temperatura e insolação ao longo do experimento, podem ser observados na figura 1.



**Figura 1:** Variações na temperatura e insolação durante o ano de 2002. As coletas foram realizadas durante os meses de Maio, Junho e Julho. Dados obtidos do INMET/PESAGRO-RJ.

## 2.3. Determinações

### 2.3.1. Contagem do número de bactérias mais provável de bactérias diazotróficas (NMP)

A contagem do número de bactérias diazotróficas foi realizada pelo método do Número Mais Provável (NMP), em raízes e parte aérea das plantas. O material (10g) foi lavado e triturado em liquidificador por 1 minuto, com 90 mL de solução salina. Na etapa subsequente, o material resultante foi diluído em solução salina até  $10^{-6}$ . Em seguida, 0,1 mL de cada diluição, foi inoculada no centro do frasco contendo 5 mL do meio semi-sólido semi-específico: JNFb e JMV, para *H. seropedicae* e "*B. brasiliensis*", respectivamente, e incubados a 30°C por 5-7 dias. A contagem dos microrganismos foi baseada na presença ou ausência da película característica, utilizando-se para o cálculo, a tabela de McCrady (DOBEREINER et. al., 1995).

### 2.3.2. Acúmulo de matéria seca

O peso da matéria seca da parte aérea das plantas foi obtido após secagem em estufa de circulação forçada a 60°C por 48h.

### 2.3.3. Conteúdo de Nitrogênio

O total de nitrogênio acumulado na parte aérea das plantas, foi determinado pelo método descrito por TEDESCO (1982), onde 200 mg do material seco e moído foram adicionados em tubos de digestão. Ao material seco e moído, em capela com exaustor, foi adicionado 1 mL de  $H_2O_2$  30%, 1,5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado e 0,7 g da mistura catalisadora (100 g de  $Na_2SO_4$ , 10g de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  e 1g de selênio). As amostras foram deixadas no digestor, sob temperaturas crescentes até a total digestão do material quando foram destiladas por arraste a vapor e tituladas com  $H_2SO_4$  padronizado, para a determinação do teor de nitrogênio (%N) acumulado na parte aérea da planta. O N-total foi obtido pela multiplicação da %N pelo peso da matéria seca da parte aérea.

#### **2.3.4. Extração alcóolica**

A extração alcóolica no material vegetal fresco foi realizada, segundo metodologia descrita por FERNANDES (1983), em amostras de 1g de raiz, base do colmo, colmo ou folhas das plantas, que foram conservadas em etanol 80% na geladeira, desde a coleta até o momento da análise. Estas amostras foram maceradas em almofariz, filtradas em gaze e papel de filtro. O filtrado foi transferido para um funil de separação, onde um volume de clorofórmio, igual ao da solução alcóolica, foi adicionado ao funil, agitando-se suavemente, sendo deixado em repouso por 40 minutos, até a completa separação da fase polar e apoiar. A fase apoiar foi descartada e o volume da fase polar foi completado até 25 mL com etanol 80%, ficando este material em geladeira até o momento das determinações. Deste material foram retiradas alíquotas para determinação de nitrato, N-amino livre e açúcares solúveis.

#### **2.3.5. Concentração de nitrato**

A concentração de nitrato foi determinado segundo CATALDO et al. (1975). Uma alíquota de 0,1 mL do extrato alcóolico (raiz, base do colmo, colmo ou folha) foi colocada em tubo de ensaio, no qual foi adicionado, vagarosamente, 0,4 mL da solução de ácido salicílico 5% em HCl concentrado, deixando-se reagir por 20 minutos. A reação foi paralisada com 9,5 mL de NaOH 2N. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 410 nm e a determinação baseou-se em uma curva de calibração padrão, feita com soluções de nitrato de concentrações conhecidas.

#### **2.3.6. Concentração de Aminoácidos livres (N-amino)**

A concentração de aminoácidos livres (N-amino) presentes na raiz, base do colmo, colmo ou folha, foi determinada de acordo com a metodologia descrita por YEMM & COCKING (1955). Uma alíquota de 1 mL do extrato alcóolico foi adicionada em tubo pirex contendo 0,5 mL de tampão citrato 0,2M pH 5,0 (21,008 g de ácido cítrico, 200 mL de NaOH 1N, completar o volume para 500 mL com H<sub>2</sub>O destilada). Adicionando-se em seguida, 1,2 mL do reagente de ninidrina (2,5 g de ninidrina, 5 mL de KCN 0,01M e 300 mL de metil celossolve). Os tubos foram cobertos com papel alumínio e aquecidos em banho-maria a 100°C por 15 minutos, seguido de um resfriamento em água corrente, adicionando-se 3 mL de etanol 60%. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 570 nm e a determinação foi baseada em uma curva de calibração, feita com soluções de leucina de concentrações conhecidas.

#### **2.3.7. Açúcares solúveis**

O teor de açúcares solúveis presentes na raiz, base do colmo, colmo ou folha das plantas foi feito segundo YEMM & WILLIS (1954). Em tubos pirex, foram pipetados 5 mL do reagente de antrona (0,4 g de antrona em 200 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5:2) e adicionados 1 mL do extrato alcóolico, deixando-se a 0°C por 5 minutos. Após serem agitadas suavemente, as amostras foram deixadas em banho-maria à 100°C por 10 minutos, para desenvolvimento da cor verde, quando foram resfriadas em água corrente. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 620 nm. A curva de calibração padrão foi formada por soluções com concentrações conhecidas de glicose.

#### **2.4. Análise estatística**

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico SISVAR (DEX/UFLA), aplicando-se o teste LSD com nível de significância de 0,05 na separação das médias.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Contagem do número mais provável de bactérias diazotróficas

Foi observada a presença de bactérias nos tecidos da raiz e parte aérea das cultivares IR42 e IAC4440, em todos os tratamentos das duas coletas, incluindo o controle não inoculado (Tabelas 2 e 3). Este tipo de comportamento também foi observado por OLIVEIRA (1992), onde a ocorrência de *Herbaspirillum seropedicae* não foi influenciada pela inoculação da bactéria nas plantas de arroz. BALDANI (1996) e GUIMARÃES (2001), sugeriram que a ocorrência das bactérias no tratamento não inoculado, estava relacionado com a presença de outros microrganismos fixadores de N<sub>2</sub>, além das estirpes inoculadas, uma vez que o solo utilizado não foi esterilizado. Além disto, os meios utilizados para a contagem das bactérias (JNFb e JMV) são semi-específicos para *Herbaspirillum* spp e "*Burkholderia brasilensis*", respectivamente. Ou seja, o crescimento obtido pode ser devido a presença de outros microrganismos, conforme observado por BALDANI (1996).

O número de bactérias presentes na raiz foi maior do que o observado na parte aérea e, no período de florescimento (Tabela 3) ocorreu uma redução no número de bactérias, em relação ao período vegetativo (Tabela 2). A população de "*B. brasilensis*", foi menor do que a de *H. seropedicae*, e no florescimento, a cultivar IR42 apresentou uma população de bactérias diazotróficas maior do que IAC4440 (Tabela 3). Na parte aérea, a adubação nitrogenada tendeu a aumentar a população das bactérias (Tabelas 2 e 3). OLIVEIRA (1992), observou um maior número de bactérias na base do colmo das plantas de arroz, no período de florescimento quando comparada ao período de enchimento de grãos. No entanto, experimento realizado em casa de vegetação, mostrou uma redução no número de bactérias ao longo do ciclo na cultivar IR42, enquanto que a cultivar IAC4440 não foi influenciada pela época de coleta, nem pela parte da planta (GUIMARÃES, 2001). Uma vez que as bactérias diazotróficas em geral, estão amplamente distribuídas no solo, a inoculação das plantas só poderá trazer resultados satisfatórios se a estirpe utilizada for capaz de competir com a microflora nativa, e estabelecer-se tanto na rizosfera quanto nas raízes das plantas (DOBEREINER & PEDROSA, 1987 citado por DIDONET et al (2000). Como sugerido por REIS JR. et al. (2000), o número de bactérias diazotróficas encontrada na planta pode não explicar as diferenças em relação ao metabolismo de nitrogênio, uma vez que estes autores não verificaram diferenças, na população nativa de *Herbaspirillum* spp. e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, entre partes da planta ou época de coleta, em quatro genótipos de cana-de-açúcar. Ou seja, os números populacionais destas bactérias não se alteraram em genótipos contrastantes quanto ao potencial de fixação biológica de nitrogênio. De modo similar, apesar dos resultados obtidos por CAMPOS et al. (1995) terem demonstrado a diferença entre o potencial de FBN das cultivares IR42 e IAC4440, CAMPOS (1999) não verificou diferenças no número de bactérias do gênero *Burkholderia* e *Herbaspirillum*, nas duas cultivares.

**Tabela 2:** Contagem do número mais provável de bactérias diazotróficas crescidas nos meios JNFb e JMV, presentes em raiz e parte aérea das cultivares de arroz IR42 e IAC4440, no período vegetativo, sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

		IR42				IAC4440					
		Nitrogénio aplicado (Kg./ha)				Nitrogênio aplicado (Kg/ha)					
		0	40	80	Média	0	40	80	Média		
Raiz										Média	
Estirpe	Meios	-----log n° cel/g de matéria fresca-----				-----log n° cel/g de matéria fresca-----				Média	
ZAE94	JNFb	5,96	5,71	5,50	5,72	5,71	5,46	5,84	5,67	5,70	
M130	JMV	4,83	5,31	4,91	5,02	5,29	5,62	5,40	5,44	5,23	
Mistura	JNFb	5,87	4,96	5,88	5,57	5,53	5,20	5,60	5,44	5,51	
	JMV	5,43	5,35	4,82	5,20	4,79	5,76	4,76	5,10	5,15	
Controle	JNFb	5,41	5,60	5,24	5,42	5,44	5,46	6,03	5,64	5,53	
	JMV	4,13	6,15	4,29	4,86	4,82	4,72	4,47	4,67	4,77	
Média		5,27	5,51	5,11	5,30	5,26	5,37	5,35	5,33		
Parte aérea										Média	
Estirpe	Meios	-----log n° cel/g de matéria fresca-----				-----log n° cel/g de matéria fresca-----				Média	
ZAE94	JNFb	5,19	5,56	5,73	5,49	5,27	5,15	5,94	5,45	5,47	
M130	JMV	3,54	5,36	4,33	4,41	5,28	5,18	4,67	5,04	4,73	
Mistura	JNFb	4,33	4,51	5,90	4,91	4,79	4,89	5,31	5,00	4,96	
	JMV	4,18	4,18	4,29	4,22	4,48	4,83	6,04	5,12	4,67	
Controle	JNFb	4,75	5,11	5,72	5,19	5,14	5,23	5,67	5,35	5,27	
	JMV	4,00	4,98	6,15	5,04	3,60	4,41	4,88	4,30	4,67	
Média		4,33	4,95	5,35	4,88	4,76	4,95	5,42	5,04		

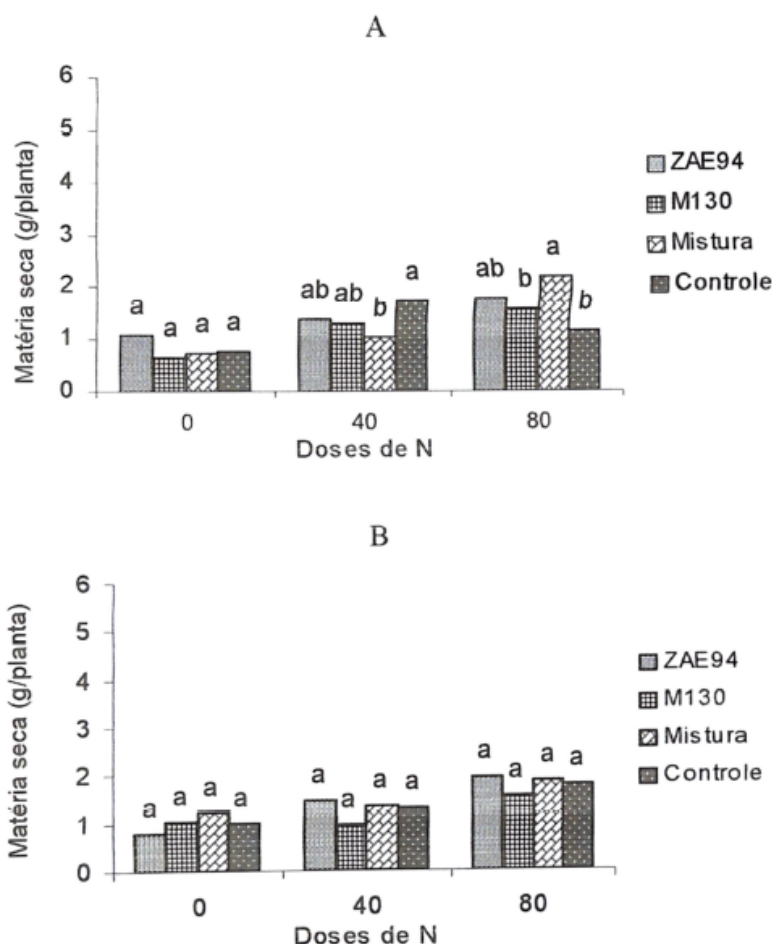


**Tabela 3:** Contagem do número mais provável de bactérias diazotróficas crescidas nos meios JNFb e JMV, presentes em raiz e parte aérea das cultivares de arroz IR42 e IAC4440, no período de florescimento, sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

		IR42				IAC4440					
		Nitrogênio aplicado (Kg./ha)				Nitrogênio aplicado (Kg/ha)					
		0	40	80	Média	0	40	80	Média		
Raiz										Média	
Estirpe	Meios	-----log n° cel/g de matéria fresca-----				-----log n° cel/g de matéria fresca-----				Média	
ZAE94	JNFb	5,14	5,04	5,04	5,07	4,136	4,854	4,649	4,55	4,81	
M130	JMV	2,85	5,15	5,15	4,38	3,865	4,074	3,928	3,96	4,17	
Mistura	JNFb	3,87	5,04	5,14	4,68	4,729	4,459	4,654	4,61	4,65	
	JMV	4,65	5,15	4,65	4,82	3,744	4,510	4,381	4,21	4,52	
Controle	JNFb	4,65	5,14	4,39	4,73	4,713	4,877	5,023	4,87	4,80	
	JMV	5,04	4,65	4,65	4,78	2,727	2,727	3,942	3,13	3,96	
Média		4,37	5,03	4,84	4,74	3,99	4,25	4,43	4,22		
Parte aérea										Média	
Estirpe	Meios	-----log n° cel/g de matéria fresca-----				-----log n° cel/g de matéria fresca-----				Média	
ZAE94	JNFb	4,39	4,65	4,65	4,56	4,484	4,653	4,732	4,62	4,59	
M130	JMV	4,06	4,65	4,40	4,37	3,526	3,674	3,559	3,59	3,98	
Mistura	JNFb	4,39	5,04	5,14	4,86	3,708	4,253	4,772	4,24	4,55	
	JMV	2,78	4,65	4,65	4,03	2,726	3,731	3,914	3,46	3,75	
Controle	JNFb	4,65	4,39	4,65	4,56	3,981	3,936	4,166	4,03	4,30	
	JMV	5,15	3,98	4,40	4,51	2,726	2,088	3,754	2,86	3,69	
Média		4,24	4,56	4,65	4,48	3,53	3,72	4,15	3,80		

### 3.2. Produção de matéria seca

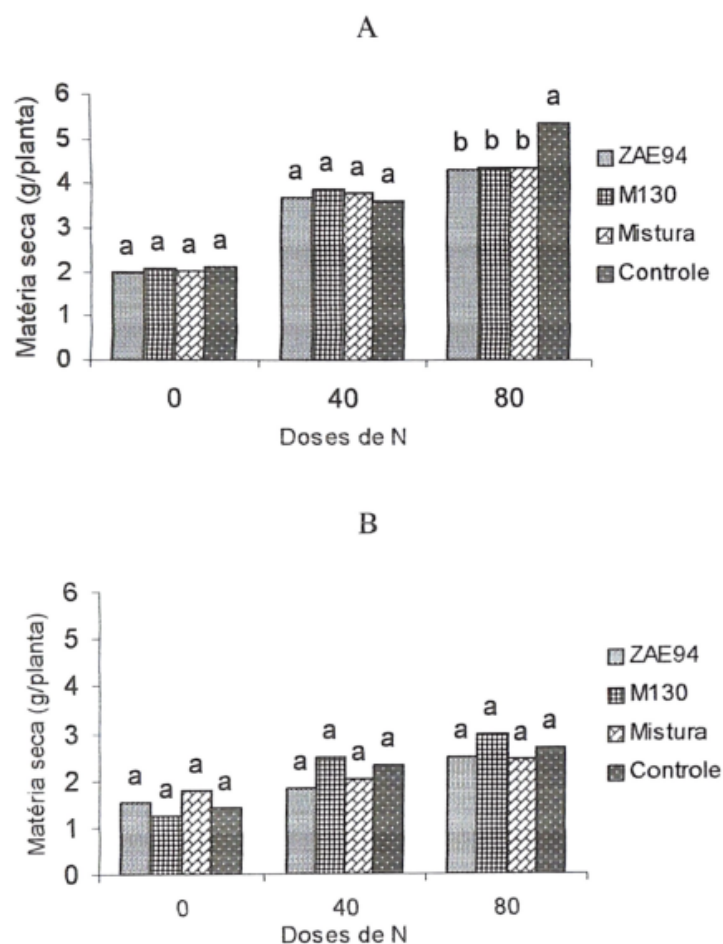
O acúmulo de matéria seca (AMS) da parte aérea das plantas foi influenciado significativamente, pela aplicação de nitrogênio, sendo os maiores acúmulos observados nas plantas que receberam uma dose correspondente a 80 kgN/ha (Figuras 2 e 3). Em experimento em casa de vegetação, SUBBA RAO et al. (1979) citados por RAO et al., (1987), observaram incrementos na produção de arroz com adubações de até 120 kgN/ha. Efeitos conjuntos da inoculação têm sido observados quando são aplicados até 60 kgN/ha, sugerindo que a inoculação das bactérias diazotróficas combinada com a adubação nitrogenada, pode aumentar a produção (RAO et al., 1987).



**Figura 2:** Peso da matéria seca (g/planta) da parte aérea das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

De um modo geral, na cultivar IR42, a inoculação das bactérias diazotróficas em conjunto com a aplicação do nitrogênio mineral, modificou o AMS das plantas (Figuras 2A e 3A). No período vegetativo, quando foi utilizado 80 kgN/ha, a inoculação conjunta das estirpes M130 de “*B. brasilensis*” e ZAE94 de *H. seropedicae*, promoveu um aumento significativo de 88% no AMS em relação ao tratamento controle. Porém, este mesmo tratamento de inoculação, em conjunto com a aplicação da dose de 40 kgN/ha, ocasionou uma redução significativa de 41% no AMS das plantas. No entanto, nas plantas que não

receberam nitrogênio mineral, a inoculação da estirpe ZAE94 proporcionou um aumento de 43% no AMS, embora este aumento não se diferenciase estatisticamente do tratamento controle (Figura 2A). No período de florescimento, também foi observada uma redução no AMS em função da inoculação, sendo que todos os tratamentos inoculados não diferiram ou foram significativamente menores do que o controle não-inoculado (Figura 3A).



**Figura 3:** Peso da matéria seca (g/planta) da parte aérea das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

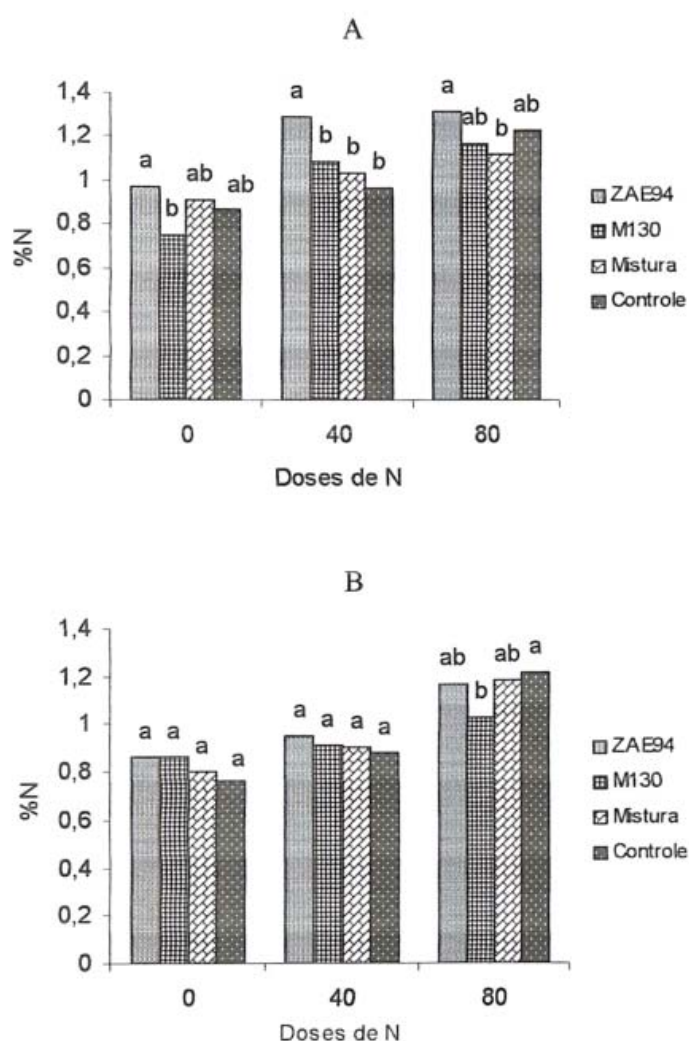
Na cultivar IAC4440, não foram observados efeitos significativos da inoculação no AMS das plantas (Figuras 2B e 3B). Porém, no período vegetativo, nas plantas que receberam 40 e 80 kgN/ha e foram inoculados com a estirpe ZAE94, foi observado um aumento não-significativo de 11 e 7%, respectivamente (Figura 2B). Já as plantas que não receberam nitrogênio e foram inoculadas com a mistura de bactérias, apresentaram, no período vegetativo (Figura 2B) e de florescimento (Figuras 3B), incrementos não-significativos de 21 e 23 %, respectivamente, no AMS, em relação as plantas controle.

GUIMARÃES (2001) verificou que o acúmulo de matéria seca das plantas da cultivar IR42 no período de enchimento de grãos, foi reduzido pela inoculação das estirpes M130 e ZAE94. Entretanto, na cultivar IAC4440, a inoculação de M130 promoveu aumentos de até 23% no acúmulo de matéria seca. MACHADO et al., (1998) observou que

a inoculação de milho com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, foi capaz de incrementar o peso da matéria seca e o conteúdo de nitrogênio dos grãos em plantas adubadas com 100 kgN/ha.

### 3.3. Percentagem de nitrogênio

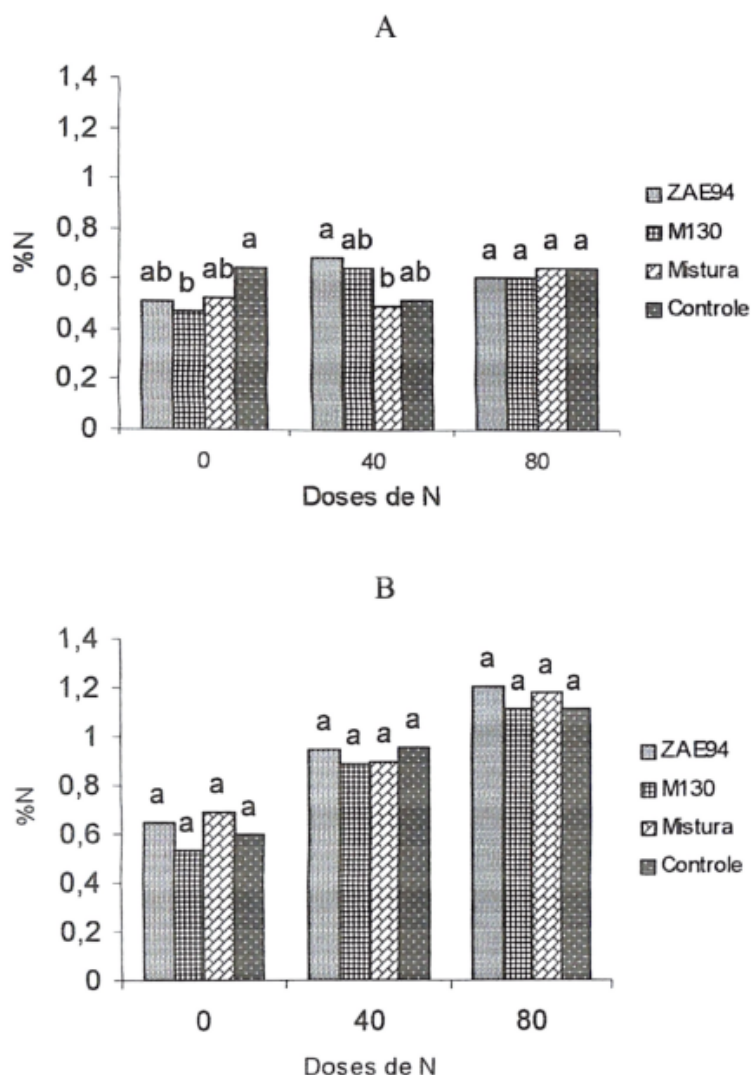
A percentagem de nitrogênio (%N) presente nos tecidos da parte aérea, aumentou com a dose de adubo nitrogenado aplicado nas plantas de arroz. No período vegetativo, a cultivar IR42 teve uma %N superior à da IAC4440 (Figura 4), enquanto no período de florescimento o comportamento foi inverso (Figura 5).



**Figura 4:** Percentagem de nitrogênio (%N) da parte aérea das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

No período vegetativo, a inoculação da estirpe ZAE94 aumentou significativamente a %N da cultivar IR42, independentemente da aplicação de nitrogênio mineral, sendo observados aumentos de até 34% nas plantas que receberam 40 kgN/ha, em relação ao

controle (Figura 4A). No período de florescimento, estes mesmos tratamentos (inoculação de ZAE94 em conjunto com aplicação de 40 kgN/ha), promoveram um aumento de 32%, embora sem diferir estatisticamente do tratamento controle. (Figura 5A).



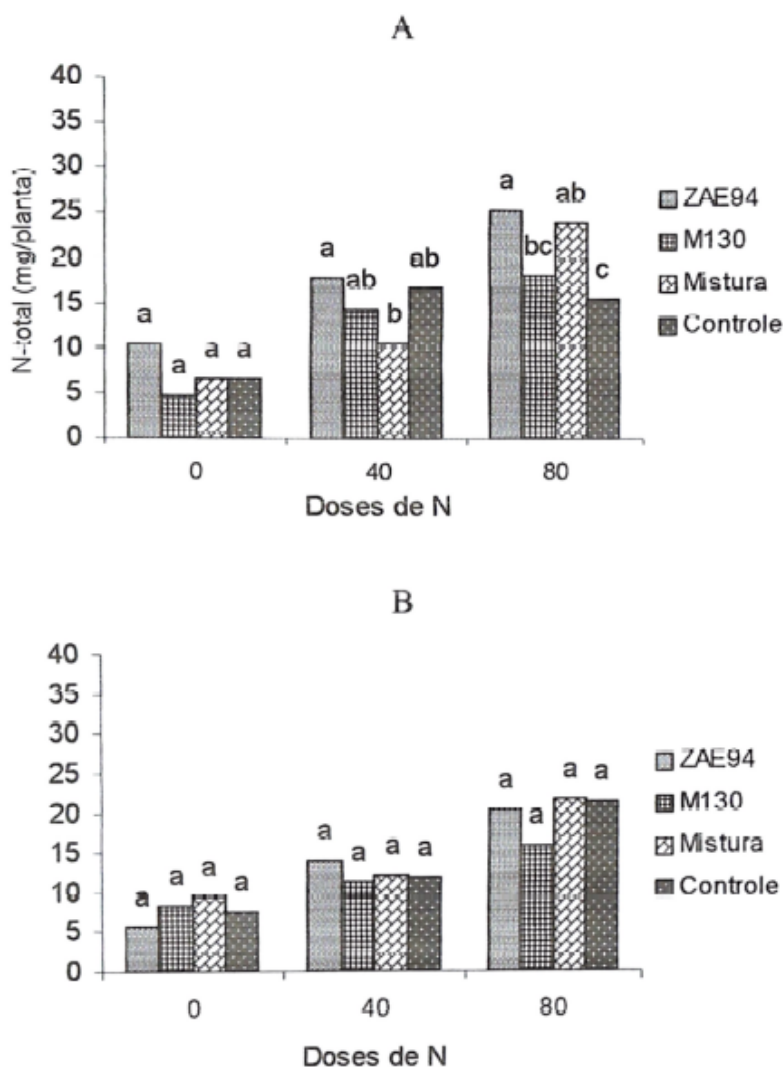
**Figura 5:** Percentagem de nitrogênio (%N) da parte aérea das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

Foram observados efeitos significativos da inoculação na cultivar IAC4440 no período vegetativo quando as plantas foram adubadas com 80 kgN/ha. Entretanto, as plantas inoculadas com a estirpe M130, apresentaram uma redução significativa de 15% em relação ao controle (Figura 4B).

Esta tendência de o acúmulo de nitrogênio na planta ocorrer principalmente no período vegetativo, também foi observada por GOMES (2002) trabalhando com variedades de cana-de-açúcar não-inoculadas. O autor concluiu que as maiores concentrações de nitrogênio na planta, ocorreram no período inicial de crescimento quando também foram observadas as maiores populações de bactérias diazotróficas endofíticas.

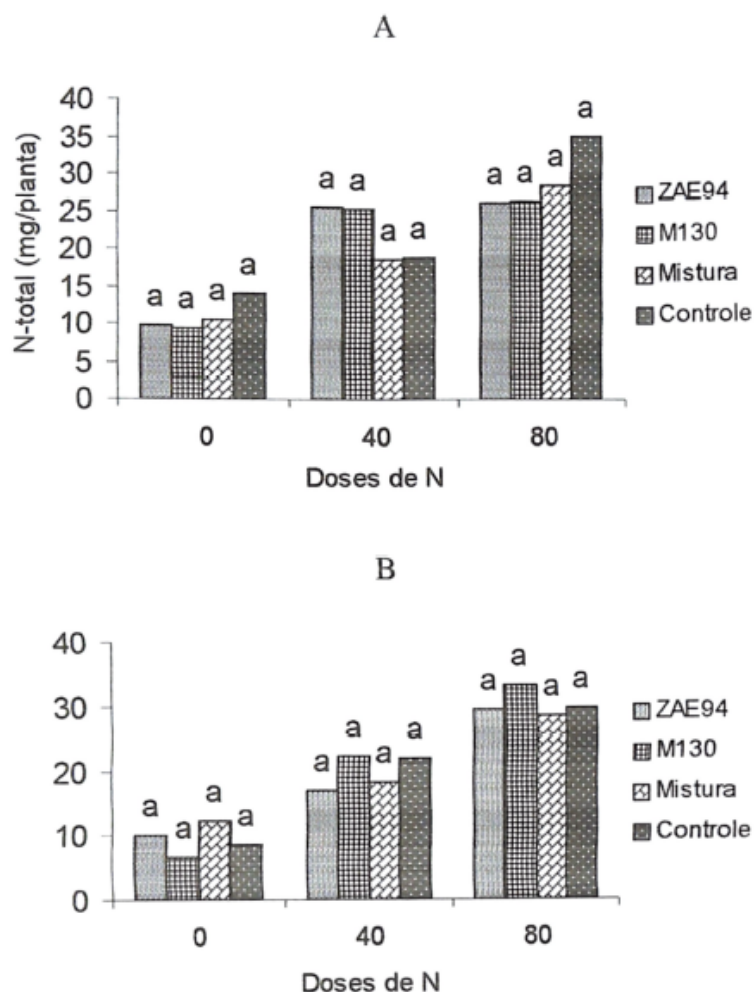
### 3.4. Acúmulo total de nitrogênio

O acúmulo total de nitrogênio (N-Total) na parte aérea das plantas, também foi incrementado pela aplicação do nitrogênio mineral, principalmente na dose de 80 kgN/ha (Figuras 6 e 7).



**Figura 6:** Acúmulo total de nitrogênio (N-Total) da parte aérea das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

Porém os efeitos significativos da inoculação, só foram observados no período vegetativo da cultivar IR42, onde a inoculação da estirpe ZAE94, promoveu os maiores acúmulos de N nos tecidos das plantas (Figura 6A). Cabe ressaltar, que na dose de 80 kgN/ha, tanto as plantas inoculadas com ZAE94 quanto as plantas inoculadas com a mistura de bactérias, apresentaram um teor de N-total significativamente superior ao das plantas não-inoculadas. Como o acúmulo total de N é função da %N e do acúmulo de matéria seca, este resultado é devido ao fato das plantas inoculadas com ZAE94 terem apresentado a maior %N (Figura 4A) e as inoculadas com a mistura o maior AMS (Figura 2A).



**Figura 7:** Acúmulo total de nitrogênio (N-Total) da parte aérea das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

RODRIGUES et al. (2000) observaram uma maior %N nos grãos das plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense* e que não receberam adubação nitrogenada. BALDANI et al. (1987) observaram um aumento no peso seco, %N e acúmulo total de nitrogênio, em plantas de trigo, inoculados com a estirpe Sp245 de *A. brasilense*, em relação ao tratamento controle, quando adubados com 15 kgN/ha. No entanto, os tratamentos inoculados com a estirpe Sp7 de *A. brasilense*, e que receberam adubação de 60 kgN/ha, houve uma redução significativa no peso seco das plantas.

### 3.5. Compostos nitrogenados

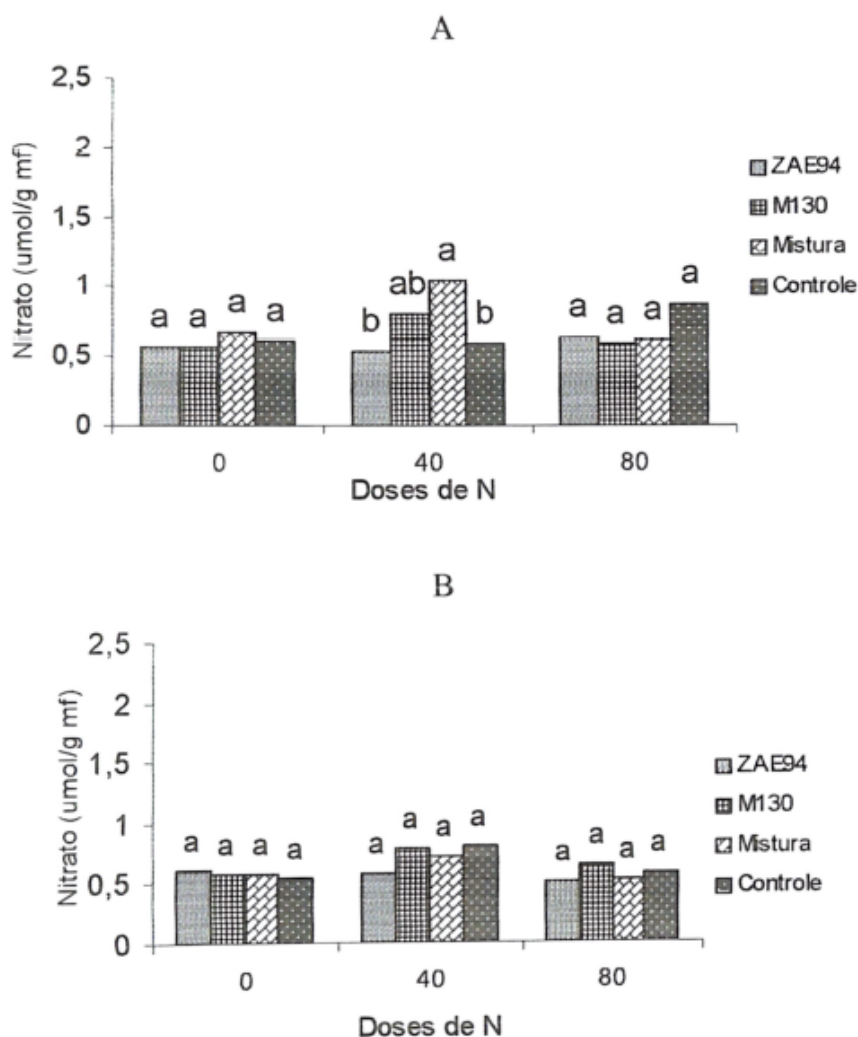
#### 3.5.1. Nitrato

Um maior acúmulo de N nos tecidos, na forma de nitrato foi observado nas folhas das plantas em comparação com as raízes. Em contraste com os parâmetros anteriores, não foi possível observar o efeito da aplicação do nitrogênio mineral na concentração de nitrato.



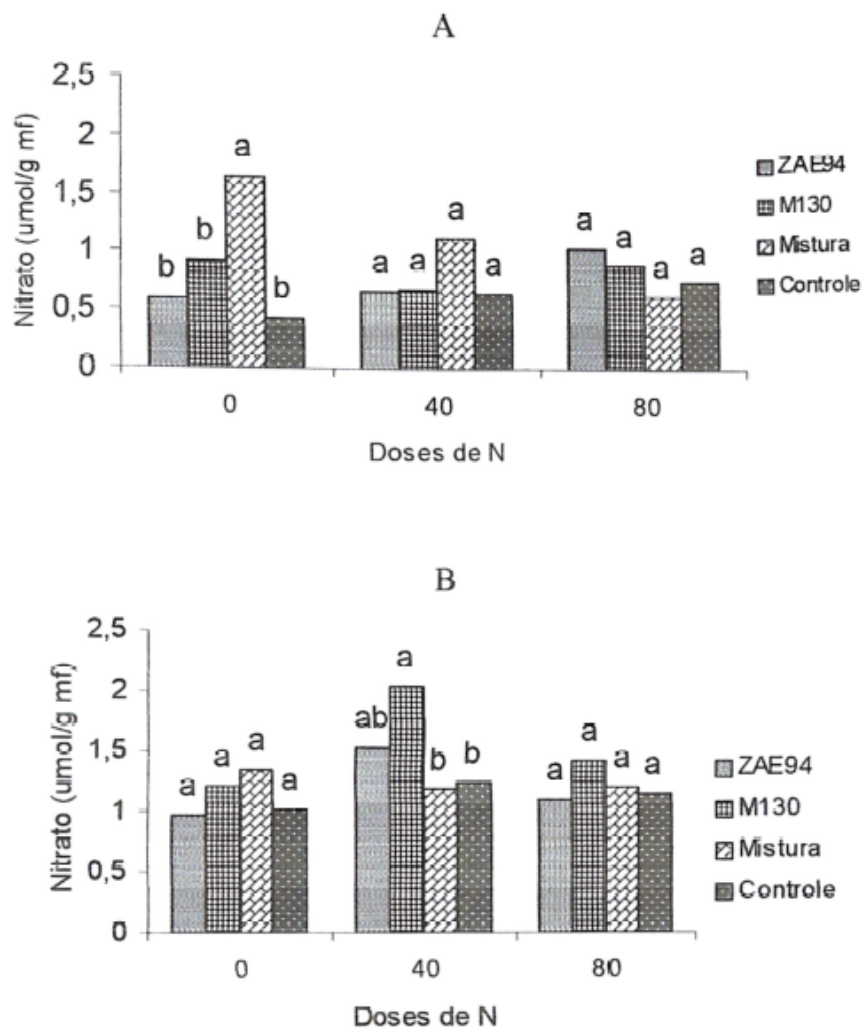
Ou seja, a concentração de nitrato variou, independentemente da aplicação de nitrogênio (Figuras 8, 9, 10 e 11).

A concentração de nitrato nas raízes, no período vegetativo, só apresentou efeitos significativos da inoculação, nas plantas da cultivar IR42 adubadas com 40 kgN/ha, sendo que as plantas inoculadas com a mistura de bactérias apresentaram um aumento de 78%, em relação ao controle não inoculado (Figura 8A). Nas folhas desta cultivar, as plantas que foram inoculadas com a mistura de bactérias, e que não receberam nitrogênio ou receberam uma dose equivalente à 40 kgN/ha, apresentaram um aumento de 281% e 75%, respectivamente, em relação ao tratamento controle (Figura 9A). Na cultivar IAC4440, a inoculação da estirpe M130, em conjunto com a aplicação de 40 kgN/ha, promoveu um aumento de 64% na concentração de nitrato nos tecidos da folhas (Figura 9B).



**Figura 8:** Teor de nitrato ( $\mu\text{moles/g}$  de matéria fresca) presente nas raízes das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

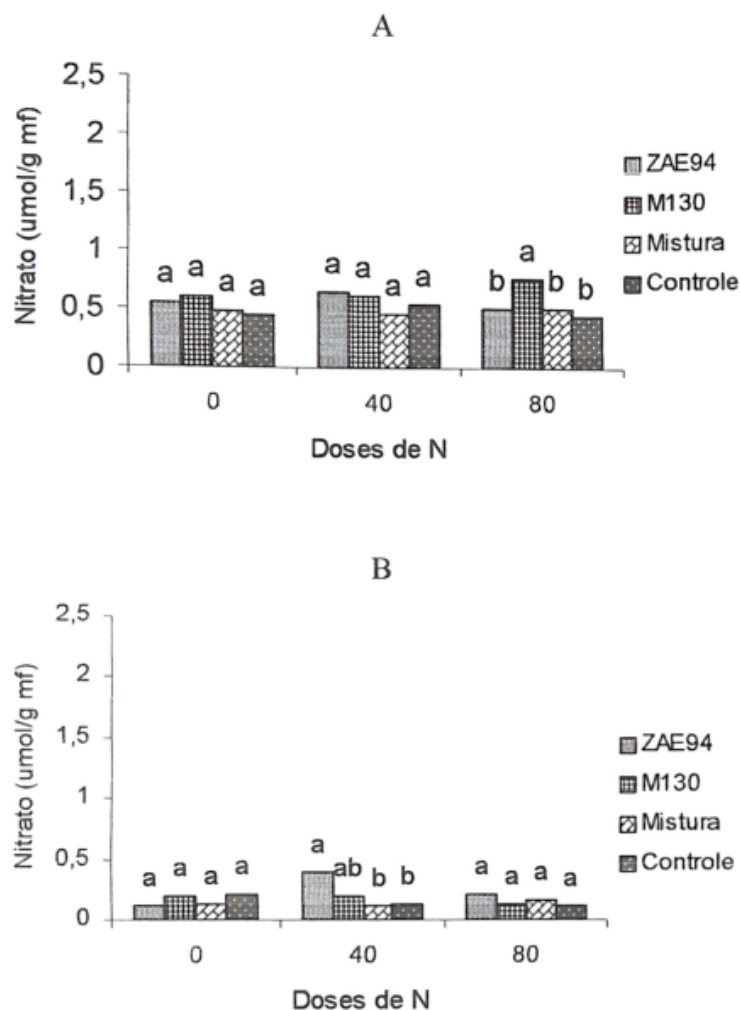




**Figura 9:** Teor de nitrato ( $\mu\text{mol/g}$  de matéria fresca) presente nas folhas das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

No período de florescimento, as maiores concentrações de nitrato nas raízes da cultivar IR42, foram observadas nas plantas do tratamento com 80 kgN/ha e inoculadas com a estirpe M130 (Figura 10A), enquanto que na cultivar IAC4440 foram os tratamentos que receberam 40 kgN/ha e inoculados com a estirpe ZAE94 (Figura 10B). No entanto, nas plantas da cultivar IR42 que receberam uma dose equivalente à 80 kgN/ha, a inoculação reduziu a concentração de nitrato nas folhas (Figura 11A). Na cultivar IAC4440, as plantas que receberam nitrogênio (40 ou 80 kgN/ha) e que foram inoculadas com a mistura de bactérias, apresentaram um aumento de 127% e 65%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 11B).

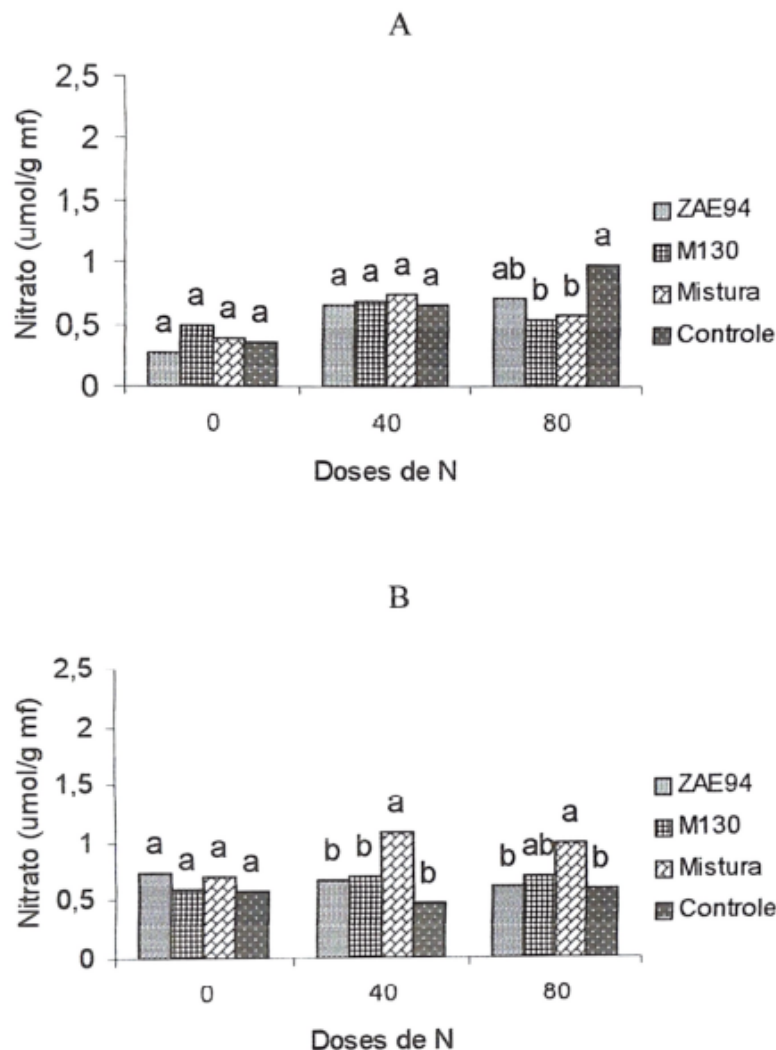
Esta variação na concentração do nitrato nas raízes e folhas das plantas (Figuras 8, 9, 10 e 11), ocorre porque as raízes das plantas normalmente não acumulam  $\text{NO}_3^-$ , mas o translocam para a parte aérea para ser reduzido, embora outras prefiram reduzir o nitrato na raiz. Além disto, a compartimentalização do nitrato nos tecidos das plantas permite que os níveis de nitrato variem, enquanto os níveis de N-amino livre permanecem constantes (FERNANDES, 1978).



**Figura 10:** Teor de nitrato ( $\mu\text{moles/g}$  de matéria fresca) presente nas raízes das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

Cabe ressaltar que a presença do nitrato no tecido de plantas de arroz cultivado em sistema de inundação, pode indicar que uma parte do nitrogênio do solo poderia estar sendo nitrificado na rizosfera do arroz (URQUIARGA et al., 1993). Este processo de nitrificação do fertilizante aplicado na forma amoniacal, já foi observado por outros autores. FERNANDES et al. (1978) trabalhando com *Brachiaria* cultivada em vasos com areia não-estéril, detectou um incremento na atividade da nitrato redutase, quando  $\text{NH}_4^+$  foi aplicado nas plantas. Porém, como nas mais variadas condições ambientais, a absorção do  $\text{NH}_4^+$  pelas plantas é mais rápida do que a de  $\text{NO}_3^-$  (FERNANDES, 1978), pode ser que parte do nitrogênio aplicado, possa estar sendo perdido junto com o nitrogênio do solo, no processo de nitrificação/desnitrificação que ocorre na rizosfera do arroz (ARTH et al., 1998). Por outro lado, BALDAM et al (1979), observou em milho, uma correlação negativa entre a atividade da nitrato redutase e da nitrogenase na presença de 80 KgN/ha e propôs que a bactéria poderia estar contribuindo para a redução do  $\text{NO}_3^-$  nas raízes das plantas. FERREIRA et al., (1987), observou em condições monoaxênicas, que ocorria um aumento na atividade da nitrato redutase das raízes das plantas inoculadas com a estirpe original ou com as mutantes (deficientes na atividade da nitrato redutase) de *Azospirillum brasilense*,

independente do nível de aplicação de nitrato. No entanto, nas folhas quando foram utilizados 10mM de  $\text{NO}_3^-$ , as estirpes originais reduziram a atividade, enquanto as que as mutantes tiveram até mais de 100% de aumento, em relação ao controle não inoculado.



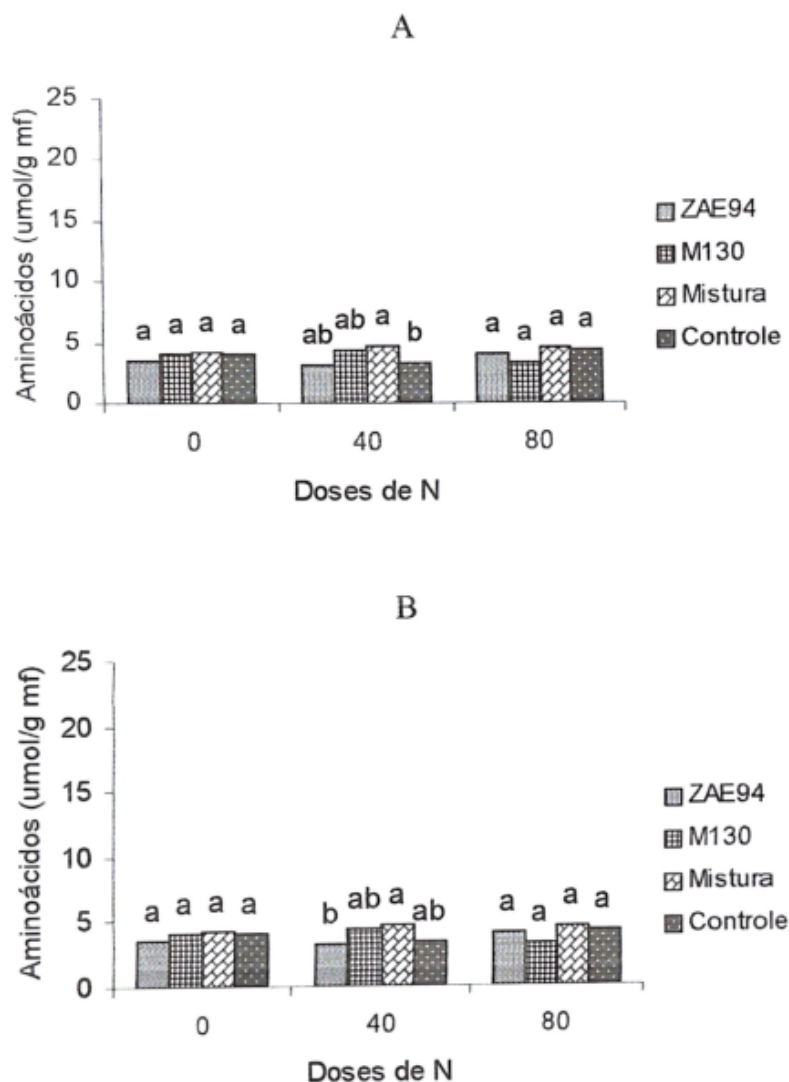
**Figura 11:** Teor de nitrato ( $\mu\text{moles/g}$  de matéria fresca) presente nas folhas das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento, em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

### 3.5.2. Aminoácidos livres

A concentração de aminoácidos nas raízes das plantas, tanto no período vegetativo quanto no de florescimento, variou independentemente da aplicação do nitrogênio mineral (Figuras 12, 13, 14 e 15).

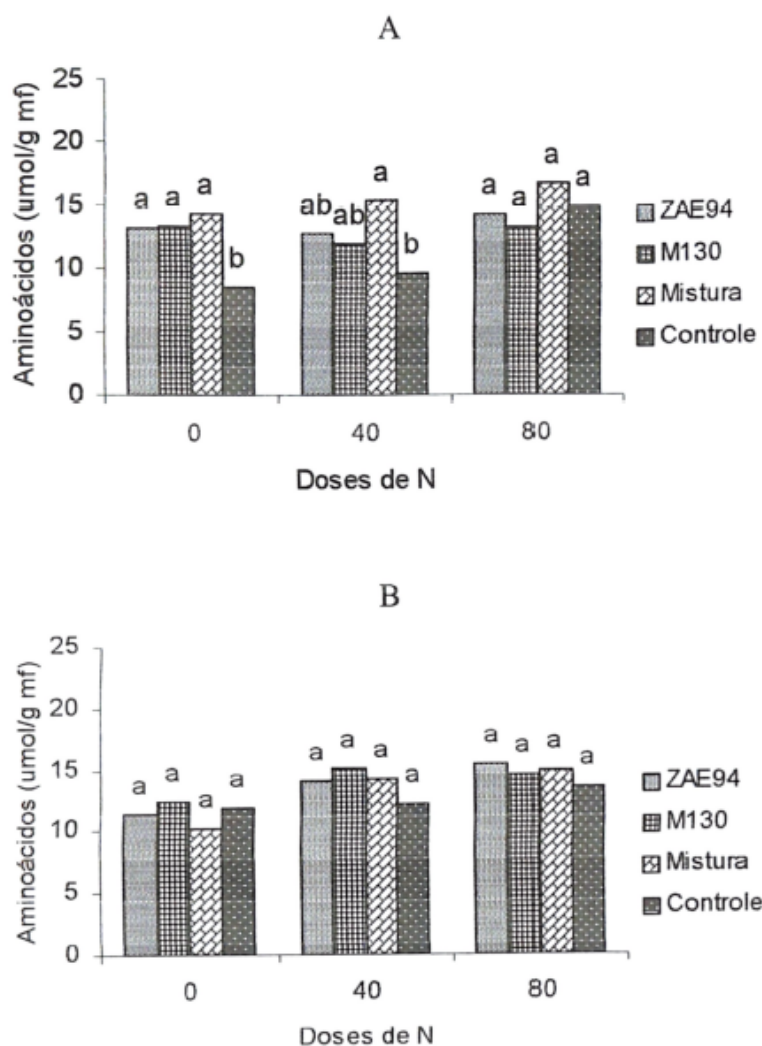
No período vegetativo, a inoculação da mistura de bactérias em conjunto com a aplicação de 40 kgN/ha, proporcionou os maiores acúmulos de aminoácidos nas raízes das plantas. Nos tratamentos não-inoculados, foram observados aumentos de 74% e 43%, para as variedades IR42 e IAC4440, respectivamente (Figuras 12A e 12B). Nas folhas da cultivar IR42, a aplicação do nitrogênio, tendeu a aumentar a concentração de aminoácidos nos tecidos, sendo que para as plantas não-inoculadas, a maior resposta foi observada com a aplicação de 80 kgN/ha, com um aumento de 76% em comparação com as plantas que não

receberam nitrogênio (Figura 13A). Na cultivar IAC4440, a aplicação do N mineral proporcionou aumentos na concentração de aminoácidos nas folhas, porém não foram observadas diferenças significativas entre a aplicação de 40 kgN/ha ou 80 kgN/ha (Figura 13B).



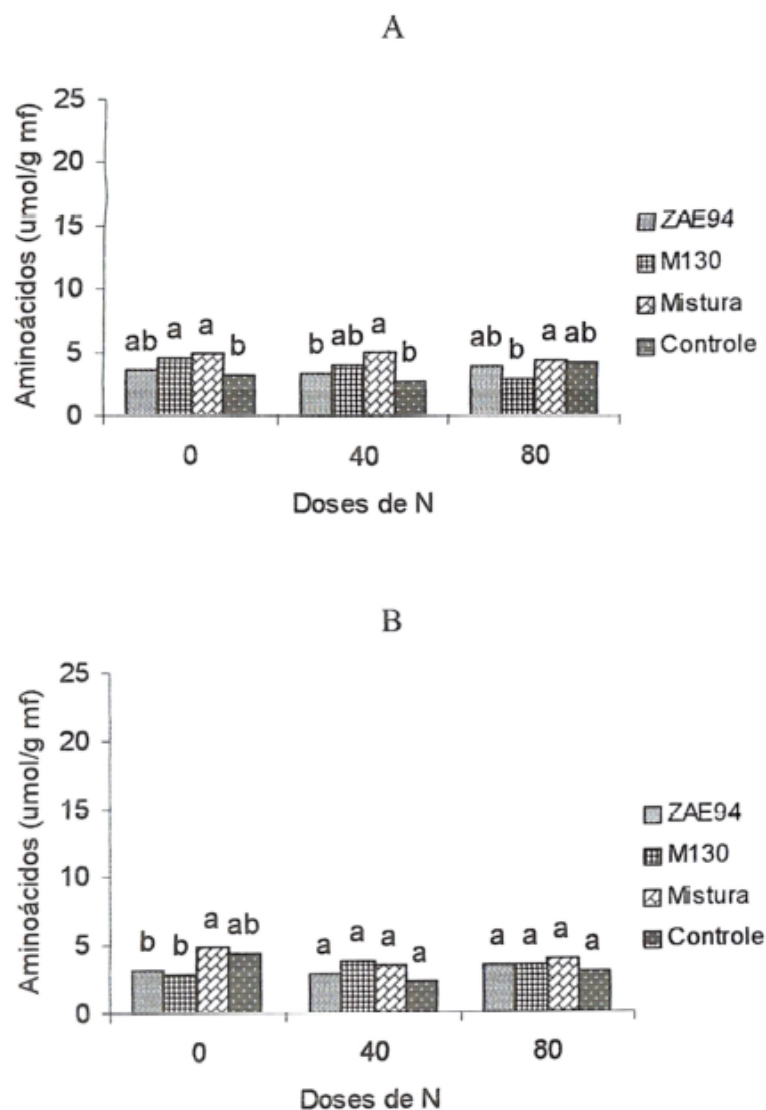
**Figura 12:** Teor de aminoácidos livres ( $\mu\text{moles/g}$  de matéria fresca) presente nas raízes das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

Com exceção das plantas que receberam 80 kgN/ha, a inoculação aumentou a concentração de aminoácidos nas folhas das plantas da cultivar IR42. Porém, independente da aplicação de nitrogênio, as plantas inoculadas com a mistura, apresentaram as maiores concentrações de aminoácidos nas folhas (Figura 13A). No entanto, na cultivar IAC4440, não foram observados efeitos da inoculação das bactérias dizotróficas, na concentração de aminoácidos nas folhas das plantas (Figura 13B).



**Figura 13:** Teor de aminoácidos livres ( $\mu\text{mol/g}$  de matéria fresca) presente nas folhas das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

No período de florescimento, as maiores concentrações de aminoácidos nas raízes da cultivar IR42, foram observadas nas plantas inoculadas com a mistura de bactérias, independentemente da aplicação do nitrogênio. No caso dos tratamentos com 40 kgN/ha, a inoculação da mistura das bactérias causou aumentos de 79% em relação ao controle (Figura 14A). Na cultivar IAC4440 não foram observados efeitos da inoculação para os tratamentos nitrogenados. Porém, as plantas que não receberam nitrogênio, a inoculação da mistura das bactérias proporcionou a maior concentração de aminoácidos nas raízes, apesar de não diferir do controle não-inoculado (Figura 14B). Nas folhas da cultivar IR42, a concentração de aminoácidos tendeu a diminuir com a aplicação de nitrogênio (Figura 15A), enquanto que na cultivar IAC4440, foi observado o comportamento inverso, ou seja, a concentração de aminoácidos aumentou em função do nitrogênio (Figura 15B). Além disto, nas duas cultivares, não foram observados efeitos significativos da inoculação. Porém de uma maneira geral, na cultivar IR42 a inoculação tendeu a diminuir a concentração de aminoácidos (Figura 15A), e na IAC4440 ocorreu o oposto, com a inoculação tendendo a aumentar a concentração de aminoácidos (Figura 15B).

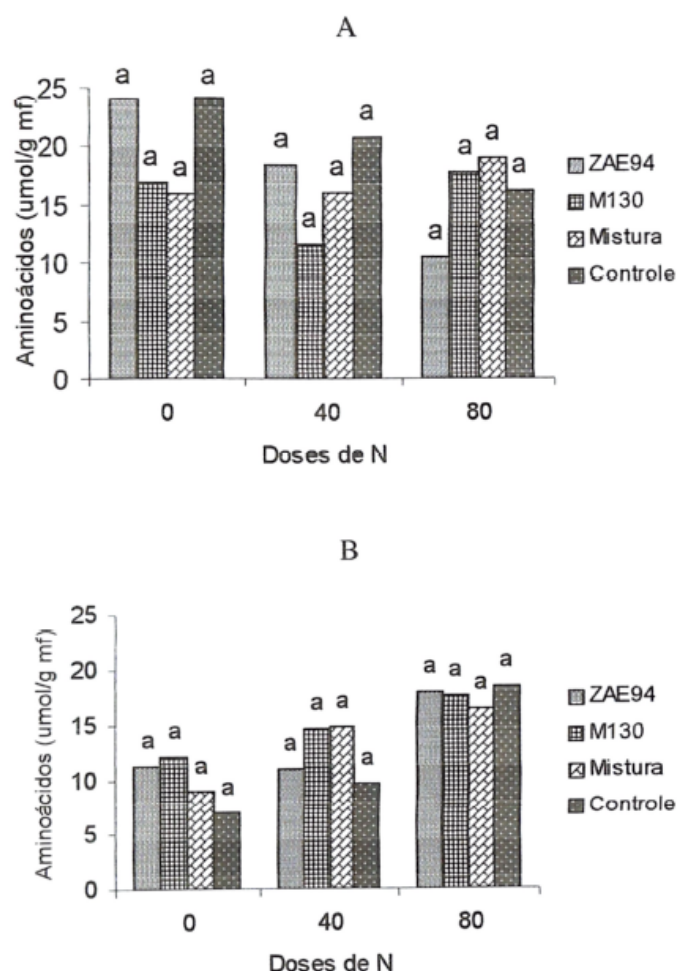


**Figura 14:** Teor de aminoácidos livres ( $\mu\text{moles/g}$  de matéria fresca) presente nas raízes das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

FERNANDES (1974) citado por FERNANDES (1978) demonstrou que quantidades excessivas de N na forma amoniacal (150 ppm) podem levar a um acúmulo de N-amino livre, que se reflete em uma redução no peso fresco das plantas, sendo este acúmulo influenciado pelas condições de luz e temperatura. FERNANDES (1990) observou que uma relação negativa entre os teores de N-amino livres no tecido e a matéria fresca das plantas tem sido encontrada, independente dos fatores que causaram o acúmulo de N-amino. Neste sentido, FERNANDES (1991), trabalhando com plantas de arroz no início do ciclo, sob diferentes condições de luz e temperatura, observou que concentrações de aminoácidos solúveis em torno de  $20 \mu\text{moles/g}$  de matéria fresca, foram encontradas em plantas sob nutrição nitríca de até 150 ppm, enquanto que plantas supridas com até 20 ppm de N, na forma amoniacal, acumularam até  $48,8 \mu\text{moles/g}$ , peso fresco na parte aérea. Além disso, também foi observado que em ambientes com baixa disponibilidade de energia metabólica (luz e/ou temperatura), o acúmulo de matéria fresca nas plantas estava positivamente correlacionado com o acúmulo de aminoácidos livres nos tecidos. Em variedades de cana-



de-açúcar não-inoculadas, GOMES (2002) observou uma correlação positiva entre a população de *Herbaspirillum* spp e a concentração de N-amino livre. Já MACHADO et al. (1998) demonstraram a ocorrência de correlação positiva entre as bactérias *Azospirillum amazonense* e a atividade da GS, principalmente nas raízes das plantas de milho. Além disto, as bactérias diazotróficas podem excretar amônio nos espaços intercelular das raízes, aumentando a disponibilidade deste íon no sistema radicular (CRISTIANSEN-WENINGER & WANDELEYDEN, 1994 citado MACHADO et al., 1998).

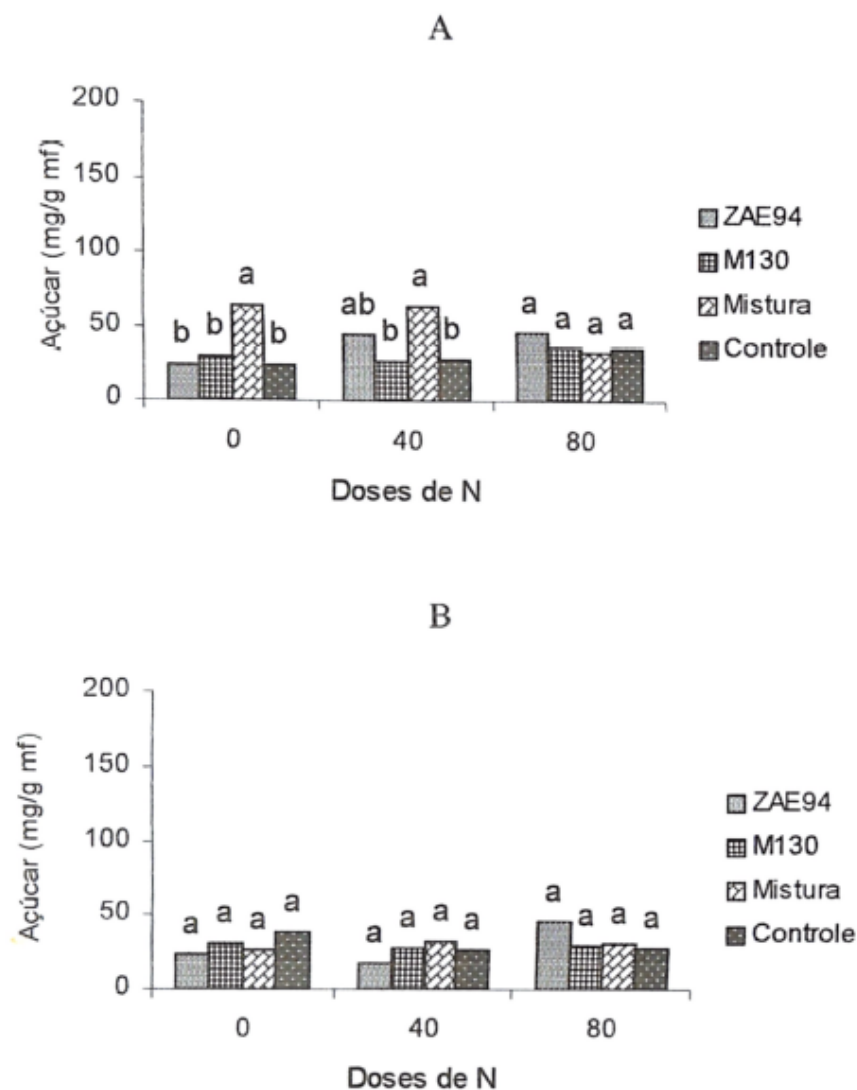


**Figura 15:** Teor de aminoácidos livres (µmoles/g de matéria fresca) presente nas folhas das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

### 3.5.3. Açúcar Solúvel

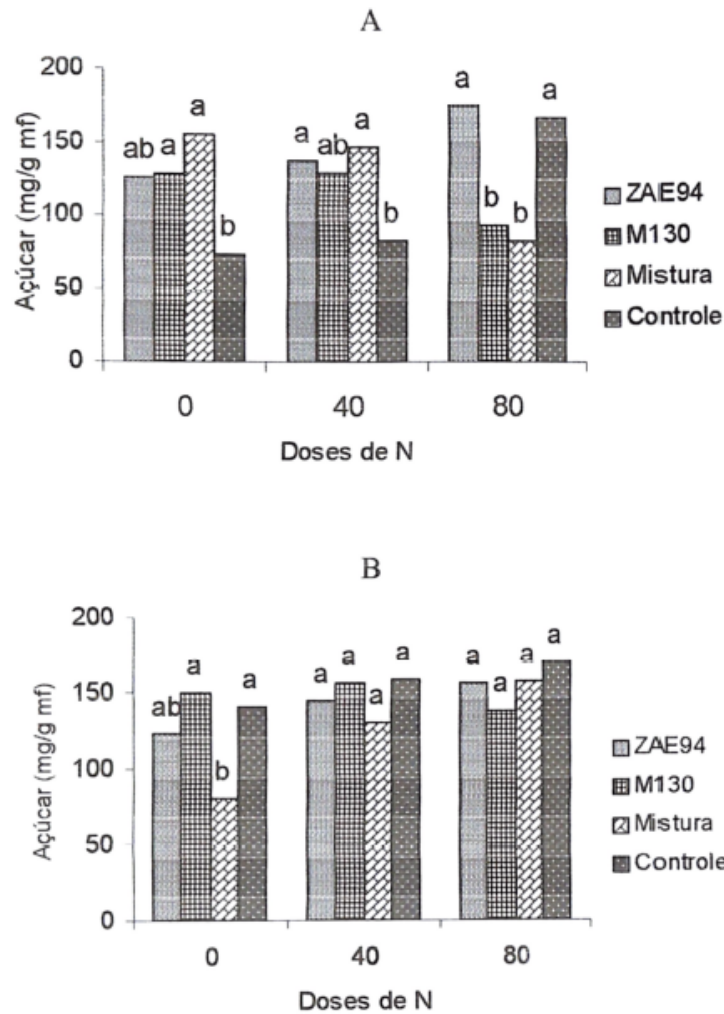
No período vegetativo, somente as plantas que foram inoculadas com ZAE94, apresentaram um aumento da concentração de açúcar solúvel nas raízes em função da aplicação do nitrogênio mineral. Os tratamentos com 80 kgN/ha apresentaram aumentos de até 94%, em relação ao tratamento sem nitrogênio (Figuras 16A e 16B). Nas folhas da cultivar IR42, foi observado um efeito diferenciado da aplicação de nitrogênio em relação à inoculação. As plantas não-inoculadas ou as inoculadas com a estirpe ZAE94, apresentaram

a maior concentração de açúcar nas folhas, quando foi aplicada uma dose equivalente à 80 kgN/ha enquanto que nas plantas inoculadas com a estirpe M130 ou com a mistura de bactérias o comportamento foi inverso, com as maiores concentrações sendo observadas quando o nitrogênio não foi aplicado (Figura 17A). Já na cultivar IAC4440, de um modo geral, a aplicação do nitrogênio, tendeu a aumentar a concentração de açúcar nas folhas (Figura 17B).



**Figura 16:** Teor de açúcares solúveis ( $\mu$ moles/g de matéria fresca) presente nas raízes das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.





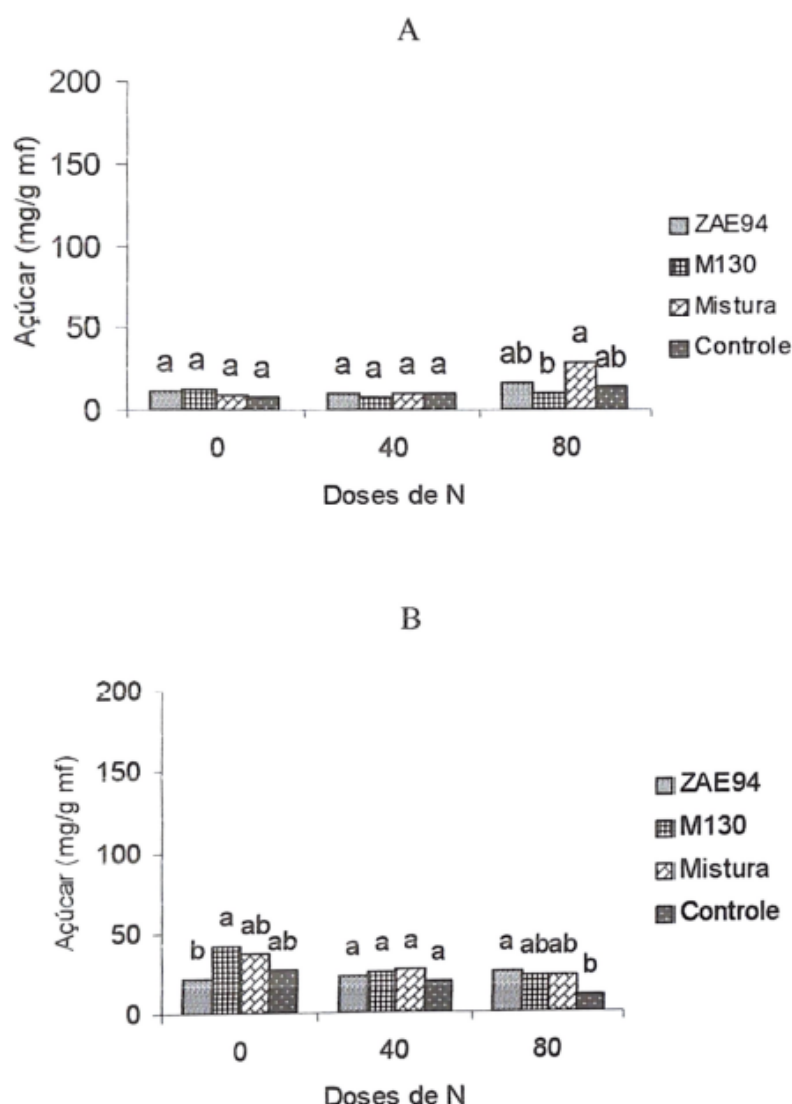
**Figura 17:** Teor de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles/g}$  de matéria fresca) presente nas folhas das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período vegetativo em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

Com relação à inoculação, no período vegetativo, tanto nas raízes quanto nas folhas das plantas da cultivar IR42, nos tratamentos que não receberam nitrogênio ou nos adubados com 40 kgN/ha, a inoculação da mistura de bactérias proporcionou as maiores concentrações de açúcar nos tecidos (Figuras 16A e 17A). Porém, nas plantas da cultivar IAC4440 que não receberam nitrogênio, a inoculação conjunta das estirpes reduziu em 42% a concentração de açúcar nas folhas (Figura 17B).

No período de florescimento, foi observada uma tendência de aumento na concentração de açúcar nas raízes da cultivar IR42 que receberam a aplicação de nitrogênio (Figura 18A). Já na cultivar IAC4440, ao contrário do que ocorreu no período vegetativo, as maiores concentrações foram observadas nos tratamentos sem aplicação de nitrogênio (Figura 18B).

Efeitos positivos da inoculação na cultivar IR42 somente foram observados nos tratamentos com 80 kgN/há, sendo que nas raízes das plantas, a inoculação da mistura das bactérias promoveu um aumento de 107% em relação ao controle, embora sem diferir estatisticamente do controle não-inoculado (Figura 18A). Já nas folhas, a inoculação da estirpe M130 aumentou em 43% a concentração de açúcar nos tecidos, em relação ao

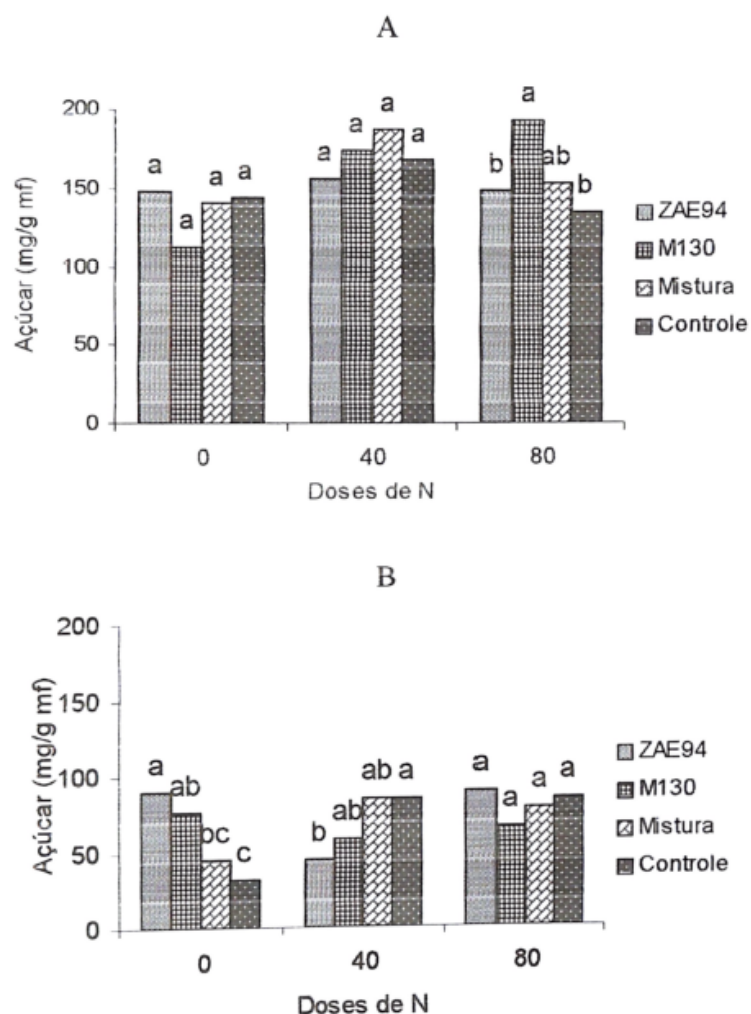
controle (Figura 19A). Por outro lado na cultivar IAC4440, foi observada uma grande variabilidade nos teores de açúcar solúveis. Nas raízes, as plantas que não receberam nitrogênio apresentaram a maior concentração quando foram inoculadas com a estirpe M130, e nos tratamentos com 80 kgN/ha, a inoculação da estirpe ZAE94, promoveu um aumento de 165% em relação ao controle não-inoculado (Figura 18B). Nas folhas das plantas que não receberam nitrogênio, a inoculação da estirpe ZAE94 promoveu um aumento de 189%, em relação ao controle. Porém, com a aplicação de 40 kgN/ha, ocorreu um efeito negativo, tendo a inoculação desta mesma estirpe reduzido em 48% a concentração de açúcar nas folhas (Figura 19B).



**Figura 18:** Teor de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles/g}$  de matéria fresca) presente nas raízes das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições.

Trabalhando com cana-de-açúcar, GOMES (2002), observou que as populações nativas de *Ilerbaspirdluni* spp das raízes das plantas, aos 90 dias após o plantio se correlacionavam com os açúcares solúveis totais das folhas, porém não foram obtidas correlações entre as concentrações de sacarose e açúcar solúvel e as populações de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. MAGALHÃES et al. (1993) observou que houve

uma redução no acúmulo de açúcar solúvel das folhas de milho adubadas com  $\text{NH}_4^+$ , comparadas com aquelas adubadas com  $\text{NO}_3^-$ , devido ao alto requerimento de esqueletos de carbono necessários para incorporar o  $\text{NH}_4^+$ . SOUZA et al. (1999) observaram que plantas de arroz que receberam duas aplicações de nitrogênio (60 + 60 kgN/ha) depois da antese, tiveram um acúmulo de açúcar solúvel menor ou igual ao controle não adubado. Entretanto estes mesmos autores destacam que onde foi observado a redução na concentração de açúcar também houve um aumento na concentração de aminoácidos livres na folha bandeira da planta, o que poderia indicar uma deficiência de energia metabólica para incorporação do N aplicado.



**Figura 19:** Teor de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles/g}$  de matéria fresca) presente nas folhas das cultivares de arroz IR42 (A) e IAC4440 (B), no período de florescimento em experimento sob condições de vasos ao ar livre. Média de 4 repetições

#### 4. CONCLUSÕES

As maiores populações de “*Burkholderia brasilensis*” e *Herbaspirillum seropedicae* foram observadas nas raízes das plantas, no período de florescimento.

Na cultivar IR42, o acúmulo de matéria seca da parte aérea das plantas dos tratamentos inoculados, foi menor do que o controle não inoculado. No entanto, a inoculação da estirpe ZAE94 promoveu as maiores percentagem de N.

A inoculação conjunta de *H. seropedicae* e “*B. brasilensis*”, promoveu os maiores acúmulos de nitrato, aminoácidos livres e açúcares solúveis na raiz e parte aérea das plantas, principalmente nos tratamentos com 40 kgN/ha, no período vegetativo da cultivar IR42

A inoculação das bactérias diazotróficas modificou o metabolismo de nitrogênio e este efeito foi diferenciado em função da variedade e da dose de nitrogênio aplicada.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Da mesma forma que foi observado nas raízes e folhas, na base do colmo e no coimo (dados não apresentados), os teores de açúcar parecem não ter sido influenciados por aumentos na concentração de aminoácidos livres nas diferentes partes da planta. Estes resultados diferiram dos encontrados por FERNANDES (1991), conduzido sob diferentes condições de luz e temperatura, onde o aumento do acúmulo de N-amino livre resultou em redução no teor de açúcar solúvel nos tecidos das plantas.

Deste modo, os resultados deste experimento, não permitiram a interpretação do real efeito da inoculação das bactérias diazotróficas no metabolismo de N em plantas de arroz. Neste sentido, foi realizado um segundo experimento em vasos com solo, em condições similares ao anterior (dados não apresentados). Uma análise preliminar da quantificação da FBN, demonstrou que no período vegetativo, não houve contribuição da FBN, tanto nas plantas que não receberam nitrogênio, como naquelas dos tratamentos que receberam 40 KgN/ha (dados não apresentados). Sugerindo que no período vegetativo, as diferenças existentes entre os tratamentos de inoculação, não poderiam ser decorrentes da FBN. Isto pode ter ocorrido em função da idade da planta (50 dias) ou problemas no desenvolvimento já que as plantas se mostraram com coloração amarelada, indicando uma deficiência de nitrogênio ou de outro nutriente. Entretanto, um estudo realizado por CAMPOS (1999) com as duas cultivares, em condições de tanque com solo, mostrou que apesar de não terem sido verificadas diferenças nas populações de "*B. brasilensis*" e *H. seropedicae*, a cultivar IR42 foi capaz de obter uma contribuição da FBN de até 21,8 KgN/ha, enquanto que IAC4440, obteve um maior enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  (menor taxa de fixação de nitrogênio). Por outro lado, GUIMARÃES (2001) observou em experimentos em condições de casa de vegetação e campo, que a cultivar IAC4440 respondeu à inoculação (em comparação as cultivares IR42 e Guarani). O autor observou um aumento de 40% e 50%, na produção de grãos, quando a variedade foi inoculada com a estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* e M209 de "*B. brasilensis*", respectivamente.

É interessante ressaltar que o estudo realizado por NOGUEIRA (2001) em cana-de-açúcar, gerou um catálogo com os genes que possivelmente se expressam preferencialmente, quando as plantas se encontram em associação com bactérias diazotróficas. Além disso, variedades de cana-de-açúcar que são descritas como tendo alta contribuição da FBN, apresentaram correlação entre a atividade da enzima glutamina sintetase e a redução de acetileno.

Desse modo, é preciso que sejam desenvolvidas novas pesquisas, relacionadas a fisiologia das plantas de arroz, determinando os possíveis mecanismos do metabolismo de carbono e/ou nitrogênio que são modificados pela associação com bactérias diazotróficas endofíticas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTH, I.; FRENZEL, P. & CONRAD, R. Denitrification coupled to nitrification in the rizosphere of rice. **Soil Biol. Biochem.**, 30, n. 4, p. 509-515, 1998.

BALDANI, J. I. BLANA, R. A. G. & DOBEREINER, J. Efeito do genótipo do milho na atividade da nitrogenase e da nitrato redutase. **Pesq. Agropec. Bras.**, 14 (2), p. 165-173, 1979.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L. & DOBEREINER, J. Caracterization of *Herbaspirillum seropedicae* nov., sp. a root associated nitrogen fixing bacterium. In: **J. Syst. Bacteriol.** Washington, 36:86-93, 1986.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. & DOBEREINER, J. Recent Advances in BNF non-legume plant. Soil. **Biol. Biochem.**, 29, n° 5/6, p.911-922, 1997.

BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum spp.* no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. RJ: Seropédica: UFRRJ, 1996. Tese de doutorado.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. and DOBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biol Fertil. Soils**, 4: 37-40, 1987.

BALDANI, V.L.D., BALDANI, J. I., DOBEREINER J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Can. J. Microbiol.** 29: 924-929, 1983.

BALOTA, E.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M. & DOBEREINER, J. Promoção do crescimento de plantas por bactérias diazotróficas. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO & ANDRADE, D. DE S. (Eds.) **Anais do III Simpósio Brasileiro sobre microbiologia do solo**, Londrina, p. 374-379, 1994.

BANDURSKI, R. Biological reduction of sulfate and nitrate. In: **Plant Biochemistry**, Bonner and Varner (ed.) Academic Press, N. Y., London, 1965.

BEEVERS, L. & HAGEMAN, R. M. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Rev. Plant Physiol.**, 20:495-522, 1969.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. & DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant Soil.**, v 137, p. 105-112, 1991.

BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation in sugarcane: a key to energetically viable biofuel production, **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.6, p.209-266, 1990.

BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in sugarcane: a key to energetically viable biofuel production, **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.14, p.263-279, 1995.

CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 74, p. 214-219, 1988.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E. & YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Comm. Soil Sci. Pl. Anal.**, 6 (1): 71-80, 1975.

DAWE, D. The potential role of biological nitrogen fixation in meeting future demand for rice and fertilizer. In: LADHA, J. K. and REDDY, P. M. (eds.) **The quest for Nitrogen Fixation in Rice**. Proceedings on the Third Working Group Meeting on Assessing Opportunities for Nitrogen Fixation in Rice, 90-012 Aug. 1999, Los Banos, Laguna, Philippines. Makati city (Philippines). International Rice Research Institute. p1-9, 2000. 354p.

DEDATTA, S. K. **Principles and practices of rice production**. New York: Wiley, 1981. 618p.

DIDONET, A. D.; LIMA, O. S.; CANDATEN, A. A. e RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos em trigo submetido a inoculação de *Azospirillum*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, n. 2, p. 401-411, 2000.

DOBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (eds.). **Microbiologia do solo**. Campinas, 1992.

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

DOBEREINER & BALDANI Endophytic diazotrophs other than rizobia. In: 7<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology. **Abstract**. Santos, São Paulo, 1995.

FERNANDES, M. S. **Absorção e metabolismo de nitrogênio em plantas**. Seropédica: UFRRJ, 1978. 50p. (Boletim técnico, n.1).

FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, 33, n.3. p. 297-301, 1983.

FERNANDES, M. S e SOUZA, S. R. Aquisição de N por plantas. In: FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R. O.; DOBEREINER, J. NEVES, M.C.P.; PIMENTEL, & MIRANDA, R. M. (Eds.) **Anais do I Simpósio Brasileiro sobre N em Plantas**. P. 127-167, Itaguaí, 1993.

FERNANDES, M. S. and ROSSIELLO, R. O. P. Mineral nutrition in plant physiology and plant nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 14 (2): 111-148, 1995.

FERNANDES, M. S. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio sobre a absorção e assimilação de N em arroz. **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal**, 2(1), p. 1-6, 1990.

FERNANDES, M. S. FERREIRA, M. B. and FREIRE, L. R. Efeitos da interação de  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  na atividade da nitrato redutase e acumulação de N-proteico em *Brachiaria*. **Turrialba**, 28, n.3, 1978.

FERNANDES, M. S. Effects of environmental stress on the relationship of free amino-N to fresh weight of rice plants. **Journal of plant nutrition**, 14(11), p.1151-1164, 1991.

FERRAZ JÚNIOR, A. S. de L. **Estudo do teor de proteína e eficiência de uso de nitrogênio em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.)**. Seropédica: UFRRJ, 1993. Tese de mestrado.

FERREIRA, M. C. B **Efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* no metabolismo de nitrogênio mineral em trigo**. Seropédica: UFRRJ, 1985. Tese de Mestrado.

FERREIRA, M. C. B.; FERNANDES, M. S. and DOBEREINER, J. Role of *Azospirillum brasilense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. **Biol. Fertil. Soils**, 4: 47-53, 1987.

FISCHER, K.S. Frontier project on nitrogen fixation in rice: looking ahead. *In*: LADHA, J.K.; REDDY, P.M. (Eds.) **The quest for nitrogen fixation in rice**. p. 25-31. Philippines: IRRI, 2000.

FRANCO, A.A.; BALIEIRO, F. Fixação biológica de nitrogênio: alternativa aos fertilizantes nitrogenados. *In*: SIQUEIRA, J.O. MOREIRA, F.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (Eds.) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras, 1999.

FRANCO, A. A. & DOBEREINER, J. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium-Feijão* e influência de diferentes nutrientes. **Pesq. Agropec. Bras.** 2:467-474, 1967

GUIMARÃES, S. L. **Seleção de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas para inoculação em três cultivares de arroz inundado**. Seropédica: UFRRJ, 2001. Tese de Mestrado.

FRANCO A. A. e NEVES, M. C. P. Fatores limitantes à fixação biológica de nitrogênio. *In*: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas, 1992.

GOMES, A. A. **Distribuição de carboidratos e nitrogênio em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas**, 2002. Tese de Doutorado.

HIREL, B; BERTIN, P.; QUILLERE, I.; BOURDON, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAN, C.; FALQUE, M. & GALLAIS, A. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant in Soil**, 125: 1258-1270, 2001.



HUNGRIA, M. Metabolismo de carbono e do nitrogênio nos nódulos. *In*: HUNGRIA, m. & ARAÚJO, R.S. (Eds). **Manual de métodos empregados em estudo de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 542p.

IBGE: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <[www1.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/1spa/1spa112000206.shtm](http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/1spa/1spa112000206.shtm)>. Acesso em 28/01/2003.

JAIN, D. K. & PATRIQUIN, D. G. Root haft deformation, bacterial attachment and plant growth in wheat- *Azospirillum* association. **Appl. And Environm. Microbiol.**, 48 (6): 1208-1213, 1984.

KAPULNIK, Y.; GAFNY, R.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum* spp. Inoculation on root development and NO<sub>3</sub> uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in Hydroponic system. **Can. J. Bot.** 63: 627-631, 1985.

LADHA, J. K. and REDDY, P. M. Steps toward nitrogen fixation in rice. *In*: LADHA, J. K.; REDDY, P. M. (Eds.) **The quest for nitrogen fixation in rice**. p. 33-46. Philippines: IRRI, 2000.

LEA, P.J. Nitrogen metabolism. **Plant Biochemistry and molecular Biology**. Chichester: John Wiley, p. 155-180, 1993.

LU, B.R. Genetic taxonomy of the genus *Oryza* (Poaceae): historical perspective and current status. **International Rice Research Note (IRRI)**, New Delhi, v. 24, n.3, p. 4-7, 1999.

LU, J., CHANG, T. T. Rice in its temporal and spatial perspectives. *IN* LUH, B.S., ed. **Rice: production and utilization**. Davis, AVI, p. 1-74, 1980.

MACHADO, A. T.; SODEK, L.; DOBEREINER, J. e REIS, V. M. efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesq. Agropec. Bras.**, 33, n.6, 1998.

MACHADO, M. O. Caracterização e adubação do solo. *In*: **Fundamentos para cultura do arroz irrigado**. Campinas: Fundação Cargill, p. 129-179, 1985.

MAGALHÃES, A. C. N. Enzimas da assimilação de N: processos de redução de nitratos em plantas superiores. *In*: FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R. O.; DOBEREINER, J. NEVES, M.C.P.; PIMENTEL, & MIRANDA, R M. (Eds.) **Anais do I Simpósio Brasileiro sobre N em Plantas**. P. 127-167, Itaguaí, 1993.

MAGALHÃES, J. R. Enzimas de assimilação de nitrogênio 2: glutamato desidrogenase/ glutamato sintase (GS/GOGAT). *In*: FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R. O.; DOBEREINER, J. NEVES, M.C.P.; PIMENTEL, & MIRANDA, R. M. (Eds.) **Anais do I Simpósio Brasileiro sobre N em Plantas**. P. 205-213, Itaguaí, 1993.

MAGALHAES, J. R.; MACHADO, A. T.; FERNANDES, M. S. E SILVEIRA, J. A. G. Nitrogen assimilation efficiency in maize genotypes under ammonia stress. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, 5 (2): 163-166, 1993.

MALAVOTA, E.; FORNASIERI FILHO, D. Nutrição mineral da cultura do arroz. In: **Cultura do arroz de sequeiro-fatores afetando a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p. 95-140, 1983.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. Academic Press. 2ª edição, 1995.

MINFLIN, B. J. & LEA, P. Amino acid metabolism. **Annual Rev. Plant Physiol.** 28:299, 1977.

MIRZA, M. S.; RASUL, G.; MEHNAZ, S.; LADHA, J. K.; SO, R. B.; ALI, S. and MALIK, K. A. In: LADHA, J. K. and REDDY, P. M. (eds.) **The quest for Nitrogen Fixation in Rice**. Proceedings on the Third Working Group Meeting on Assessing Opportunities for Nitrogen Fixation in Rice, 90-012 Aug. 1999, Los Banos, Laguna, Philippines. Makati city (Philippines). International Rice Research Institute, 2000. 354p.

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

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

NEVES, M. C. P. e FRANCO, A. A. Fixação biológica e metabolismo de nitrogênio em plantas. In: FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R. O.; DOBEREINER, J. NEVES, M.C.P.; PIMENTEL, & MIRANDA, R. M. (Eds.) **Anais do I Simpósio Brasileiro sobre N em Plantas**. P. 127-167, Itaguaí, 1993.

NOGUEIRA, E. M. **Metabolismo de nitrogênio em cana-de-açúcar: estudos com a enzima Glutamina Sintetase**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2001. Dissertação de mestrado.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil. Soils**, Berlin, 21:197-200, 1996.

OLIVARES, F. L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização da cana-de-açúcar (*Saccharum sp* híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. UFRRJ, 1997. 328p.

OLIVARES, F. L. Physiological changes induced on the host plant during the endophytic interaction between sugar cane and diazotrophic bacteria. **Book of Abstracts of 9<sup>th</sup> International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes**. Leuven, Belgium, 2002.

OLIVEIRA, E. **Estudo da associação entre bactérias diazotróficas e arroz irrigado**. Itaguaí, 1992.

OLIVEIRA, O.C. **Quantificação da fixação biológica de nitrogênio em arroz (*Oryza sativa* L.) inundado**. Dissertação de Mestrado. UFRRJ, Seropédica, 1994.

PATRIQUIN, D. G.; DOBEREINER, J. & JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Can. J. Microbiol.**, 29 (8): 900-915, 1983.

RAO, V.R.; JENA, P. K. AND ADLIYA, T. K. Inoculation of rice with nitrogen-fixing bacteria – problems and perspectives. **Biol. Fertil Soils.**, 4: 21-26. 1987.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; e DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, n. 5, p. 985-994, 2000.

REIS, V.M. & TEIXEIRA, K.R.S. **Fixação biológica de nitrogênio: o que é, pra que serve e o que a ciência busca atingir com o conhecimento deste processo biológico.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia (Curso de Agrobiologia de 2002), 2002.

RODRIGUES, O., DIDONET, A. D.; GOUVEIS, J. A. and SOARES, R. C. Nitrogen translocation in wheat inoculated with *Azospirillum* and fertilized with nitrogen. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, n. 7, p. 1473-1481, 2000.

SILVEIRA, J. A. G. Relações entre metabolismo de C e N: Fixação não fotossintética de CO<sub>2</sub> e assimilação de N inorgânico. In: MAGALHÃES, A. C. N. Enzimas da assimilação de N: processos de redução de nitratos em plantas superiores. In: FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R. O.; DOBEREINER, J. NEVES, M.C.P.; PIMENTEL, & MIRANDA, R. M. (Eds.) **Anais do I Simpósio Brasileiro sobre N em Plantas.** P. 127-167, Itaguaí, 1993.

SIQUEIRA, J. O. e FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: Fundamentos e perspectivas.** Brasília: MEC, Lavras: ESAL, 1988.

SOLOMONSON, L.P.; BARBER, M.J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Polo Alto, v.41, p. 225-253, 1990.

SOUZA, S. R.; A. S. H., RIBEIRO, C. M., STARK, M. L. M.; FERNANDES, M. S. Efeitos da variação sazonal de nitrato sobre as enzimas de assimilação e N-solúvel em arroz. **Anais do Fertbio 2002.** Rio de Janeiro – RJ, 2002.

SOUZA, S. R.; STARK, M. L. M.; FERNANDES, M. S. **Enzimas de assimilação de nitrogênio em plantas.** Copyright, 2002.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S. and MAGALHÃES, J. R. Effects of supplemental nitrogen on nitrogen-assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars and crude protein of rice. **Commun. Soul Sci. Plant. Anal.**, 30 (5&6), p. 711-724, 1999.

TEDESCO, M. J. **Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de planta por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.** UFRGS. (Informativo Interno, 1), 1982. 23p.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H. & HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *A. brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. **Appl. And Envirom. Microbiol.**, 37: 1016-1024, 1979.

URQUIARGA, S.S; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R. Dinâmica do N no solo. *In*: FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R. O.; DOBEREINER, J. NEVES, M.C.P.; PIMENTEL, & MIRANDA, R. M. (Eds.) **Anais do I Simpósio Brasileiro sobre N em Plantas**. P. 127-167, Itaguaí, 1993.

VICENTE, F. M. P. **Correlação entre parâmetros morfológicos, obtidos em solução nutritiva, e produção de diversos cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) sob estresse de alumínio**, Itaguaí, 1993.

VICTORIA, R. L.; PICCOLO, M. C. e VARGAS, A. A. T. O ciclo do nitrogênio. *In*: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas, 1992.

VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999.

VOSE, P. B. developments in non-legume N<sub>2</sub>- fixing systems. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 837-850, 1993.

WESTCOTT, M. P., BRANDSON, D. M.; LINDAU, C. W.; PATRICK, W. H. Jr. Effects of seeding method and time of fertilization on urea-nitrogen<sup>15</sup> reco very in rice. **Agronomy Journal**, Madison, n.78, p. 474-478, 1986.

YEMM, E. W. & COCKING, E. F. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, 80, 209-213, 1955.

YEMM, E. W. & COCKING, E.F. The determination of carbohydrates in plants extracts by anthrone. **Biochem.**, 57:508-514, 1954.

## 7. ANEXO

### **ANEXO I:** Meios de Cultura

#### **1. MEIO JMV**

5 g	manitol	
6 ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	Sol. 10%
18 ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	Sol. 10%
2 ml	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	Sol. 10%
1 ml	NaCl.....	Sol. 10%
2 ml	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O .....	Sol. 1%
2 ml	Azul de bromotimol.....	Sol. 0.5% em 0.2N de KOH
2 ml	Sol. de micronutrientes para meio de cultura	
4 ml	FeEDTA .....	Sol. 1,64%
1 ml	Vitamina para meio de cultura	

Completar para 1000 ml com H<sub>2</sub>O destilada pH. 4.2-4.5

#### **AGAR**

**SEMI-SÓLIDO** – 2.1 g agar por litro de meio de cultura, dissolver antes da distribuição.

**SÓLIDO** – 25 g de agar por litro de meio de cultura, adicionar 100 mg de extrato de levedura.

OBS. Para meio líquido adicionar 10 mM de glutamato / litro (1.87 g/l),(indicador opcional)  
+100mg de extrato de levedura.

Convém usar as placas somente 24 h após o preparo.

#### **2. MEIO JNFb**

5 g	Ácido Málico	
6 ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	Sol. 10%
18 ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	Sol. 10%
2 ml	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	Sol. 10%
1 ml	NaCl.....	Sol. 10%
2 ml	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	Sol. 1%
2 ml	Azul de bromotimol 0.5% em 0.2N de KOH	
2 ml	Solução de micronutrientes para meio de cultura	
4 ml	FeEDTA .....	Sol. 1.64%
4.5 g	KOH	
1 ml	Vitamina para meio de cultura	

Completar para 1000 ml com H<sub>2</sub>O destilada.

Ajustar o pH para 5.8 e colocar agar por último.

#### **AGAR**

**SEMI-SÓLIDO** – 1,9 g por litro de meio de cultura, dissolver antes da distribuição.

**SÓLIDO** – 17 g por litro de meio de cultura, colocar 20 mg de extrato de levedura.

## **ANEXO II:** Análises de Variância

Anexo 1: Análise de variância do acúmulo de matéria seca, %N e acúmulo total de N da parte aérea das cultivares de arroz IR42 e IAC4440, no período vegetativo e de florescimento.

Fonte de Variação	Matéria seca		%N		N-Total	
	P. veg	Flor.	P. veg	Flor.	P. veg	Flor.
	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Variedade	0,6246	0,0000	0,0001	0,0000	0,2697	0,5167
Bactéria	0,2998	0,5400	0,0040	0,3998	0,0499	0,7165
Nitrogênio	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Bloco	0,0007	0,1237	0,0000	0,6117	0,4277	0,0860
Variedade*Nitrogênio	0,1397	0,8635	0,2270	0,4905	0,1311	0,8228
Variedade*Bactéria	0,8583	0,0007	0,0720	0,0000	0,3348	0,5492
Variedade*Bactéria*Nitrogênio	0,4416	0,6518	0,2545	0,3595	0,2364	0,2693
CV (%)	30,51	26,33	12,69	16,03	32,38	32,47
Bactéria dentro de variedade						
Fonte de Variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Bactéria/IR42	0,4948	0,5980	0,0013	0,7580	0,0113	0,6463
Bactéria/IAC4440	0,5567	0,7930	0,6555	0,2435	0,5412	0,8946
Nitrogênio dentro de variedade						
Fonte de Variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Nitrogênio/IR42	0,0000	0,0000	0,0000	0,1018	0,0000	0,0000
Nitrogênio/IAC4440	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Bactéria dentro de variedade*nitrogênio						
Fonte de Variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Bactéria/ IR42 0 KgN/ha	0,4135	0,9942	0,1076	0,1718	0,3096	0,7361
Bactéria/ IR42 40 KgN/ha	0,1067	0,9638	0,0032	0,0733	0,1070	0,2279
Bactéria/ IR42 80 KgN/ha	0,1005	0,1119	0,2030	0,9138	0,0056	0,1937
Bactéria/ IAC4440 0 KgN/ha	0,5065	0,7764	0,576	0,2498	0,6810	0,6604
Bactéria/ IAC4440 40 KgN/ha	0,7630	0,5478	0,8543	0,7871	0,8471	0,5680
Bactéria/ IAC4440 80 KgN/ha	0,5252	0,7128	0,1890	0,6210	0,2072	0,7344
Nitrogênio dentro de variedade*bactéria						
Fonte de Variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Nitrogênio/ IR42 ZAE94	0,0561	0,0001	0,0003	0,1198	0,0000	0,0006
Nitrogênio/ IR42 M130	0,0053	0,0001	0,0000	0,0742	0,0002	0,0004
Nitrogênio/ IR42 Mistura	0,0000	0,0001	0,0575	0,1735	0,0000	0,0009
Nitrogênio/ IR42 Controle	0,0025	0,0000	0,0003	0,2122	0,0031	0,0000
Nitrogênio/IAC4440 ZAE94	0,0007	0,1890	0,0036	0,0000	0,0001	0,0003
Nitrogênio/ IAC4440 M130	0,2270	0,0037	0,1768	0,0000	0,0642	0,0000
Nitrogênio/ IAC4440 Mistura	0,0698	0,4246	0,0002	0,0000	0,0005	0,0032
Nitrogênio/ IAC4440 Controle	0,0284	0,0439	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001

Anexo 2: Análise de variância da concentração de nitrato da raiz e parte aérea das cultivares de arroz IR42 e IAC4440, no período vegetativo e de florescimento.

	Período vegetativo		Florescimento	
	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Variedade	0,2470	0,0000	0,0000	0,0156
Bactéria	0,3069	0,0352	0,431	0,0959
Nitrogênio	0,0462	0,4677	0,4365	0,0005
Bloco	0,0008	0,0129	0,1340	0,2645
Variedade*Nitrogênio	0,5236	0,1362	0,2181	0,0055
Variedade*Bactéria	0,5950	0,1065	0,8623	0,0416
Variedade*Bactéria*Nitrogênio	0,3743	0,1977	0,5414	0,1651
CV(%)	36,18	42,16	44,06	34,65
Bactéria dentro de variedade				
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Bactéria/IR42	0,1940	0,0390	0,0207	0,5715
Bactéria/IAC4440	0,7728	0,1209	0,4332	0,0009
Nitrogênio dentro de variedade				
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Nitrogênio/IR42	0,2181	0,7880	0,6084	0,0001
Nitrogênio/IAC4440	0,1168	0,0634	0,6116	0,5628
Bactéria dentro de variedade*nitrogênio				
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Bactéria/ IR42 0 KgN/ha	0,8990	0,0013	0,5197	0,5814
Bactéria/ IR42 40 KgN/ha	0,0097	0,3366	0,3885	0,9340
Bactéria/ IR42 80 KgN/ha	0,248.5	0,5919	0,0200	0,0249
Bactéria/ IAC4440 0 KgN/ha	0,9715	0,6083	0,7852	0,6164
Bactéria/ IAC4440 40 KgN/ha	0,5026	0,0371	0,00680	0,0027
Bactéria/ IAC4440 80 KgN/ha	0,8663	0,7609	0,7771	0,0546
Nitrogênio dentro de variedade*bactéria				
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Nitrogênio/ IR42 ZAE94	0,8075	0,3139	0,3836	0,0114
Nitrogênio/ IR42 M130	0,2769	0,7107	0,2385	0,3803
Nitrogênio/ IR42 Mistura	0,0213	0,0083	0,9215	0,0741
Nitrogênio/ IR42 Controle	0,1280	0,5698	0,4887	0,0008
Nitrogênio/IAC4440 ZAE94	0,7788	0,1839	0,0466	0,7022
Nitrogênio/ IAC4440 M130	0,4365	0,0294	0,8585	0,7027
Nitrogênio/ IAC4440 Mistura	0,4884	0,8560	0,8946	0,0538
Nitrogênio/ IAC4440 Controle	0,2265	0,7789	0,6344	0,7281

Anexo 3: Análise de variância da concentração de aminoácidos livres na raiz e parte aérea das cultivares de arroz IR42 e IAC4440, no período vegetativo e de florescimento.

	Período vegetativo		Florescimento	
	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Variedade	0,0076	0,8236	0,0674	0,0027
Bactéria	0,0087	0,0113	0,0010	0,9637
Nitrogênio	0,6103	0,0002	0,1861	0,4055
Bloco	0,1921	0,1808	0,0011	0,1025
Variedade*Nitrogênio	0,9349	0,0411	0,7851	0,2264
Variedade*Bactéria	0,7782	0,1943	0,6725	0,0025
Variedade*Bactéria*Nitrogênio	0,9790	0,4361	0,0916	0,2866
CV(%)	26,04	19,21	28,47	43,34
Bactéria dentro de variedade				
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Bactéria/IR42	0,0431	0,0009	0,0062	0,3348
Bactéria/IAC4440	0,2286	0,5295	0,1380	0,7320
Nitrogênio dentro de variedade				
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Nitrogênio/IR42	0,4965	0,0090	0,7580	0,1613
Nitrogênio/IAC4440	0,9538	0,0023	0,1628	0,0054
Bactéria dentro de variedade*nitrogênio				
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Bactéria/ IR42 0 KgN/ha	0,3152	0,0097	0,0644	0,1551
Bactéria/ IR42 40 KgN/ha	0,0270	0,0224	0,0318	0,2602
Bactéria/ IR42 80 KgN/ha	0,3252	0,2794	0,1046	0,2944
Bactéria/ IAC4440 0 KgN/ha	0,8468	0,6404	0,0480	0,6956
Bactéria/ IAC4440 40 KgN/ha	0,1300	0,4663	0,2718	0,6194
Bactéria/ IAC4440 80 KgN/ha	0,4150	0,7970	0,6052	0,9807
Nitrogênio dentro de variedade*bactéria				
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Nitrogênio/ IR42 ZAE94	0,7552	0,6536	0,8936	0,0204
Nitrogênio/ IR42 M130	0,3620	0,7051	0,04440	0,3837
Nitrogênio/ IR42 Mistura	0,9488	0,3892	0,8456	0,7503
Nitrogênio/ IR42 Controle	0,0353	0,0013	0,1923	0,2438
Nitrogênio/IAC4440 ZAE94	0,5719	0,0897	0,8704	0,2500
Nitrogênio/ IAC4440 M130	0,3822	0,3038	0,6037	0,5086
Nitrogênio/ IAC4440 Mistura	0,7347	0,0236	0,2102	0,2568
Nitrogênio/ IAC4440 Controle	0,4657	0,5972	0,0254	0,0463



Anexo 4: Análise de variância da concentração de açúcar solúvel na raiz e parte aérea das cultivares de arroz IR42 e IAC4440, no período vegetativo e de florescimento.

	Período vegetativo		Florescimento	
	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Variedade	0,0131	0,0237	0,0000	0,0000
Bactéria	0,0375	0,4284	0,1105	0,9049
Nitrogênio	0,7592	0,0989	0,3165	0,0080
Bloco	0,0014	0,0001	0,9647	0,8760
Variedade*Nitrogênio	0,0271	0,0346	0,2978	0,7386
Variedade*Bactéria	0,3442	0,4179	0,0037	0,1468
Variedade*Bactéria*Nitrogênio	0,1264	0,0082	0,5402	0,0229
CV(%)	45,60	28,51	59,09	27,28
Bactéria dentro de variedade				
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Bactéria/IR42	0,0008	0,0919	0,5506	0,7058
Bactéria/IAC4440	0,9966	0,1645	0,0563	0,9346
Nitrogênio dentro de variedade				
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Nitrogênio/IR42	0,6668	0,8062	0,0796	0,0055
Nitrogênio/IAC4440	0,3860	0,0518	0,0126	0,2090
Bactéria dentro de variedade*nitrogênio				
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Bactéria/ IR42 0 KgN/ha	0,0008	0,0291	0,9427	0,3475
Bactéria/ IR42 40 KgN/ha	0,0034	0,0853	0,9792	0,5405
Bactéria/ IR42 80 KgN/ha	0,6089	0,0006	0,1031	0,0527
Bactéria/ IAC4440 0 KgN/ha	0,5723	0,0592	0,0526	0,0298
Bactéria/ IAC4440 40 KgN/ha	0,6346	0,6954	0,7858	0,1295
Bactéria/ IAC4440 80 KgN/ha	0,3008	0,6975	0,1865	0,7384
Nitrogênio dentro de variedade*bactéria				
Fonte de variação	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc	Pr > Fc
Nitrogênio/ IR42 ZAE94	0,0805	0,1707	0,6653	0,9142
Nitrogênio/ IR42 M130	0,6995	0,3065	0,8448	0,0008
Nitrogênio/ IR42 Mistura	0,0062	0,0167	0,0191	0,0855
Nitrogênio/ IR42 Controle	0,6100	0,0012	0,7460	0,3043
Nitrogênio/IAC4440 ZAE94	0,0274	0,4504	0,8778	0,0557
Nitrogênio/ IAC4440 M130	0,9572	0,8066	0,0353	0,6967
Nitrogênio/ IAC4440 Mistura	0,8683	0,0195	0,1738	0,1485
Nitrogênio/ IAC4440 Controle	0,4918	0,5382	0,1045	0,0158