

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Interação Planta-Bactéria Diazotrófica
na Cultura do Arroz**

Daniele Cristina Costa Sabino

2007



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

**INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA
NA CULTURA DO ARROZ**

DANIELE CRISTINA COSTA SABINO

Sob a Orientação da Professora
Vera Lúcia Divan Baldani

e Co-orientação dos Professores
Sonia Regina de Souza
Jean Luiz Simões de Araújo

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ.
Fevereiro de 2007

631.417

P654f Sabino, Daniele Cristina Costa, 1979-

T Estudos Ecológicos e Moleculares da Interação Planta-bactéria
Diazotrófica na Cultura de Arroz/ Daniele Cristina Costa Sabino.
– 2007.

54f. : il.

Orientador: Vera Lúcia Divan Baldani.

Tese(doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f. 47-56.

1. FBN – Teses. 2. Solos – *Herbaspirillum seropedicae* – Teses. 3. Solos – *Burkholderia* – Teses. 4. Húmus – Teses. I. Baldani, Vera Lúcia Divan, 1954- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia. III. Título.

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

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

DANIELE CRISTINA COSTA SABINO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

TESE APROVADA EM 26/02/2007

Vera Lúcia Divan Baldani. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Sonia Regina de Souza. Dr. UFRRJ

Norma Gouvêa Rumjanek Ph.D. Embrapa Agrobiologia

Agostinho Dirceu Didonet. Dr. Embrapa Arroz e Feijão

Marcia Soares Vidal. Dr. Embrapa Agrobiologia

DEDICATÓRIA

Aos meus irmãos, Marcio e Ana, e aos meus sobrinhos, Marcio, Luan e Tales,
Ofereço!

Aos meus pais, Albino (*in memoriam*) e Solange,
Dedico!

“Sabe tese, de faculdade? Aquela que defendem? Com unhas e dentes? É dessa tese que eu estou falando. Você deve conhecer pelo menos uma pessoa que já defendeu uma tese. Ou esteja defendendo. Sim, uma tese é defendida. Ela é feita para ser atacada pela banca, que são aquelas pessoas que gostam de botar banca. As teses são todas maravilhosas. Em tese. Você acompanha uma pessoa meses, anos, séculos, defendendo uma tese. Palpitantes assuntos. Tem tese que não acaba nunca, que acompanha o elemento para a velhice. Tem até teses pós-morte. O mais interessante na tese é que, quando nos contam, são maravilhosas, intrigantes. A gente fica curiosa, acompanha o sofrimento do autor, anos a fio. Aí ele publica, te dá uma cópia e é sempre - sempre - uma decepção. Em tese. Impossível ler uma tese de cabo a rabo. São chatíssimas. É uma pena que as teses sejam escritas apenas para o julgamento da banca circunspecta, sisuda e compenetrada em si mesma. E nós? Sim, porque os assuntos, já disse, são maravilhosos, cativantes, as pessoas são inteligentíssimas. Temas do arco-da-velha. Mas toda tese fica no rodapé da história. Pra que tanto sic e tanto apud? Sic me lembra o Pasquim e apud não parece candidato do PFL para vereador? Apud Neto. Escrever uma tese é quase um voto de pobreza que a pessoa se autodecreta. O mundo pára, o dinheiro entra apertado, os filhos são abandonados, o marido que se vire. Estou acabando a tese. Essa frase significa que a pessoa vai sair do mundo. Não por alguns dias, mas anos. Tem gente que nunca mais volta. E, depois de terminada a tese, tem a revisão da tese, depois tem a defesa da tese. E, depois da defesa, tem a publicação. E, é claro, intelectual que se preze, logo em seguida embarca noutra tese. São os profissionais, em tese. O pior é quando convidam a gente para assistir à defesa. Meu Deus, que sono. Não em tese, na prática mesmo. Orientados e orientandos (que nomes atuais!) são unânimes em afirmar que toda tese tem de ser - tem de ser! - daquele jeito. É pra não entender, mesmo. Tem de ser formatada assim. Que na Sorbonne é assim, que em Coimbra também. Na Sorbonne, desde 1257. Em Coimbra, mais moderna, desde 1290. Em tese (e na prática) são 700 anos de muita tese e pouca prática. Acho que, nas teses, tinha de ter uma norma em que, além da tese, o elemento teria de fazer também uma tesão (tese grande). Ou seja, uma versão para nós, pobres teóricos ignorantes que não votamos no Apud Neto. Ou seja, o elemento (ou a elementa) passa a vida a estudar um assunto que nos interessa em nada. Pra quê? Pra virar mestre, doutor? E daí? Se ele estudou tanto aquilo, acho impossível que ele não queira que a gente saiba a que conclusões chegou. Mas jamais saberemos onde fica o bicho da goiaba quando não é tempo de goiaba. No bolso do Apud Neto? Tem gente que vai para os Estados Unidos, para a Europa, para terminar a tese. Vão lá nas fontes. Descubrem maravilhas. E a gente não fica sabendo de nada. Só aqueles sisudos da banca. E o cara dá logo um dez com louvor. Louvor para quem? Que exaltação, que encômio é isso? E tem mais: as bolsas para os que defendem as teses são uma pobreza. Têm viagens, compra de livros caros, horas na Internet da vida, separações, pensão para os filhos que a mulher levou embora. É, defender uma tese é mesmo um voto de pobreza, já diria São Francisco de Assis. Em tese. Tenho um casal de amigos que há uns dez anos preparam suas teses. Cada um, uma. Dia desses a filha, de 10 anos, no café da manhã, ameaçou: - Não vou mais estudar! Não vou mais na escola. Os dois pararam - momentaneamente - de pensar nas teses. - O quê? Pirou? - Quero estudar mais, não. Olha vocês dois. Não fazem mais nada na vida. É só a tese, a tese, a tese. Não pode comprar bicicleta por causa da tese. A gente não pode ir para a praia por causa da tese. Tudo é pra quando acabar a tese. Até trocar o pano do sofá. Se eu estudar vou acabar numa tese. Quero estudar mais, não. Não me deixam nem mexer mais no computador. Vocês acham mesmo que eu vou deletar a tese de vocês? Pensando bem, até que não é uma má idéia! Quando é que alguém vai ter a prática idéia de escrever uma tese sobre a tese? Ou uma outra sobre a vida nos rodapés da história? Acho que seria um tesão.”

"UMA TESE É UMA TESE"

Mário Prata - Crônica publicada no jornal O Estado de São Paulo em 7 de outubro de 1998.

AGRADECIMENTOS

A Deus: “É realmente verdade que gratidão gera gratidão e lamúria gera lamúria. Isto acontece porque o coração agradecido comunica-se com Deus e o queixoso relaciona-se com Satanás. Assim, quem vive agradecendo, torna-se feliz; quem vive se lamuriando caminha para a infelicidade. A frase “alegrem-se que virão coisas alegres” expressa uma grande verdade.” (Meishu-Sama);

À minha mãe, por todas as broncas e incentivos, pela compreensão em todas as ocasiões em que estive ausente mesmo estando tão perto e, acima de tudo, pelo amor e confiança;

Aos meus irmãos, pelo apoio e carinho;

Ao Marcos Antonio Lopes da Silva: “A coisa mais importante é construir um alicerce invisível enquanto são jovens. A partir daí é que será erguido o alicerce visível. Mesmo que seja uma base com forma, se não estiver alicerçada na base espiritual, que é invisível, ela cairá como um castelo construído em cima de um monte de areia.” (Nidai-Sama);

Ao Wagner Sebastian: “...Você surgiu e juntos conseguimos ir mais longe, você dividiu comigo a sua história e me ajudou a construir a minha...”;

À Vera Baldani, não só pela orientação nos assuntos acadêmicos, mas por participar da minha vida;

Aos professores Sonia e Jean, pela co-orientação e amizade;

Aos pesquisadores José Ivo Baldani e Verônica Massena Reis, pelo apoio e amizade;

Aos amigos: Rejane, Joilson, Salomão, Marcela Drechsel, Liamara e Michael, Cristiane, Marinete e Elias, Ricardo, Edilson, Gabriela e Lusimar, Marivaine, Patrícia Gitahy, Helma e Olavo, Sandy, Erineudo, Weber, Enderson, Carlos Brasil, David, pela ajuda, incentivo e por todos os momentos alegres e de descontração que me proporcionaram;

Aos amigos: Viviane Aguiar, Jorge e Cácia, Roberto, Hanry, Leandro, Josiane e Alexandre, Fabio, Rejane, Viviane Fernandes, Nicomedes, Elida, Denis, Claudemar, Marcio Piratelo, Joilson, Salomão, Patricia Dinis, pela amizade, apesar do tempo e da distância;

Aos amigos, Joilson, Orlando, Raquel, Roberto; e aos professores, Everaldo Zonta e Marcos Gervásio, pelo companheirismo e apoio durante os dois meses em Buenos Aires;

Aos estudantes e amigos do laboratório de gramíneas;

Aos funcionários da Embrapa Agrobiologia: Geraldo, Lúcio, Wilson, Luis Carlos, Mazinho e Marildo, pela ajuda sempre que necessitei;

Aos funcionários do campo experimental, pela ajuda na manutenção dos experimentos de tese;

À UFRRJ e ao CPGA-CS, pela oportunidade de realizar este curso;

À Embrapa Agrobiologia, por fornecer as condições para a realização deste trabalho;

A CAPES, pela bolsa concedida nos primeiros 2 anos;

À FAPERJ, pela bolsa Nota 10;

A todos que ao longo de minha vida, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização desta conquista. Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

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 (UFRRJ), onde foi bolsista de iniciação científica do CNPq de março de 1999 a fevereiro de 2001, quando obteve a titulação de Engenheira Agrônoma. Em fevereiro de 2003, obteve por esta instituição, o título de Mestre em Ciências no Curso de Pós-graduação em Fitotecnia. No mês de março do mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado junto ao Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo desta instituição, desenvolvendo as análises experimentais na Embrapa Agrobiologia-CNPAB, sob orientação da Dr^a. Vera Lúcia Divan Baldani.

RESUMO

SABINO, Daniele Cristina Costa. **Interação planta - bactéria diazotrófica na cultura do arroz**. Seropédica: UFRRJ, 2007. 54f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia. Departamento de Solos. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2007.

A inoculação de plantas de arroz com bactérias diazotróficas é uma alternativa para a diminuição do uso de adubos nitrogenado na cultura, no entanto alterações no desenvolvimento das plantas são observadas neste tipo de associação. O presente estudo teve por objetivo de avaliar a influencia da inoculação de bactérias no desenvolvimento de cultivares de arroz, através de parâmetros agrônômicos e fisiológicos. Para avaliar os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas no desenvolvimento de plantas de arroz em diferentes formas de manejo, foram realizados um experimento de inoculação em laboratório e três experimentos em casa de vegetação. O primeiro experimento foi realizado com as plantas de arroz crescendo em tubos contendo solução nutritiva, o segundo, em copos contendo areia e o terceiro e o quarto, em vasos contendo terra. Em todos os experimentos foram utilizadas estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* (BR11417 - ZAE94; BR11507 - M2), *Burkholderia* spp (BR11340 - M130) e *Azospirillum brasilense* (BR11002 - Cd), inoculadas de forma individual, ou utilizando misturas de duas ou mais estirpes. Também foram avaliados, sem a utilização de plantas, somente meio de cultivo, a produção de ácido indol acético (AIA) e a atividade de redução de acetileno (ARA) das estirpes de bactérias diazotróficas. Os resultados demonstraram que todas as estirpes, foram capazes de produzir AIA na presença de triptofano, tendo a estirpe Cd, apresentado as maiores concentrações. Com exceção da estirpe M2, todas tiveram ARA em meio de cultivo. No entanto, com os parâmetros avaliados, não foi possível correlacionar a produção de AIA e a atividade de redução de acetileno das estirpes com a promoção do crescimento vegetal. Os experimentos em laboratório e casa de vegetação, utilizando as cultivares arroz IR42 e IAC4440, demonstraram que a aplicação de uma adubação nitrogenada de 50kg N ha⁻¹ permitiu uma melhor interação entre as plantas de arroz e as bactérias diazotróficas. As cultivares de arroz IR42 e IAC4440 responderam de modo diferenciado a inoculação com bactérias diazotróficas, estando esta relacionada ao ambiente de cultivo. A inoculação das estirpes de bactérias diazotróficas propiciou um maior teor de nitrogênio e proteína bruta nos grãos da cultivar IR42 sem ocasionar uma redução na sua produtividade. No quarto experimento foram observadas, em função da inoculação, variações na atividade da enzima nitrato redutase e na partição das frações solúveis (nitrato, aminoácidos livres e carboidratos solúveis) durante o período vegetativo. Entretanto, não houve relação destes parâmetros fisiológicos com a produção das cultivares de arroz.

Palavras chave: FBN. *Herbaspirillum seropedicae*. *Burkholderia* sp.

ABSTRACT

SABINO, Daniele Cristina Costa. **Interaction plant - diazotrophic bacteria in rice crop**. 2007. 54p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia. Departamento de Solos. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2007.

The inoculation of rice plants with diazotrophic bacteria is an alternative for reduction of usage of nitrogen fertilizers in the crop. However alterations in the plants development are observed in this type of association. The present study had as objective to evaluate the influence of bacteria inoculation in development of rice cultivars, through agronomic and physiological parameters. To evaluate the effect of diazotrophic bacteria inoculation in development of rice plants in different handling forms, an experiment of inoculation in laboratory and three experiments in green - house were conducted. The first experiment was carried through with rice plants growing in tubes with nutrient solution; the second, in cups filled with sand; and the third and fourth, in vases with soil. In all experiments, there were used lineages of *Herbaspirillum seropedicae* (BR11417 - ZAE94; BR11507 - M2), *Burkholderia* spp (BR11340 - M130) and *Azospirillum brasilense* (BR11002 - Cd), inoculated individually, or using mixes of two or more lineages. The acid production of indol acetic (AIA), and acetylene reduction activity (ARA) of diazotrophic bacteria lineages also were evaluated, without plants, only in culture media. The results demonstrated that all lineages were able to produce AIA in the presence of triptophane; having the lineage Cd presented the biggest concentrations. With exception of the M2 lineage, all had ARA in the culture media. However, with the evaluated parameters, it was not possible to correlate AIA production AIA and the lineages ARA, with promotion of vegetal growth. The experiments in laboratory and green - house, using the rice cultivars IR42 and IAC4440, demonstrated that application of a nitrogen fertilizer dosage of 50kg N ha⁻¹ allowed better interaction between rice plants and diazotrophic bacteria. The rice cultivars IR42 and IAC4440 responded differently to inoculation with diazotrophic bacteria, which was related to the cultivation environment. The inoculation of lineages of diazotrophic bacteria propitiated a highest N level and bulk grain protein of IR42 cultivar, without causing a reduction in its productivity. In the fourth experiment, there were observed, as a function of inoculation, variations in activity of nitrate reductase enzyme and partition of soluble fractions (nitrate, amino acids and soluble carbohydrates) during the vegetative cycle. However, a relationship between these physiological parameters and the production of rice cultivars was not observed.

Key words: BNF. *Herbaspirillum seropedicae*. *Burkholderia* sp.

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1:** Estimativa para a fixação de N₂ para diversos sistemas fixadores 14
- Tabela 2:** Análise química da amostra de solo utilizado para o plantio de arroz. 20
- Tabela 3:** Atividade de redução de acetileno (ARA), por estirpes do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em condições de cultivo em meio semi-sólido com 48 e 72 h. de crescimento. 24
- Tabela 4:** Produção de ácido 3-indol acético (AIA) por estirpes do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em condições de cultivo em meio líquido suplementado com triptofano, em três diferentes tempos. 25
- Tabela 5:** Biomassa fresca da parte aérea e raízes das cultivares de arroz IR42 e IAC4440, cultivadas em condições axênicas, em meio de cultivo acrescido de diferentes doses de ácido indol acético (AIA). 26
- Tabela 6:** Biomassa fresca da parte aérea e raízes das cultivares de arroz IR42 e IAC4440, com ou sem adubação nitrogenada e inoculadas com bactérias do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em condições axênicas (trinta dias após o plantio). 27
- Tabela 7:** Biomassa fresca e seca da parte aérea e raízes das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 inoculadas com bactérias do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em experimento em copos com areia. 29
- Tabela 8:** Teor de nitrogênio percentual (%) e acúmulo total de nitrogênio (g.planta⁻¹) na parte aérea das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 inoculadas com bactérias do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em experimento em copos com areia. 30
- Tabela 9:** Área e comprimento radicular das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 inoculadas com bactérias do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em experimento em copos com areia. 31
- Tabela 10:** Biomassa seca e produção de grãos das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 inoculadas com bactérias do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em experimento em vasos com solo (3 plantas.vaso⁻¹). 32
- Tabela 11:** Teor de nitrogênio percentual (N%) e acúmulo total de nitrogênio (N-total) dos grãos das cultivares de arroz IR42 e IAC440 em experimento de vasos com solo. 33
- Tabela 12:** Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas obtidas a partir do meio de cultivo JMV (M130 e controle) e do meio de cultivo JNFb (ZAE94, M2, Cd e controle), nas cultivares de arroz IR42 e IAC4440 durante o período vegetativo (50 dias). 34
- Tabela 13:** Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas obtidas a partir do meio de cultivo JMV (M130 e controle) e do meio de cultivo JNFb (ZAE94, M2, Cd e controle), nas cultivares de arroz IR42 e IAC4440 durante o período de florescimento. 35
- Tabela 14:** Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas obtidas a partir do meio de cultivo JMV (M130 e controle) e do meio de cultivo JNFb (ZAE94, M2, Cd e

controle), nas cultivares de arroz IR42 e IAC4440 durante o período de maturação dos grãos.	36
Tabela 15: Biomassa seca das raízes, dos colmos e das folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período vegetativo (50 dias).	37
Tabela 16: Teor de nitrogênio (%) nas raízes, nos colmos e nas folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período vegetativo (50 dias).	37
Tabela 17: Biomassa seca das raízes, dos colmos e das folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período de florescimento.	38
Tabela 18: Teor de nitrogênio (%) presente nas raízes, nos colmos, nas folhas bandeiras (Fb), nas folhas 2 (F2), nas outras folhas (demais folhas – OF) e nas folhas (conteúdo médio das Fb, F2 e OF) e parte aérea (conteúdo médio dos colmos, Fb, F2, e OF) das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período de florescimento.	39
Tabela 19: Biomassa seca das raízes, dos colmos e das folhas da cultivar de arroz IR42 no período de enchimento de grãos..	40
Tabela 20: Percentual de nitrogênio (N%) presente nas raízes, nos colmos, nas folhas bandeiras (Fb), nas folhas 2 (F2), nas outras folhas (demais folhas – OF) e nas folhas (conteúdo médio das Fb, F2 e OF) e parte aérea (conteúdo médio dos colmos, Fb, F2, e OF) da cultivar de arroz IR42 no período de enchimento de grãos.	40
Tabela 21: Biomassa seca das raízes, dos colmos e das folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período de maturação dos grãos.	41
Tabela 22: Acúmulo de nitrato nas raízes, nos colmos e nas folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período vegetativo.	42
Tabela 23: Acúmulo de aminoácidos livres nas raízes, nos colmos e nas folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período vegetativo.	43
Tabela 24: Acúmulo de açúcar solúvel nas raízes, nos colmos e nas folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período vegetativo.	43
Tabela 25: Atividade da enzima nitrato redutase nas raízes, nos colmos e nas folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período vegetativo.	44
Tabela 26: Produção (g. planta ⁻¹), teor de nitrogênio (%) dos grãos das cultivares de arroz IR42 e IAC4440.	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Ecofisiologia do Arroz	3
2.2 Nitrogênio	4
2.3 Enzimas de Assimilação de Nitrogênio	6
2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio	8
2.5 Bactérias Diazotróficas	10
2.6 Arroz e Bactérias Diazotróficas	12
2.7 Metabolismo de Nitrogênio e Fixação Biológica de Nitrogênio	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Cultivares de Arroz	17
3.2 Caracterização das Bactérias Diazotróficas Utilizadas	17
3.3 Tratamentos de Inoculação com Bactérias Diazotróficas	17
3.4 Caracterização <i>in vitro</i> das Estirpes de Bactérias Diazotróficas	17
3.4.1 Produção de auxina	18
3.4.2 Atividade de redução de acetileno	18
3.5 Promoção de Crescimento de Plântulas de Arroz por Bactérias Diazotróficas	19
3.5.1 Condições axênicas	19
3.5.2 Condições não-axênicas	20
3.6 Produção de Grãos por Cultivares de Arroz Inoculadas por Bactérias Diazotróficas	20
3.7 Desenvolvimento de Cultivares de Arroz Inoculadas com Bactérias Diazotróficas	21
3.7.1 Contagem de bactérias diazotróficas	21
3.7.2 Acúmulo de massa fresca e seca	22
3.7.3 Acúmulo de nitrogênio	22
3.7.4 Frações solúveis	22
3.7.5 Atividade da enzima nitrato redutase	23
3.7.6 Produção e teor de nitrogênio nos grãos	23
3.8 Análise Estatística	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Caracterização <i>in vitro</i> das Estirpes de Bactérias Diazotróficas	24
4.2 Promoção de Crescimento de Plântulas de Arroz por Bactérias Diazotróficas	25
4.2.1 Condições axênicas	25
4.2.2 Condições não-axênicas	28
4.3 Produção de Grãos de Cultivares de Arroz Inoculadas com Bactérias Diazotróficas	31
4.4 Desenvolvimento de cultivares de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas	34
4.4.1 Contagem de bactérias diazotróficas	34
4.4.2 Biomassa seca e acúmulo de nitrogênio	36
4.4.3 Frações solúveis	41
4.4.4 Atividade da enzima nitrato redutase	43
4.4.5 Produção e teor de nitrogênio nos grãos	45
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
7. ANEXO	57

INTRODUÇÃO

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um dos mais importantes processos conhecidos na natureza, sendo realizado apenas por microrganismos procariotos. Tais microrganismos, ditos diazotróficos, são capazes de reduzir o N_2 atmosférico tornando-o assimilável para as plantas (Reis et al., 2006).

Plantas capazes de formar associações com estas bactérias podem obter o nitrogênio, por meio da fixação biológica, quando este se encontra escasso nos solos. 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, como as que ocorrem principalmente com cereais e gramíneas, apresentam também importância nesta reciclagem, ressaltando-se ainda, que os cereais representam a base alimentar, principalmente dos países em desenvolvimento (Döbereiner, 1992).

Plantas de arroz são frequentemente colonizadas por diversas bactérias diazotróficas formando associações onde a contribuição em termos de fixação biológica de nitrogênio é muito pequena quando comparada ao fornecido pelo rizóbio às leguminosas (Ladha e Reddy, 2000). Apesar dos avanços em diversos aspectos da interação entre gramíneas e bactérias diazotróficas, a expectativa de se obter resultados semelhantes a da simbiose rizóbio/leguminosas ainda não se realizou, embora haja diversos aspectos semelhantes entre os dois sistemas (Baldani e Baldani, 2005).

Para que as plantas consigam aproveitar os benefícios da FBN, é necessário que o N_2 fixado pelos organismos diazotróficos seja liberado em uma forma assimilável. Em sistemas com microrganismos de vida livre ou associativa, a disponibilização do N fixado ocorre após a morte das células bacterianas e da lise dos constituintes celulares orgânicos que são diretamente absorvidos pelas raízes vegetais através de transportadores específicos (Kennedy et al., 2004). Em sistemas simbióticos, ocorre a transferência direta de moléculas contendo o nitrogênio fixado para as vias metabólicas vegetais de assimilação do nitrogênio (Kennedy et al., 2004). Nos processos de associações entre gramíneas e bactérias diazotróficas, a ausência de estruturas específicas, a variabilidade no estabelecimento e no funcionamento das associações e as dificuldades na quantificação da FBN no campo, têm dificultado as investigações (Patriquin et al., 1983).

Apesar de ser possível isolar um grande número de bactérias dos tecidos de arroz, poucas, em torno de 10%, são diazotróficas, o que dificulta o isolamento e a determinação da bactéria responsável pela FBN (James et al., 2000). A questão principal da interação entre plantas não-leguminosas e bactérias diazotróficas, pode ser simbolizado pelo questionamento feito por James et al (2002) no título de seu trabalho: “Podem associativos e endofíticos trazer uma contribuição significativa para a agricultura sustentável?”.

Os resultados obtidos por diversos pesquisadores demonstram que a inoculação com diazotróficos (associativos e/ou endofíticos) aumentam o crescimento da planta hospedeira. Experimentos com balanço de nitrogênio e diluição isotópica de ^{15}N , sugerem que a transferência de nitrogênio é significativa, embora outros fatores também possam beneficiar o crescimento da planta (Kennedy, 2001). A promoção do crescimento de plantas é um dos efeitos adicionais que podem ser observados com a inoculação de bactérias diazotróficas. Tal promoção pode ocorrer tanto pela modificação do balanço de fitormônios vegetais (Jain e Patriquin, 1985), mudança na absorção de nutrientes minerais (Li et al, 1983) ou indução da extrusão de prótons (Bashan, 1990), no entanto, frequentemente, respostas negativas também

são obtidas (Baldani e Baldani, 2005). E apesar de todos os esforços empregados, os mecanismos pelos quais as bactérias diazotróficas promovem o crescimento das plantas hospedeiras ainda não foram completamente esclarecidos (Bashan et al., 2004; Baldani e Baldani, 2005).

O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência da inoculação de bactérias diazotróficas no desenvolvimento das cultivares de arroz IR42 e IAC440, contrastantes quanto ao potencial de fixação biológica de nitrogênio, através de parâmetros agronômicos e fisiológicos.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ecofisiologia do Arroz

O arroz cultivado é geralmente considerado uma gramínea anual semi-aquática, embora nos trópicos, possa sobreviver como uma planta perene, produzindo novos perfilhos depois da colheita (Riceweb, 2003).

O ciclo do arroz oscila com a variedade e com o ambiente, mas, na maioria das vezes, situa-se na faixa de 110 a 150 dias. Constitui-se de três fases distintas: a fase vegetativa, que vai da germinação ao início do primórdio da panícula; a reprodutiva, que compreende o período entre o início do primórdio floral até o florescimento; e a fase de maturação, que corresponde ao período entre o término da floração ao amadurecimento completo. Uma variedade com ciclo de 120 dias, em clima tropical, apresenta fase vegetativa de 60 dias, reprodutiva de 120 dias e amadurecimento de 30 dias (Moreira e Kluge, 1999). A fase vegetativa é caracterizada por um ativo perfilhamento, gradual aumento no peso da planta e emergência de folhas a intervalos regulares, enquanto a fase reprodutiva é caracterizada, entre outros fatores, pelo aumento de peso da planta, declínio no número de perfilhos, emergência da folha bandeira (Riceweb, 2003).

A profundidade do sistema radicular, no arroz irrigado por inundação, raramente atinge 40 cm, sendo que a grande maioria das raízes se encontra na camada superficial do solo. O aparecimento de raízes está relacionado a fatores nutricionais, sendo o nitrogênio o mais importante nutriente para o desenvolvimento das raízes e para a manutenção das funções vitais (respiração, absorção de sais e de água). Observa-se que as raízes mais jovens são mais eficientes que as mais velhas. Conforme aumenta a idade, a raiz torna-se amarela e vai escurecendo até torna-se marrom-escura (Moreira e Kluge, 1999).

São diversas as influências dos fatores climáticos nas variedades, conforme o estágio de desenvolvimento da planta. Devido a seus efeitos diretos e indiretos, o clima é o principal fator que governa o requerimento hídrico da cultura. A perda de água que ocorre com a evapotranspiração, consiste na demanda mínima de água pela planta. Em relação à temperatura, o período mais crítico para as plantas de arroz é a fase de diferenciação da panícula e, principalmente, a fase inicial de formação do grão de pólen, que ocorre cerca de 8 a 10 dias antes da emergência da panícula. Temperaturas abaixo de 17°C ou acima de 40°C são bastantes prejudiciais nesses estádios. Na antese, temperaturas baixas dificultam a abertura ou crescimento do tubo polínico, podendo causar esterilidade nas espiguetas (Moreira e Kluge, 1999).

Em cada tonelada de arroz existe, em média, 12 kg de nitrogênio. Parte desse nutriente provém do solo, parte é fixada biologicamente, e mais de 50% do total é resultante de aplicações de fertilizantes químicos. A adubação de cobertura com nitrogênio tem sido realizada para aumentar a produção de espiguetas na estação seca e a maturação na estação chuvosa. Mas o resultado do aumento do nitrogênio na planta dura pouco tempo. Por isso, costuma ser efetuada adubação de cobertura em períodos mais adiantados da cultura. Observa-se ainda, que o nível adequado de nitrogênio, aliada à radiação solar apropriada, melhora o tamanho e a maturação dos grãos, por melhorar a atividade fotossintética (Moreira e Kluge, 1999).

Todas as folhas, em determinada fase do ciclo, são ativos centros fotossintéticos. Além da diferença de idade, as folhas possuem diferente posição relativa na planta. Distâncias físicas controlam a direção do movimento de substâncias assimiladas. No estágio de perfilhamento, normalmente, é a folha 7 o centro de atividade fotossintética; na indução

floral, são as folhas 9 e 10 e, no estágio de grão leitoso, é a folha 11. A folha 12, também chamada de bandeira, exporta assimilados principalmente para a panícula, ao passo que a 8 exporta para as raízes. O crescimento dos grãos é largamente dependente das folhas superiores, enquanto a atividade radicular é mantida por assimilados das folhas basais. Há evidências, no entanto, de que essa translocação de assimilados é flexível. Se, por alguma razão, as folhas basais morrerem ou perderem a função, folhas localizadas acima suprem as raízes (Moreira e Kluge, 1999).

Na fase vegetativa, o excesso de fotossintetizados produzidos pelas folhas é utilizado, principalmente, para a formação de novos perfilhos, de novas raízes e para o crescimento das folhas. Nessa fase, a capacidade produtiva da planta depende não só da eficiência fotossintética, mas da rapidez com que os fotoassimilados serão canalizados. A produção final depende da atividade fotossintética e da habilidade de transportar e armazenar carboidratos nos grãos. Ao iniciar-se a formação da panícula, o crescimento decai rapidamente, permitindo a acumulação, nas bainhas foliares e no colmo, de substâncias de reserva, principalmente amido e açúcares. Esses acúmulos atingem maior valor na antese. A partir da antese, os carboidratos são, em grande parte, deslocados para as espiguetas; cerca de 20% são gastos na respiração e 12% permanecem nas folhas e colmo. Essa redistribuição de carboidratos armazenados nas partes vegetativas da planta, corresponde a cerca de 21% dos carboidratos armazenados nos grãos, porém estimativas consideram que essa contribuição possa ser de 40% e até 90%, em casos extremos. A fotossíntese líquida da espiga e das bainhas foliares é muito pequena, e a maior parte dos carboidratos provém da fotossíntese da folha bandeira e das três folhas do topo, que contribuem com cerca de 86% dos carboidratos produzidos nessa fase. A eficiência de transporte de fotoassimilados para o grão é dada pela relação entre a massa do grão e a massa total da parte aérea, conhecida como índice de colheita. Variedades produtivas apresentam boa produtividade biológica e alto índice de colheita, embora haja variação conforme a radiação solar, temperatura, disponibilidade hídrica e nutrientes (Moreira e Kluge, 1999).

Temperatura baixa, falta de água ou outro estresse, no início da formação da panícula, ou no florescimento, reduzem a produção por falta de espiguetas férteis, mesmo que a fotossíntese na fase de maturação se realize em condições ótimas. O índice de colheita cai e boa parte dos carboidratos permanece nas folhas e no colmo da planta (Moreira e Kluge, 1999).

Dentre os nutrientes exigidos pela cultura do arroz, o nitrogênio é o que mais limita a produção, principalmente entre as variedades modernas de alto rendimento. Uma vez que a resposta ao nitrogênio tem sido verificada mesmo em solos com elevado teor de matéria orgânica, tal parâmetro não é um bom indicador da disponibilidade de N para a cultura do arroz irrigado (Paula et al., 1990; Assis et al., 2000). Plantas de arroz cultivadas em solos com limitações de N, P e K, apresentam uma redução no perfilhamento, com redução na produção de massa seca da parte aérea e raízes das plantas (Assis et al., 2000).

2.2 Nitrogênio

Constituinte obrigatório de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, o nitrogênio participa direta e indiretamente de diversos processos bioquímicos de plantas. A maior concentração de nitrogênio é encontrada na atmosfera, cerca de 78%, porém este se encontra na forma de N_2 , um gás inerte, que não reage quimicamente nas condições naturais. Nos solos, a forma predominante de nitrogênio é a orgânica, no entanto, nitrogênio mineral, na forma de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e nitrito (NO_2^-) também estão presentes (Fernandes e Rossiello, 1995; Fageria e Stone, 2003).

A principal característica do ciclo do nitrogênio é a interação entre as atividades de microrganismos autotróficos e heterotróficos. Através da fotossíntese, os vegetais e microrganismos autotróficos, transformam a energia solar e o CO₂, em biomassa. Quando incorporados ao solo, os resíduos vegetais são utilizados como fonte de carbono e energia pelos microrganismos heterotróficos, ocorrendo a transformação do nitrogênio orgânico para formas inorgânicas, que são absorvidas pelas plantas ou imobilizadas dentro da biomassa microbiana. Tanto o nitrogênio quanto os outros elementos essenciais, são repetidamente utilizados pela circulação contínua entre as fases autotróficas e heterotróficas do ecossistema (Camargo et al., 1999).

O ciclo interno do nitrogênio no solo é o controlador da disponibilidade de nitrogênio para nutrição das plantas. A maioria dos processos de transformação do nitrogênio nos solos é mediada por microrganismos, sendo que os fungos e as bactérias são os de maior importância. As transformações do nitrogênio no solo podem ser divididas em quatro processos principais: (a) fixação, realizada por microrganismos, consiste na redução do N₂ atmosférico, um gás inerte, para uma forma assimilável (amônia); (b) mineralização, transformação do nitrogênio orgânico em nitrato através da amonificação e nitrificação; (c) imobilização, utilização do nitrogênio mineral durante o metabolismo microbiano, ocorrendo simultaneamente a mineralização; (d) desnitrificação, processo de respiração anaeróbia que resulta em perda de nitrogênio (Victoria et al., 1992).

Em solos aeróbios, o nitrato é a fonte mais importante de nitrogênio para as plantas (Forde, 2000), pois as condições aeróbias favorecem a nitrificação (Ingrahan, 1981), entretanto o comportamento do nitrogênio em solos submersos é marcadamente diferente daquele observado em condições de sequeiro. Com a inundação, ocorre uma maior concentração de amônio nos solos, além disto o nitrato é reduzido para formas gasosas, no processo de desnitrificação (Figura 1).

Desnitrificação é classicamente definida como a redução de nitrato a produtos gasosos, resultando em perda de nitrogênio fixado, sendo este um processo de respiração anaeróbia, o nitrato atua como um acceptor final de elétrons para os microrganismos do solo (Ingrahan, 1981). 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 aeróbia/anaeróbia, favorecendo a desnitrificação e portanto as perdas de nitrogênio (Urquiarga et al., 1993).

Arth et al. (1998) verificaram que um processo de desnitrificação acoplado a nitrificação ocorre na rizosfera do arroz levando a perda de N, na forma de N₂O ou N₂. Através do aerênquima das plantas de arroz ocorre o transporte do O₂ da atmosfera para as raízes, parte deste é perdido para a rizosfera, onde pela criação de um ambiente aeróbio ocorre o processo de nitrificação (formação de nitrato), através da ação das bactérias *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* (nitrificantes). Este nitrato se difunde rapidamente para a região anaeróbia (reduzida) do solo, sofrendo o processo de desnitrificação (respiração de nitrato) pelos microrganismos anaeróbios, resultando na perda de N (como N₂ ou N₂O).

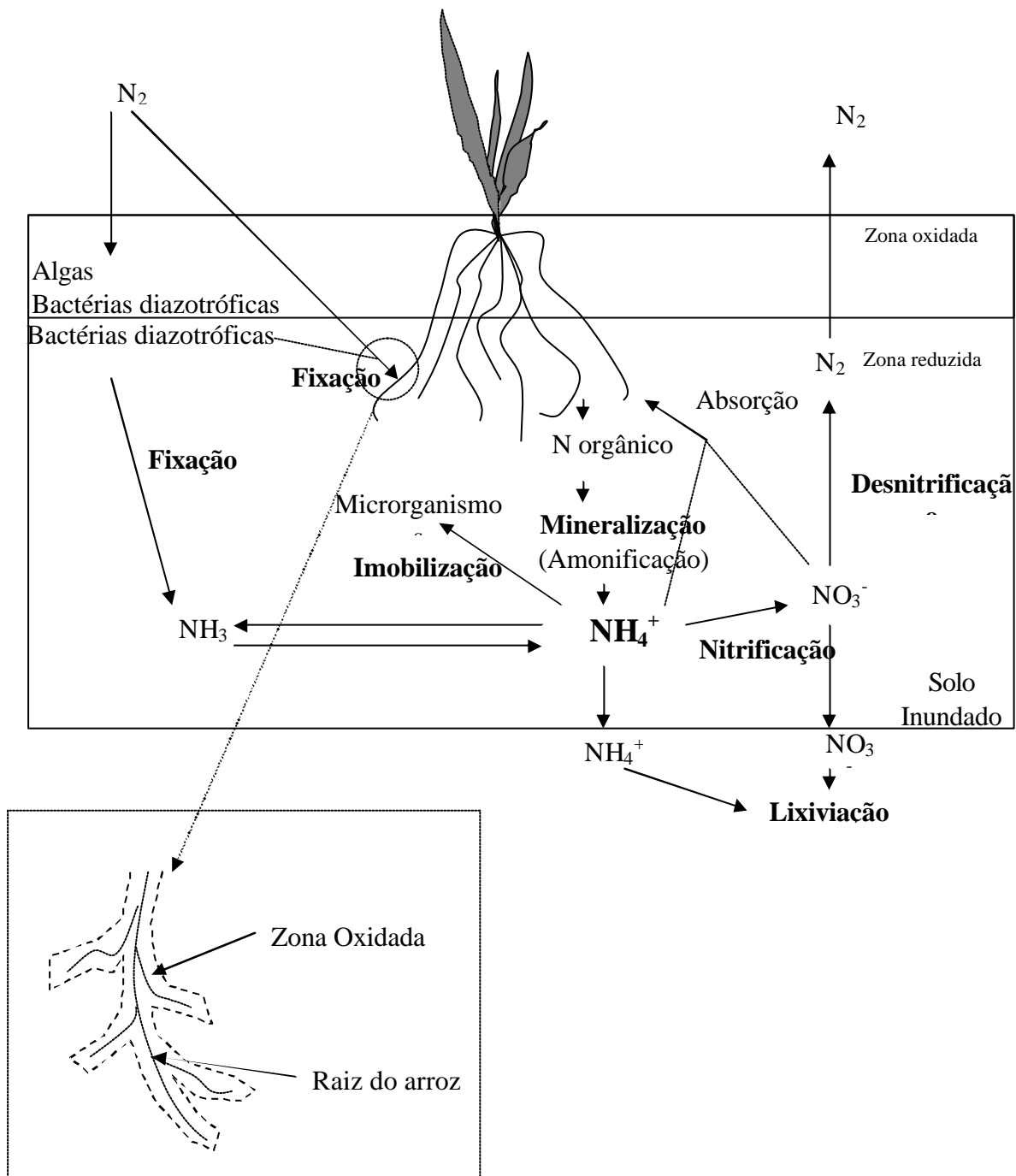


Figura 1: Dinâmica de nitrogênio em solos inundados cultivados com plantas de arroz (Adaptado de Marschner, 1995; Guimarães, 2006).

2.3 Enzimas de Assimilação de Nitrogênio

A assimilação do nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Sua assimilação dentro dos esqueletos de carbono tem marcante efeito na produtividade, biomassa e produção de grãos das plantas. A deficiência de nitrogênio em plantas é uma das causas de decréscimo no nível de componentes estruturais fotossintéticos tais como clorofila e a enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco),

resultando em reduções da capacidade fotossintética e eficiência da carboxilação (Lam et al., 1996).

O nitrato é a principal fonte de nitrogênio para a maioria das plantas (Campbell, 1988). As plantas adquirem o nitrato da solução do solo através da membrana plasmática das células da epiderme e do córtex das raízes. Uma vez dentro da célula, o nitrato é reduzido a amônio pela nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR) e o nitrogênio amoniacal, é então incorporado a glutamina e glutamato, através da ação das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), podendo ser transportado para as diferentes partes das plantas (Forde, 2000). Uma outra enzima envolvida na assimilação do nitrogênio é a glutamato desidrogenase (GDH). As enzimas GS, GOGAT e GDH participam dos três maiores processos de assimilação de amônio: assimilação primária, reassimilação da amônia fotorrespiratória e reassimilação do nitrogênio reciclado. Cada uma destas enzimas ocorre em diversas isoformas. Diversos trabalhos utilizando técnicas moleculares e plantas mutantes deficientes em uma isoenzima específica do metabolismo do nitrogênio, demonstram que os genes para estas enzimas não são constitutivamente expressos, mas são cuidadosamente regulados por fatores tais como luz, disponibilidade de metabólitos e tipo de célula. (Lam et al., 1996).

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 do nitrato na vida da planta é similar ao da redução e assimilação de CO₂ na fotossíntese (Marschner, 1995; Forde, 2000). Na maioria das espécies de plantas somente uma porção do nitrato absorvido é reduzida nas raízes, ocorrendo o transporte, através do xilema, para redução nas folhas. Em situação de excesso de nitrato, o mesmo pode ser acumulado no vacúolo. O nitrato acumulado no vacúolo pode ser considerado importante no balanço cátion-anion para a osmoregulação da planta. Trabalhando com plantas de arroz em solução nutritiva, Bucher et al. (2004), observaram que as duas cultivares testadas foram capazes de absorver nitrato do meio, mesmo quando este se encontrava em baixíssimas concentrações.

A conversão do nitrato a amônio, é em um processo de redução que ocorre em duas etapas e envolve oito 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 seis elétrons (Beevers e Hageman, 1969; Guerrero et al, 1981; Solomonson e 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 nitrato e água (Bandurski, 1965; Beevers e Hageman, 1969; Fernandes, 1978; Marschner, 1995; Souza et al., 2002).

De acordo com o tipo de doador de elétrons, dois tipos de nitrato redutase assimilatórias podem ser distinguidas. O NADH é o principal doador de elétrons nas plantas superiores e algas eucarióticas, e somente os fungos utilizam o NADPH como doador de elétrons. No entanto, algumas plantas superiores (arroz, milho, cevada e soja) e algumas espécies de algas podem utilizar tanto o NADH quanto o NADPH como doador de elétrons para a NR, sendo chamadas de plantas NAD(P)H-NRs bi-específicas. O nitrito formado pela ação da NR é tóxico, não podendo, portanto, ser acumulado nos tecidos das plantas. A redução do nitrito a amônio ocorre pela ação da enzima nitrito redutase. O nível de NiR em diferentes células e tecidos é muito maior do que o de NR, desta maneira a acumulação de nitrito raramente é observada (Souza et al., 2002). 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 nitrato nas folhas e, que durante a fase de enchimento de grãos, sejam capazes de reduzir e remobilizar este nitrogênio para os grãos.

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), no ciclo conhecido como GS/GOGAT (Minflin e Lea, 1977; Lea et al., 1990). O ciclo de assimilação do amônio via GS/GOGAT é considerado hoje como a principal rota de assimilação do amônio em plantas superiores. Nele, o amônio é inicialmente incorporado em glutamato formando glutamina via GS e então, pela ação da GOGAT, é transferido para o a-cetoglutarato, formando duas moléculas de glutamato (Souza et al., 2002).

Tanto em raízes, como em folhas, a GOGAT foi detectada em plastídeos, tendo duas isoformas: NADH-GOGAT, localizada principalmente em tecidos não verdes, como raízes, nódulos e cotilédones em desenvolvimento; Fd-GOGAT, localizada no estroma do cloroplasto, sendo a forma predominante desta enzima nas folhas. Antes da descoberta da GOGAT, em 1971 (Tempest et al., 1971, citado por Souza et al., 2002), a GDH era considerada a única enzima responsável pela incorporação do amônio em aminoácidos. A GDH promove a ligação do amônio ao a-cetoglutarato, formando o glutamato, utilizando o NADH (mitocôndrias) ou o NADPH (cloroplastos) como doadores de elétrons. Devido a seu alto K_m para o amônio, a GDH parece não estar ligada à assimilação de nitrogênio primário, mas sim envolvida na assimilação de altos níveis de amônio como os liberados na mitocôndria, através da fotorrespiração e reações catabólicas, e metabolismo relacionado à senescência (Souza et al., 2002).

2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio

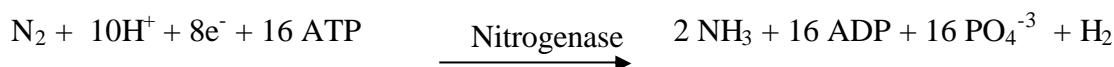
A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um dos mais importantes processos conhecidos na natureza, sendo realizado apenas por microrganismos procariotos. Tais microrganismos, ditos diazotróficos, são capazes de reduzir o N_2 atmosférico tornando-o assimilável. A primeira bactéria diazotrófica foi descrita em 1893. Desde então diversos estudos e uma vasta literatura sobre o tema foram produzidos (Reis et al., 2006).

Todas as bactérias diazotróficas possuem um complexo enzimático chamado nitrogenase, que dentre outros substratos alternativos, reduz o nitrogênio atmosférico a amônia (Neves, 1993). A enzima nitrogenase é o fator chave da fixação biológica de nitrogênio, pois é responsável pela redução do nitrogênio atmosférico a amônia, com produção de H_2 . Alternativamente esta enzima também é capaz de reduzir acetileno em etileno, sendo esta característica frequentemente utilizada para estimar a FBN (Sprent e Sprent, 1990).

A nitrogenase é uma molibdênio ferro proteína que hidrolisa 16 adenosinas trifosfatos (ATP) e transfere oito elétrons por molécula de N_2 fixado, sendo um dos processos metabólicos que mais demanda energia da célula. Alguns microrganismos possuem nitrogenases ditas alternativas, onde o molibdênio é trocado por vanádio ou ferro. Atualmente são conhecidos três tipos de nitrogenases: a que possui molibdênio (Mo, nitrogenase-1) e ferro (Fe), outra que apresenta vanádio no lugar do Mo (V, nitrogenase-2) e uma terceira que só apresenta ferro (nitrogenase-3). No entanto estas nitrogenases alternativas só são expressas na falta de molibdênio, sendo que a de vanádio é expressa preferencialmente à de ferro, estando nesta mesma ordem a eficiência na redução do N_2 . A nitrogenase é uma enzima relativamente lenta e para produzir níveis adequados de nitrogênio fixado, o conteúdo enzimático em bactérias diazotróficas é de aproximadamente 10% da proteína celular total. Em função do seu alto custo energético (duas moléculas de ATP para cada elétron transferido para o sítio catalítico), ela é uma enzima fortemente regulada em muitos organismos. Diversos fatores regulam a expressão e atividade das nitrogenases, como por exemplo, a concentração

de oxigênio, disponibilidade energética da célula, idade fisiológica, nitrogênio, principalmente na forma de amônio, entre outros (Reis et al., 2006).

A reação catalisada pela nitrogenase pode ser resumida da seguinte forma:



Os genes que codificam as proteínas da nitrogenase-1 são chamados de *nif* (para nitrogenase-2 são *vnf* e para nitrogenase-3 são *anf*). Estes genes foram primeiramente estudados em *Klebsiela pneumoniae*. Onde os genes da fixação de nitrogênio ocupam uma região de aproximadamente 25 kb, apresentando-se num total de 20 genes (*nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifF*, *nifH*, *nifJ*, *nifK*, *nifL*, *nifM*, *nifN*, *nifQ*, *nifS*, *nifT*, *nifU*, *nifV*, *nifX*, *nifY*, *nifW*, *nifZ*) organizados em 8 operons (Arnold et al., 1988, Merrick, 1993). No entanto, a maneira como estes genes se organizam, bem como a presença de todos estes genes não é universal. A análise de outras bactérias demonstrou que dos 20 genes *nif* identificados em *K. pneumoniae*, 14 são comuns na maioria das bactérias diazotróficas sugerindo que esse grupo de genes é necessário para a biossíntese da nitrogenase. Os genes *H*, *D* e *K* (*nifHDK*), são genes estruturais da nitrogenase, responsáveis pela regulação da transferência de elétrons para a Mo-Fe-proteína, e redução do N_2 a amônia (Reis e Teixeira, 2005). A Figura 2 mostra esquematicamente os genes estruturais da enzima nitrogenase e seus principais reguladores.

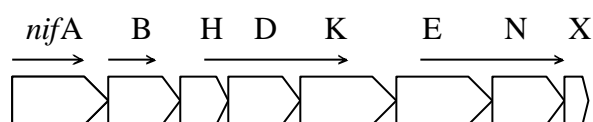


Figura 2: Desenho esquemático do arranjo dos genes estruturais da enzima nitrogenase (*nif* HDK) e seus principais reguladores (*nifA*, *nifB*, *nifENX*) (Brasil, 2005).

A atividade da nitrogenase em vários microrganismos diazotróficos é inibida de forma rápida e reversível pela adição de amônio. Uma vez que o custo energético da reação de fixação é muito elevado, a atividade da nitrogenase apresenta um alto controle genético sendo também regulada por fatores ambientais. Em bactérias do gênero *Azospirillum* a adição de amônio de 1 a 10 mM em meio de cultura, reduz a atividade da nitrogenase para 10% ou menos da atividade inicial, além de cessar a síntese da nitrogenase. Em outros organismos é observado um declínio gradual da atividade, porém sem inibição reversível das enzimas presentes (Reis e Teixeira, 2005).

Plantas capazes de formar associações com estas bactérias podem obter o nitrogênio, por meio da fixação biológica, quando este se encontra escasso nos solos. 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, apresentam também grande importância, nesta reciclagem, ressaltando-se ainda, que os cereais representam a base alimentar, principalmente dos países em desenvolvimento (Döbereiner, 1992).

Como revisado por Baldani e Baldani (2005), a pesquisa da FBN em gramíneas no Brasil foi iniciada por Johanna Döbereiner, alcançando expressividade com a descoberta, em 1958, da *Beijerinchia fluminense* associada à cana-de-açúcar, e em 1966, do *Azotobacter paspali* associada à *Paspalum notatum* cv *batatais*. Dentre as diversas descobertas que impulsionaram as pesquisas nesta área podem ser citadas a utilização de meios de cultura semi-sólidos, bem como a introdução da técnica de redução de acetileno.

As bactérias que realizam estas associações com gramíneas e outras plantas não-leguminosas têm sido caracterizadas como bactérias associativas (Reis et al., 2004). De acordo com Kloepper et al. (1997), bactérias endofíticas são aquelas que podem ser isoladas de tecidos vegetais superficialmente desinfestados ou extraídas de dentro da planta, e que não causam danos visíveis ou induzem sintomas na planta. O conceito “diazotrófico endofítico” foi introduzido por Döbereiner (1992) referindo-se à habilidade de alguns diazotróficos, que apresentam uma baixa sobrevivência no solo, colonizarem principalmente o interior de raízes de gramíneas e, em associação com estas plantas, fixarem nitrogênio. Posteriormente este grupo foi dividido em endofíticos facultativos, capazes de colonizarem tanto a rizosfera quanto o interior das raízes, porém com baixa sobrevivência no solo, enquanto os endofitos obrigatórios, embora colonizem o interior das raízes e a parte aérea, não sobrevivem bem no solo (Baldani et al., 1987).

Neste tipo de interação, como a que ocorre entre cana-de-açúcar e bactérias diazotróficas, a bactéria coloniza os espaços intercelulares e tecido vascular da maioria dos órgãos da planta, sem induzir sintomas de doenças ou formação de nódulos. É provável, que fatores genéticos da planta hospedeira controlem os processos de infecção dos microrganismos, porém, as vias de sinalização não são claramente entendidas (Vargas et al., 2003).

Para que as plantas consigam aproveitar os benefícios da FBN, é necessário que o N_2 fixado pelos organismos diazotróficos seja liberado em uma forma assimilável. Em sistemas com microrganismos de vida livre ou associativa, a disponibilização do N fixado ocorre após a morte das células bacterianas e da lise dos constituintes celulares orgânicos que são diretamente absorvidos pelas raízes vegetais através de transportadores específicos (Kennedy et al., 2004). Algumas espécies como *Beijerinckia dextrii* são capazes não só de acumular como também liberar substâncias nitrogenadas, durante a fase de crescimento estacionário, em meio de cultura livre de nitrogênio (Myasaka et al., 2003). Em sistemas simbióticos, ocorre a transferência direta de moléculas contendo o nitrogênio fixado para as vias metabólicas vegetais de assimilação do nitrogênio (Kennedy et al., 2004). Nos processos de associações entre gramíneas e bactérias diazotróficas, a ausência de estruturas específicas, a variabilidade no estabelecimento e no funcionamento das associações e as dificuldades na quantificação da FBN no campo, têm dificultado as investigações (Patriquin et al., 1983).

2.5 Bactérias Diazotróficas

Bactérias fixadoras de nitrogênio associativas colonizam a rizosfera e o interior das células corticais das plantas hospedeiras (Kenedy, 2001), penetram na endoderme e colonizam os vasos condutores, podendo então, atingir a parte aérea (James et al., 1999). Estas bactérias, pertencentes principalmente ao grupo das β -Proteobacteria, estão incluídas em diferentes gêneros. As plantas hospedeiras destas bactérias são monocotiledôneas, como trigo, milho, arroz, cana-de-açúcar, e poucas dicotiledôneas (Kennedy, 2001).

Dentre as bactérias diazotróficas que formam associação do tipo endofítica com gramíneas, podem ser citados os gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus* e *Burkholderia* (Baldani et al., 1999, Reis et al., 2000).

A primeira espécie de *Azospirillum* foi descrita por Beijerinck (1925). Em 1976, J. Döbereiner e JM Day isolaram esta bactéria e foram os primeiros a relatar que a mesma estava presente na rizosfera de diversas gramíneas tropicais (Bashan e Levanony, 1990). Desde esta redescoberta, as espécies de *Azospirillum* ganharam a reputação de serem as bactérias associativas de plantas mais estudadas. As espécies *A. brasilense*, *A. lipoferum* e *A. amazonense* ocorrem em cereais (milho, sorgo, trigo e arroz), em forrageiras, cana-de-açúcar e amostras de solos rizosférico. Além destas também são conhecidas outras três espécies

fixadoras de nitrogênio: *A. doebereineriae* (Eckert et al., 2001), *A. halopraferens* (Reinhold et al., 1987) e *A. irakense* (Khammes et al., 1989).

Gluconacetobacter diazotrophicus é encontrada no Brasil e em vários países com uma sobrevivência muito baixa no solo sendo propagada via tolete de cana ou mesmo na palha da própria cultura, em esporos de fungos micorrízicos arbusculares presentes no solo ou por insetos (Baldani et al., 1999). Esta bactéria apresenta uma certa tolerância ao amônio, não apresentando inibição da atividade da nitrogenase por nitrato, o que representa uma vantagem ecológica e agrônômica, porque permite complementar a contribuição da fixação biológica com a fertilização nitrogenada aplicada ao solo (Boddey et al., 1991).

Bactérias do gênero *Azoarcus* foram primeiramente isoladas da gramínea Kallar (*Leptochloa fusca* L.) cultivada em solos salino-sódicos do Paquistão (Reinhold-Hurek et al., 1993). A ocorrência natural deste gênero, em associação com plantas de arroz também foi demonstrada (Engelhard et al., 2000), porém não há relatos no Brasil. Os principais representantes fixadores deste gênero são: *A. indigenes* e *A. communis* (Reinhold-Hurek et al., 1993).

O gênero *Herbaspirillum* apresenta atualmente onze espécies, sendo quatro fixadoras de nitrogênio: *H. seropedicae* (Baldani et al., 1986); *H. rubrisubalbicans* (Baldani et al., 1996); *H. frisingense* (Khirschhof et al., 2000); *H. lusitanum* (Valverde et al., 2003). A espécie *Herbaspirillum seropedicae*, primeira espécie descrita do gênero, foi isolada de arroz, milho e sorgo (Baldani et al., 1986), enquanto *H. rubrisubalbicans* está mais restrita a plantas de cana-de-açúcar, sendo a espécie causadora da doença estria mosqueada na variedade susceptível b-3462 (Olivares et al., 1996).

Apesar da grande diversidade do gênero *Burkholderia*, poucas são diazotróficas: *B. vietnamiensis* (Gillis et al., 1995), *B. kurkuriensis* (Zhang et al., 2000), *B. tropica* (Reis et al., 2004), *B. phymatum* (Vandamme et al., 2002), *B. unamed* (Cabalero-Melado et al., 2004). Uma outra espécie, "*Burkholderia brasiliensis*" está sendo proposta. Avaliações através da técnica de Análise de Restrição de RNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) demonstraram que a estirpe M130 apresenta 99,9% de homologia com o padrão obtido pela estirpe KP23 de *B. kurkuriensis* (Estrada de Los Santos et al., 2001), sugerindo que estas duas estirpes talvez sejam representantes da mesma espécie. A este respeito, experimentos de homologia DNA:DNA estão sendo realizados (Baldani e Baldani, 2005). Até 1999, acreditava-se que os diazotróficos do gênero *Burkholderia* tinham ocorrência mais restrita às plantas de arroz, onde são encontradas em elevado número (Baldani et al., 1999). Atualmente, bactérias deste gênero têm sido encontradas como a espécie predominante nos nódulos de diversas leguminosas (Moulin et al., 2003; Barret e Parker, 2005).

Resultados obtidos por diversos pesquisadores demonstram que, a inoculação com diazotróficos é capaz de promover o crescimento da planta hospedeira por mecanismos ainda não completamente esclarecidos, mas provavelmente associados ao aumento de massa radicular, nutrição nitrogenada ou aumento na eficiência de absorção de nutrientes do solo, entre outros (Bashan et al., 2004).

O conceito original de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP) compreende bactérias colonizadoras de raízes que causam promoção de crescimento ou que atuam no controle biológico de doenças de plantas. O mais bem estudado sistema RPCP é o gênero *Azospirillum*. A inoculação deste gênero resulta em promoção de crescimento de raízes, com aumento no comprimento, no número de pêlos radiculares e na área radicular. Estes efeitos nas raízes geralmente são dependentes da produção de ácido indol acético (AIA) pela bactéria. Contudo, o AIA não é o único efeito positivo observado e, embora a FBN seja excluída na promoção de crescimento, sua contribuição é controversa. Uma hipótese aditiva para explicar os mecanismos de promoção de crescimento por *Azospirillum* foi proposta. A hipótese estabelece que enquanto um simples mecanismo pode atuar para a promoção de

crescimento, a completa magnitude da promoção de crescimento resulta do efeito aditivo de diversos mecanismos que atuam durante o processo de crescimento (Klopper, 2003).

Experimentos com balanço de nitrogênio e diluição isotópica de ^{15}N , sugerem que a transferência de nitrogênio através da FBN é significativa, embora outros fatores, tais como, a produção de ácido indol acético, também possam beneficiar o crescimento da planta (Kennedy, 2001). Efeitos hormonais, fixação biológica de nitrogênio e interferência na assimilação do nitrogênio podem ser observados durante a associação (Patriquin et al., 1983), no entanto, freqüentemente, respostas negativas também são obtidas. E apesar de todos os esforços empregados, ainda não foi possível determinar o real papel desempenhado pelas bactérias associativas e/ou endofíticas na associação com as plantas não-leguminosas (Baldani e Baldani, 2005).

Trabalhando em condições axênicas, Radwan et al. (2004) observaram que a inoculação de estirpes de *Herbaspirillum* em plântulas de trigo (cv. BEM16) crescendo em meio de cultivo suplementado com triptofano, levou a redução do comprimento e da área radicular, comparável à aplicação de 100 μM de AIA ao meio de cultivo. As estirpes de *Azospirillum*, incluindo uma mutante não fixadora de nitrogênio (Nif), tiveram um efeito mais acentuado, tanto nas plântulas de trigo quanto nas de arroz (cv. IR42), produzindo efeitos similares à aplicação de 250 μM de AIA. No entanto, sem a adição de triptofano ao meio, estes efeitos somente foram observados nas plântulas de arroz, porém de uma forma bem menos expressiva.

Em função da variabilidade e inconsistência nos experimentos de inoculação, o Brasil ainda não apresenta uma produção comercial de inoculantes para plantas não-leguminosas, embora outros países já comercializem inoculantes com bactérias do gênero *Azospirillum* (Baldani e Baldani, 2005). Apesar deste fato, *Azospirillum* pode ser considerado um excelente modelo para estudos genéticos de bactérias associativas de plantas em geral (Bashan e Holguin, 1997).

2.6 Arroz e Bactérias Diazotróficas

O arroz, *Oryza sativa* L., é uma espécie hidrófila que em função do seu processo evolutivo, é capaz de se adaptar as mais variadas condições ambientais (Vieira et al., 1999). É uma planta monocotiledônea, da família *Poaceae* (antiga Gramínea), adaptada ao ambiente aquático devido à presença do tecido aerênquima, que permite a circulação do ar dentro da planta, e conseqüentemente entre a atmosfera e a rizosfera (Lima et al., 2002).

O gênero *Oryza* é constituído por 20 espécies conhecidas, sendo *Oryza sativa* a mais cultivada. Originária do sudoeste da Ásia tem como subespécies mais importantes a *indica*, que apresenta grãos longos e finos; a *japonica*, de grãos longos e espessos. A cultura desenvolve-se nos mais diversos solos: de distróficos a eutróficos, a textura pode variar de arenosa à argilosa, o pH de 3 a 10 e o teor de matéria orgânica de 1% a 50%. O arroz também é exposto à dinâmicas mudanças de umidade, que variam de solos secos a alagados. A textura do solo afeta a umidade mais do que a topografia, podendo então afetar mais a cultura. A freqüência e a duração do estresse de água não são afetadas só pelo regime de chuvas, mas, também, pela capacidade de armazenamento do solo (Moreira e Kluge, 1999).

Mais de 50% da população mundial têm o arroz como parte de sua dieta básica, sendo que a maior área de plantio e consumo está localizada no continente asiático. Também ocupa uma posição de destaque na dieta do povo brasileiro, sendo consumido por todas as classes sociais, principalmente pelas de baixa renda (Fageria et al., 2003). O arroz pode ser cultivado sob diferentes sistemas: a) arroz irrigado, plantado em várzeas sistematizadas, apresentando irrigação controlada por uma lâmina d'água; b) arroz de terras altas (sequeiro), plantado em áreas mais altas, dependendo exclusivamente das chuvas para o seu desenvolvimento; c) arroz

cultivado em condições de várzeas úmidas e em áreas favorecidas pela irrigação por aspersão (Lima et al., 2002).

No Brasil, o arroz, ocupa uma área total de 3 milhões de hectares, com uma produção de 11 milhões de toneladas de grãos, e um rendimento médio de $3,9 \text{ ton}\cdot\text{ha}^{-1}$ (IBGE, 2006). A maior parcela de produção de arroz no Brasil é proveniente das várzeas, onde a orizicultura irrigada é responsável por 69% da produção nacional, ocupando 31% da área cultivada com arroz. No território brasileiro, há 33 milhões de hectares de várzeas, com topografia e disponibilidade de água, propícias à produção de alimentos, entretanto, apenas 3,7% dessa área são utilizadas para a orizicultura. Na região tropical a área cultivada com arroz irrigado está ao redor de 13% apenas, propiciando cerca de 11% da produção total brasileira neste ecossistema (Fageria et al., 2003; Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz se destaca pela produção e área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto em nível econômico quanto social. É considerado o produto de maior importância econômica em muitos países em desenvolvimento, constituindo-se o alimento básico de cerca de 2,4 bilhões de pessoas. O arroz é a fonte primária de energia e proteína para os povos das nações mais populosas da Ásia, África e América Latina. Considerado um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína *per capita* necessária ao homem, sendo a espécie com maior potencial de aumento de produção e, possivelmente de combate à fome do mundo (Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

Além disto, nas últimas décadas, em função do aumento das pesquisas sobre fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas não-leguminosas, o arroz tem obtido um novo destaque. A associação do arroz com bactérias diazotróficas, capazes de transformar o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia, aumenta a disponibilidade de nitrogênio para a cultura, e o arroz inundado, um sistema ambiental altamente complexo, permite que diferentes microrganismos diazotróficos se desenvolvam. O gradiente de oxigênio ao redor das raízes, formado nos cultivos de arroz em solos inundados, permite o desenvolvimento de vários grupos de diazotróficos com diferentes mecanismos de proteção da nitrogenase contra o oxigênio, em microzonas onde a concentração de O_2 é ótima (Oliveira, 1992). Uma das razões para considerar o arroz como um dos promissores candidatos para a pesquisa de fixação biológica de nitrogênio é a observação que o status de nitrogênio das terras inundadas, sob cultivo de arroz, é mantido pela 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 e os gêneros presentes variam em função do nicho, aeróbio (raiz da planta e superfície da água) ou anaeróbio (água, superfície e dentro do solo). Esta diversidade de microrganismos fixadores de N_2 , dificulta a identificação e a avaliação da participação de cada indivíduo neste processo (Siqueira e Franco, 1988).

Outro fator relevante que pode estar presente na cultura do arroz inundado é a incorporação de N ao sistema pela espécie *Azolla*. Na simbiose entre esta planta e *Anabaena/Nostoc*, o simbionte se localiza na cavidade foliar do vegetal e a troca de N_2 fixado por fotoassimilados é realizada por meio de pêlos de transferência (Reis et al., 2006). Em cultivos de arroz, as taxas de FBN por bactérias de vida livre e associativas, são baixas comparadas com as taxas de FBN em Leguminosas, enquanto *Azolla* demonstra uma produtividade intermediária (Tabela 1). Porém a exploração da *Azolla* nem sempre é possível. A *Azolla* é sujeita a uma ampla taxa de estresses bióticos e abióticos, sendo difícil a manutenção dos inóculos durante a estação seca, entre outros. Além disto, a *Azolla* apresenta diferentes usos que frequentemente são mais utilizados pelos agricultores, do que a manutenção do “status” de nitrogênio para o arroz (Bennett e Ladha, 1992).

Tabela 1: Estimativa para a fixação de N₂ para diversos sistemas fixadores

Sistema de Fixação de N ₂	Bactéria	Taxa Max. de N fixado (KgN/ha)
Bactérias de vida livre/ associativas		
Arroz-cianobactéria	<i>Anabaena, Nostoc</i>	80
Arroz-bactérias associativas	<i>Pseudomonas</i>	30
Cana-bactérias associativas	<i>Gluconacetobacter</i>	160
Simbiose		
Arroz- <i>Azolla</i>	<i>Anabaena</i>	100
Soja	rizóbio	237

Fonte: Bennett e Ladha, 1992

Experimentos para avaliação dos efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de arroz estão sendo realizados, no entanto, no Brasil, poucos grupos de pesquisa estão envolvidos, destacando-se a Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ), como um dos principais centros onde este tipo de pesquisa é desenvolvido.

Dentre os resultados obtidos, Oliveira (1994) observou através da técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, que a cultivar de arroz IR42 apresentou o menor enriquecimento de ¹⁵N, obtendo uma contribuição da FBN de 29,7%, quando comparada a cultivar IAC4440, que apresentou a menor contribuição, tendo sido por isto utilizada como testemunha não-fixadora nos cálculos de estimativa da FBN. Dados estes, confirmados por Campos et al. (2003), utilizando a mesma metodologia. Apesar das diferenças na contribuição da FBN, uma correlação com o número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas presentes nas duas cultivares não foi observada (Campos, 1999). Do mesmo modo, Boddey (1995) observou que apesar do arroz receber contribuições significativas da FBN, existem diferenças entre as cultivares, que não estão relacionadas à presença de um alto número de células de bactérias diazotróficas associadas às raízes da cultura.

Diversas bactérias fixadoras de nitrogênio foram isoladas de tecidos superficialmente desinfestados de plantas de arroz. Trabalhos nas Filipinas, Paquistão e Brasil, demonstraram que algumas variedades de arroz inundado (principalmente a IR42) podem obter através da FBN mais de 30% da sua necessidade de N. Dentre os diazotróficos endofíticos, um dos mais promissores em termos de FBN em plantas de arroz é *H. seropedicae* (James et al., 2002).

Plantas de arroz em condições de campo apresentaram variabilidade nas respostas quando inoculadas com estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia* sp. A estirpe ZAE94 (BR11417) de *H. seropedicae* propiciou os maiores e mais consistentes resultados em duas variedades de arroz (Baldani et al., 1999). Através de dados de diluição isotópica de ¹⁵N, Baldani et al. (2000) demonstraram que duas estirpes de *H. seropedicae*, ZAE94 e ZAE67, contribuíram com 54% e 31%, respectivamente, em condições axênicas, e em até 18% em experimentos em casa de vegetação.

Interação entre estirpes de bactérias diazotróficas e cultivares de arroz foi observada por Guimarães et al. (1999), em experimento de campo, onde a inoculação da variedade Guarani levou a aumento de 60% (ZAE94 - *H. seropedicae*) e 38% (M130 - *Burkholderia* sp.). Em trabalho posterior, em condições similares, a cultivar IAC4440 inoculada com a estirpe M209 de *Burkholderia* sp, aumentou em 54% a produção de grãos, enquanto na cultivar IR42 o resultado foi menos expressivo (Guimarães et al., 2002). Em condições axênicas, James et al. (2002) observaram que com a adição de malato de sódio, como fonte de carbono ao meio de cultivo, as cultivares IR42 e IR72 mostraram atividade da nitrogenase, avaliada através da atividade de redução de acetileno (ARA) e aumento na biomassa seca acumulada em relação ao controle não-inoculado. No entanto, somente a cultivar IR42 mostrou aumento (30%) no conteúdo de N, incorporando quantidade significativa de ¹⁵N₂.

A disponibilidade de nitrogênio no solo para a planta é outro fator que influencia a FBN. Diversos autores têm demonstrado que a aplicação de uma dose de N sub-ótima para a máxima produção, tem proporcionado os maiores ganhos em termos de FBN em plantas de arroz (Sabino, 2003; Guimarães, 2006). Recentemente, Guimarães (2006) observou que a cultivar IR42 pode obter um aumento de 48% na produção de grãos quando foi inoculada com bactérias diazotróficas e recebeu uma adubação de 50 kgN.ha⁻¹.

Através da técnica do NMP (número mais provável), diversos pesquisadores já constataram que o número de bactérias diazotróficas presentes nas plantas de arroz é muito maior nas raízes, quando comparado ao caule e folhas, sendo que no período de florescimento este número atinge valores máximos (Baldani, 1984; Boddey, 1995, Baldani, 1996; Guimarães, 2001; Rodrigues, 2006, Sabino, 2003). Oliveira (1992) observou que em plantas de arroz o maior número de diazotróficos é observado na base do colmo durante o período de florescimento da planta. Estas variações, nas populações de bactérias diazotróficas, são acompanhadas por variações na atividade da enzima nitrogenase avaliada através da atividade de redução de acetileno (ARA) (Boddey, 1995).

Apesar de ser possível isolar um grande número de bactérias dos tecidos de arroz, poucas, em torno de 10%, são diazotróficas, o que dificulta o isolamento e a determinação da bactéria responsável pela FBN (James et al., 2000). Rodrigues et al. (2006) observaram que 76% dos isolados obtidos em um experimento realizado com as cultivares de arroz IR42 e IAC4440, pertenciam ao gênero *Burkholderia*, enquanto o gênero *Herbaspirillum* foi representado por apenas 18% dos isolados, tendo a cultivar IR42 apresentado o maior número de isolados (cerca de 61% do total). O restante dos isolados foi posteriormente identificado como pertencentes ao gênero *Sphingomonas* (Videira et al., 2004).

Knauth et al. (2005), demonstraram pela primeira vez, perfis de mRNA dos genes para nitrogenase em cultivares de arroz. Os autores observaram que os perfis baseados no DNA e no RNA diferiram entre si, sugerindo que há presença do diazotróficos não necessariamente coincide com transcritos ativos de genes *nif*. Os autores também perceberam que os diazotróficos ativos não estavam relacionados a estirpes cultiváveis, e que há uma diferença entre as variedades de arroz na comunidade de genes *nif* expressos.

2.7 Metabolismo de Nitrogênio e Fixação Biológica de Nitrogênio

Em leguminosas, a sacarose formada por meio da fotossíntese é a principal fonte de energia para o nódulo, e metabolizada enzimaticamente no citoplasma vegetal a descarboxilados que irão suprir a demanda energética dos bacteróides ativos na FBN. Outros compostos reduzidos de carbono estão em abundância nos nódulos, e é provável que ocorra a utilização de mais de um composto, bem como variações qualitativas no fornecimento de compostos energéticos, de acordo com o desenvolvimento do nódulo e a espécie vegetal. A energia dos compostos descarboxilados é utilizada na forma de poder redutor e ATP para catalisar a redução de N₂ à amônia pela enzima nitrogenase. A amônia produzida é liberada pelo bacteróide por difusão simples e é assimilada pela enzima glutamina sintetase (GS) no citoplasma da célula infectada, convertendo a amônia em glutamina. Em seguida ocorre a ação da enzima GOGAT, que converte a glutamina em glutamato. A enzima GOGAT apresenta atividade bastante elevada nos nódulos, garantindo uma concentração muito baixa de amônia no citoplasma da célula infectada e o conseqüente efluxo da amônia presente nos bacteróides. O glutamato contendo o nitrogênio derivado da FBN é usado na síntese de compostos aminados que serão utilizados para suprir outros tecidos da planta. A molécula usada no transporte de nitrogênio apresenta variação entre diferentes espécies de leguminosas. Em geral, leguminosas de clima temperado exportam amidas, enquanto leguminosas de clima tropical exportam ureídeos. A forma de assimilação do nitrogênio biologicamente fixado nas relações associativas com bactérias diazotróficas, envolvendo gramíneas, não é conhecida.

Estudos de balanço de nitrogênio utilizando ^{15}N comprovaram a contribuição de diferentes espécies de bactérias diazotróficas (destacando-se *Azospirillum* spp.; *Herbaspirillum* spp. e *Glucanacetobacter diazotrophicus*) em lavouras como arroz, milho, sorgo, trigo e cana-de-açúcar, entre outras, a forma como ocorre a transferência do nitrogênio fixado não foi determinada (Reis et al., 2006). Além disso, a maioria desses organismos apresenta outras formas de promoção do crescimento vegetal, como a produção de fitormônios, resistência a estresses, produção de sideróforos e antibiose, entre outras (Gray e Smith, 2005). Soma-se a isso a inexistência de uma estrutura especializada, semelhante aos nódulos, dificultando o estudo dessas associações, e a determinação da real contribuição de cada mecanismo na melhoria da nutrição das plantas inoculadas (Reis et al, 2006).

Alguns trabalhos relacionam aspectos fisiológicos do metabolismo de N de plantas não-leguminosas e associação com bactérias diazotróficas, entretanto, poucos avanços têm sido obtidos. Em 1987, Ferreira e colaboradores, trabalhando em um sistema monoaxênico, observaram que as plantas de trigo inoculadas com estirpes mutantes de *Azospirillum brasilense*, deficientes na atividade da enzima nitrato redutase, apresentaram atividade desta enzima na parte aérea maior do que as plantas inoculadas com a estirpe original (Ferreira et al, 1987). Os autores sugeriram que este comportamento pode ter sido devido a uma maior translocação do nitrato para a parte aérea, nas plantas inoculadas com as mutantes e ao contrário, uma maior redução de nitrato 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. Em variedades de cana-de-açúcar descritas como tendo alta contribuição da FBN, Nogueira (2001) sugeriu que existe uma correlação entre a atividade da enzima glutamina sintetase e a atividade de redução de acetileno. Posteriormente, Olivares et al. (2002) em experimento com cana em condições monoaxênicas, verificou que durante a fase inicial do estabelecimento endofítico das bactérias *Herbaspirillum seropedicae* e *Glucanoacetobacter diazotrophicus*, houve aumento na atividade da H^+ -ATPase, em relação ao controle não-inoculado, que estava relacionado com o aumento na absorção de nutrientes e mudanças na fisiologia das plantas inoculadas. Ribaud et al. (2006), observaram que em plântulas de milho a inoculação com a estirpe Z152 de *H. seropedicae* afetou o desenvolvimento da planta, o conteúdo de nitrogênio, bem como a atividade das enzimas de assimilação de amônio, GS e GOGAT, indicando que a inoculação desta bactéria tem efeito significativo no metabolismo de nitrogênio de plântulas de milho.

Em geral, estudos sobre fisiologia das bactérias são realizados em cultura pura. Pouco se sabe sobre os efeitos *in situ* e como outros microrganismos afetam a assimilação destas moléculas. Mesmo nas associações com leguminosas, que apresentam nódulos, muito ainda precisa ser respondido. Nas plantas não-leguminosas a ausência de uma estrutura específica dificulta a análise, uma vez que as bactérias estão espalhadas por todo o tecido vegetal. Algumas técnicas, além da tradicional atividade de redução de acetileno (ARA) e da diluição isotópica do ^{15}N , vêm sendo empregadas, tais como o uso de soros contra a nitrogenase, buscando localizar a enzima nos cortes de tecido vegetal, ou genes repórter ligados a reguladores da nitrogenase, para localizar formas ativas da enzima (Reis e Teixeira, 2005).

Como discutido por James et al (2000) várias questões ainda permanecem, pois, a) apesar da nitrogenase ser algumas vezes expressa, ela está ativa? b) a transferência do nitrogênio fixado, ocorre diretamente ou somente após a morte e mineralização das bactérias? c) há carbono suficiente nas plantas para ser transferido para as bactérias ou algumas vezes elas podem representar um considerável dreno de energia? d) em uma planta de soja nodulada há aproximadamente 10^{14} bacteróides/planta, em plantas de arroz, observa-se em torno de 10^6 endofíticos diazotróficos/g de tecido. Seria este número suficiente para realizar uma fixação eficiente? e) e caso este número possa ser aumentado, como fazê-lo sem elicitar uma resposta de defesa no hospedeiro?

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivares de Arroz

Foram utilizadas duas cultivares de arroz inundado, IAC4440 e IR42, contrastantes quanto ao potencial de fixação biológica de nitrogênio, avaliadas através da técnica de diluição isotópica de ^{15}N (Oliveira, 1994; Campos et al., 2003):

IR42 – Alto potencial para Fixação Biológica de Nitrogênio.

IAC4440 – Baixo potencial para Fixação Biológica de Nitrogênio.

3.2 Caracterização das Bactérias Diazotróficas Utilizadas

Em todos os tratamentos foram utilizadas quatro estirpes de bactérias diazotróficas:

- BR 11417 (ZAE94) – estirpe pertencente à espécie *Herbaspirillum seropedicae*, foi isolada de raízes desinfestadas de plantas de arroz (Baldani et al., 1986; 1992).
- BR 11340 (M130) – estirpe pertencente ao gênero *Burkholderia*, foi isolada de raízes lavadas de arroz (Oliveira, 1992; Baldani, 1996).
- BR 11507 (M2) – estirpe pertencente à espécie *Herbaspirillum seropedicae*, é um mutante natural, não fixador de N_2 (Baldani et al., 1996), por isto foi utilizada como controle negativo para a fixação biológica de nitrogênio.
- BR 11002 (Cd) – estirpe pertencente à espécie *Azospirillum brasilense*. As espécies do gênero *Azospirillum* são as bactérias associativas de plantas mais estudadas (Klopper, 2003). Utilizada como controle positivo para a fixação biológica de N_2 .

3.3 Tratamentos de Inoculação com Bactérias Diazotróficas

No presente estudo, as bactérias diazotróficas foram inoculadas nas cultivares de arroz de forma isolada ou conjunta:

- estirpe M130
- estirpe ZAE94
- mistura de M130 e ZAE94;
- mistura de M130 e M2;
- mistura de ZAE94 e M2;
- mistura de M130, ZAE94 e M2;
- estirpe M2
- estirpe Cd
- controle (meio de cultura estéril /não-inoculado).

3.4 Caracterização *in vitro* das Estirpes de Bactérias Diazotróficas

As bactérias diazotróficas, descritas no item 3.2, foram avaliadas, quanto à produção do hormônio auxina, bem como o potencial de fixação biológica de nitrogênio, avaliada através da atividade de redução de acetileno.

3.4.1 Produção de auxina

A produção de ácido 3-indol acético (AIA) das estirpes foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Sarwar e Kremer (1995). As estirpes bacterianas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultivo líquido (sem extrato de levedura, biotina e azul de bromotimol) contendo 0,1% de KNO₃ e colocadas em câmara de incubação por 16 h a 30° C sob agitação de 200 rpm. Para as estirpes de *H. seropedicae* e *Azospirillum brasilense* foi utilizado o meio JNFb e para *Burkholderia* spp, o meio JMV (Döbereiner et al., 1995). Após este período de cultivo, as densidades óticas (DO) das culturas bacterianas foram ajustadas (D.O.=0,5) e 2 ml da suspensão de células foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 100 ml, contendo 28 ml de meio de cultivo JNFb ou JMV acrescido de 1 ml de solução de triptofano concentrado (3 mg.ml⁻¹) filtrado em milipore (0,2 µm), obtendo-se assim uma concentração final de 100 µg.ml⁻¹ de triptofano em cada frasco. Os frascos Erlenmeyer foram mantidos no escuro, devido a fotossensibilidade da molécula de auxina, em câmara de incubação a 30° C sob agitação de 100 rpm. Foram utilizados três repetições para cada tratamento bacteriano. Como testemunha foi utilizado o meio de cultivo JNFb ou JMV acrescido de triptofano estéril. Uma alíquota de 150 µl do sobrenadante da cultura foi dispensada em poços de microplacas de poliestireno (96 poços com capacidade de 300 µl cada). Em seguida foi adicionado 100 µl do reagente de Salkowski (1 ml de FeCl₃.6H₂O 0,5 M em 50 ml de HClO₄ 35 %). Após 30 minutos a temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 492 nm. Para a determinação da concentração de AIA foi utilizada uma curva padrão previamente preparada com concentrações crescentes de AIA (25, 50, 100, 175, 250, 300 µM).

Após a quantificação da auxina, 10 ml das culturas bacterianas foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C e ressuspendidas em água estéril (10 ml) para determinar a concentração de proteína (Lowry et al., 1951). As amostras foram diluídas 5 vezes em água estéril (0,1 mL da cultura em 0,4 ml de água) e colocadas em tubos de ensaio cobertos com papel alumínio. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de NaOH 1 M e os tubos foram colocados por 5 minutos em banho-maria a 100°C para promover a lise celular e a desnaturação das proteínas. Após o resfriamento, foram adicionados 2,5 ml do reagente de Lowry (98 ml da solução de 50 g de Na₂CO₃ em 1L de água destilada + 1 ml da solução de 10 g de CuSO₄.5 H₂O em 1 litro de água destilada + 1 ml da solução de 20 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 1 litro de água destilada). Após a homogeneização, os tubos foram incubados no escuro por 10 minutos. Após este período, 0,5 ml do regente de Folin-Ciocalteu (Sigma F-9252) 1 M, foi adicionado aos tubos que foram imediatamente agitados e incubados no escuro por 30 minutos. Após a incubação, a absorbância foi analisada no espectrofotômetro a 750 nm. A concentração de proteína foi estimada por uma curva padrão feita com concentrações crescentes de proteína Albumina do Soro Bovino (BSA) (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150 µg/ml).

3.4.2 Atividade de redução de acetileno

A atividade da nitrogenase foi avaliada pela técnica de redução de acetileno (ARA), como descrito por Reis (2002). As culturas bacterianas foram crescidas em meio de cultivo (sem extrato de levedura, biotina e azul de bromotimol) contendo 0,1% de KNO₃ e colocadas em câmara de incubação por 16 h a 30° C sob agitação de 200 rpm. Em seguida, frascos com volume de 10 ml contendo 5 ml de meio semi-sólido (sem biotina, sem azul de bromotimol e sem fonte de nitrogênio) foram inoculados com 50 µl da cultura (com densidade ótica ajustada para 0,5) e incubados a 30°C. Foram utilizadas três repetições por tratamento e o controle não inoculado. Após este período, os frascos foram vedados usando-se uma rolha de

borracha perfurável (Suba Seal) e 1 ml de acetileno foi introduzido com auxílio de uma seringa, resultando em uma atmosfera de incubação com 20% (1 ml em 5 ml) de acetileno necessária para saturar a enzima nitrogenase e se obter a máxima ARA. Os frascos foram incubados a 30° C por 1 h. Posteriormente, 0.5 ml da atmosfera dos frascos foi retirado com auxílio da seringa e injetado no cromatógrafo de gás Perkin Elmer equipado com um detector de ionização de chama modelo F11 para determinar a concentração de etileno na amostra. O resultado foi obtido através de um integrador digital PE Nelson modelo 1022.

Após a determinação da ARA, 0,5 ml de NaOH 10 M foi introduzido nos frascos (com 5 ml de cultura bacteriana), em seguida, os frascos foram homogeneizados em um agitador e colocados em banho-maria a 100^oC, durante 5 minutos. Após o resfriamento, 0.25 mL da amostra bacteriana foi diluída em 0.25 ml do meio não inoculado (processado conforme descrito acima) em tubos de ensaio cobertos com papel alumínio para a quantificação de proteína conforme Lowry *et al.* (1951).

3.5 Promoção de Crescimento de Plântulas de Arroz por Bactérias Diazotróficas

3.5.1 Condições axênicas

Para avaliação do efeito da inoculação de bactérias diazotróficas no crescimento de plântulas de arroz, foram realizados dois experimentos em condições axênicas. Os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio com capacidade para 120 ml, contendo 60 ml de solução de Hoagland e Arnon (1950), sem nitrogênio, acrescido de 6 ml/l de agar. Nitrogênio, na forma de NH₄NO₃ foi aplicado na concentração de 25mg/l (correspondendo a uma dose de 50 kgN.ha⁻¹), em metade dos tubos contendo a solução de Hoagland. Os tubos foram tampados com rolhas de algodão e esterilizados em autoclave. As sementes superficialmente desinfestadas e pré-germinadas (Döbereiner *et al.*, 1995) das cultivares IR42 e IAC4440 foram plantadas na superfície da solução de Hoagland agarizada solidificada (já acrescido dos diferentes tratamentos), em capela com ventilação forçada, e os tubos foram mantidos em câmara de crescimento até o final do experimento (30 dias).

O primeiro experimento consistiu na aplicação de concentrações conhecidas e crescentes de ácido indol acético (AIA) a solução de Hoagland, de modo a avaliar o efeito de compostos indólicos no crescimento das plântulas de arroz, utilizando este como comparação ao efeito promovido pela inoculação das estirpes de bactérias no segundo experimento. A solução estéril de AIA (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 µM) foi aplicada à solução de Hoagland após a esterilização e antes da solidificação do agar (40 a 45°C). Foram utilizadas seis repetições, em um delineamento inteiramente casualizado em um arranjo fatorial com duas cultivares, duas doses de nitrogênio e sete doses de ácido indol acético.

O segundo experimento consistiu na inoculação de estirpes de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* (ZAE94, M2), *Burkholderia* (M130) e *Azospirillum* (Cd), a solução de Hoagland. As estirpes foram crescidas em meio Dygs modificado (Döbereiner *et al.*, 1995) por 18h a 30°C. Foram adicionados 2 ml de cada cultura bacteriana (com as densidades óticas previamente ajustadas) a solução de Hoagland estéril, antes da solidificação do agar (40 a 45°C). Nos tratamentos de inoculação com mais de uma estirpe foram utilizados 1 ml de cada cultura bacteriana. No tratamento controle foi utilizado meio Dygs estéril. Foram utilizados todos os nove tratamentos de inoculação descritos no item 3.3. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em um arranjo fatorial com duas cultivares de arroz, nove tratamentos de inoculação, duas doses de nitrogênio e quatro repetições.

3.5.2 Condições não-axênicas

Um experimento em copos plásticos, com capacidade para 700 g, contendo 500 g de areia foi realizado com as cultivares IR42 e IAC4440, inoculadas ou não com a suspensão dos tratamentos bacterianos descritos no item 3.3. As sementes das duas cultivares foram inoculadas com as bactérias diazotróficas, utilizando-se inoculante turfoso como veículo. Foram plantadas duas plantas por copo, deixando-se uma após o desbaste. Cada copo foi adubado com 1 ml de uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, contendo 12,5 g N/l, correspondendo assim a uma dose de 50 Kg N.ha⁻¹, e recebeu semanalmente, uma suplementação mineral através da aplicação de solução de Hoagland sem nitrogênio. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com quatro repetições, em um arranjo fatorial com duas cultivares de arroz e nove tratamentos de inoculação.

A coleta foi realizada aos 50 dias após o plantio.

O acúmulo de biomassa fresca foi obtido por pesagem da parte aérea e raiz, logo após a coleta. Já o acúmulo de massa seca, foi obtido após secagem em estufa de circulação forçada a 60°C por 48h.

Para a análise das raízes foi utilizado o Sistema Integrado para Análises de Raízes e Cobertura de Solos - SIARCS[®] desenvolvido pela EMBRAPA – CNPDIA (pedido de patente protocolado junto ao INPI sob o número 004276). Para a captura das imagens das raízes lavadas foi realizada a separação e preparação das raízes para a digitalização. As raízes das plantas foram guardadas em sacos plásticos, mantendo-se as mesmas umedecidas e em geladeira, sendo utilizadas para as análises de área e volume através do programa SIARCS. As raízes foram lavadas espalhadas sobre um “scanner” de mesa, sem sobreposição. A partir das imagens digitalizadas foi determinado o comprimento total e a área ocupada pelas raízes.

Terminada estas quantificações, as raízes foram secas em estufas e a biomassa seca radicular e o conteúdo de nitrogênio foram avaliados.

3.6 Produção de Grãos por Cultivares de Arroz Inoculadas por Bactérias Diazotróficas

Para avaliar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas na produção das cultivares de arroz, foi realizado um experimento em vasos com capacidade para 4 kg utilizando-se os primeiros 20 cm do horizonte A de um Planossolo Série Ecologia.

A adubação foi realizada em função da análise de solo (Tabela 2) e todos os vasos receberam uma dose de nitrogênio correspondente a 50 kg N ha⁻¹.

Tabela 2: Análise química da amostra de solo utilizado para o plantio de arroz.

pH em água (solo)	Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K
	-----cmol/dm ³ -----				----mg/dm ³ ----	
5,8	0,2	1,5	0,9	0,6	6	27

As sementes das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 foram inoculadas com as bactérias diazotróficas, utilizando-se inoculantes turfosos contendo os tratamentos bacterianos descritos no item 2.1. Foram plantadas quatro sementes em cada vaso, deixando-se três plantas após o desbaste. Vinte dias após o plantio, uma lâmina de água de aproximadamente dois cm foi adicionada e mantida durante todo o experimento.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, em um arranjo fatorial com duas cultivares de arroz e nove bactérias.

A coleta foi realizada na fase de maturação de cada cultivar, quando os grãos apresentaram-se maduros. Foram avaliados a produção total e o acúmulo de nitrogênio nos grãos com e sem casca (Tedesco, 1983). Duzentos miligramas 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 H₂O₂ 30%, 1,5 ml de H₂SO₄ concentrado e 0,7 g da mistura catalisadora (100 g de Na₂SO₄, 10 g de CuSO₄.5H₂O e 1 g 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 H₂SO₄ padronizado, para a determinação do teor de nitrogênio (%N) acumulado na parte aérea da planta. O acúmulo total de nitrogênio foi obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio pela biomassa seca da parte aérea.

3.7 Desenvolvimento de Cultivares de Arroz Inoculadas com Bactérias Diazotróficas

Para avaliar o efeito da inoculação das bactérias diazotróficas ao longo do ciclo das cultivares de arroz foi realizado um segundo experimento em vasos com solo, com as mesmas condições do experimento para avaliação da produção (Item 3.6).

Em função da inconsistência observada nos resultados obtidos para inoculação com a mistura de estirpes de bactérias diazotróficas nos experimentos anteriores e da própria viabilidade de realização das análises, neste experimento, não foram utilizados os tratamentos bacterianos que constavam com a mistura de bactérias. De modo que as sementes das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 foram inoculadas com as bactérias diazotróficas, utilizando inoculantes turfosos, contendo as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94 e M2), *Burkholderia* spp. (M130) e *Azospirillum brasilense* (Cd). O tratamento controle foi obtido pela peletização das sementes com turfa umedecida com meio Dygs estéril (Döbereiner et al., 1995).

Foram plantadas quatro sementes em cada vaso, deixando-se três plantas após o desbaste, vinte dias após o plantio, e uma lâmina de água de aproximadamente 2 cm foi adicionada e mantida durante todo o experimento.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, em um arranjo fatorial com duas cultivares de arroz, cinco bactérias e três épocas de coleta.

A primeira coleta realizada foi no período vegetativo (50 dias). E as demais coletas (florescimento e maturação) foram realizadas em função do ciclo de cada cultivar. De cada vaso, contendo três plantas, uma planta foi cortada, separando-se raiz, colmo e folha, que foram identificados, enrolados em papel alumínio e congelados em nitrogênio líquido, sendo posteriormente transferidos para o superfreezer (-70°C), onde permaneceram guardados até serem realizadas todas as análises de atividade da enzima glutamina sintetase. Uma segunda planta foi retirada para análise do acúmulo da massa fresca e seca, bem como posterior análise de acúmulo de nitrogênio, nas raízes, colmos e folhas das plantas. A terceira e última planta, também foi cortada em raiz, colmo e folha, e destas partes foram retiradas amostras de 1 g (com exceção das folhas onde se retirou 0,5 g), que foram acondicionadas em potes de vidros contendo etanol 80%, que foram guardados em geladeira para a análise de compostos nitrogenados. O material restante desta terceira planta, foi reunido, em função dos tratamentos, de modo a se obter uma amostra composta, para a realização da contagem de bactérias pelo método do número mais provável.

3.7.1 Contagem de bactérias diazotróficas

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 JNFb (*H. seropedicae* e *A. brasilense*) e JMV (*Burkholderia* spp) 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 (Döbereiner et al., 1995).

3.7.2 Acúmulo de massa fresca e seca

A biomassa fresca foi avaliada por pesagem, logo após a coleta das plantas. A biomassa seca foi obtida após secagem em estufa de circulação forçada a 60°C por 48h.

3.7.3 Acúmulo de nitrogênio

O total de nitrogênio acumulado na parte aérea das plantas, foi determinado conforme 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 H₂O₂ 30%, 1,5 ml de H₂SO₄ concentrado e 0,7 g da mistura catalisadora (100 g de Na₂SO₄, 10 g de CuSO₄.5H₂O e 1 g 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 H₂SO₄ padronizado, para a determinação do teor de nitrogênio (%N) acumulado na parte aérea da planta. O acúmulo total de nitrogênio (N-total) foi obtido pela multiplicação do teor percentual pela biomassa seca da parte aérea.

3.7.4 Frações solúveis

Para avaliar as frações solúveis presentes nos tecidos vegetais foi realizada uma extração alcoólica no material vegetal fresco, segundo metodologia descrita por Fernandes (1983). Amostras de 1 g de raiz, colmo ou folhas das plantas, 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 alcoólica, foi adicionado ao funil, agitando-se suavemente, deixando-se em repouso por 40 minutos, até a completa separação da fase polar e apolar. A fase apolar 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, aminoácidos (N-amino) livres e carboidratos solúveis.

O teor de nitrato foi determinado segundo Cataldo et al. (1975). Uma alíquota de 0,1 ml do extrato alcoólico (raiz, colmo ou folha) foi colocada em tubo de ensaio, ao 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.

O teor de aminoácidos livres (N-amino) presentes na raiz, colmo ou folha foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Yemm & Cocking (1955). Uma alíquota de 1 ml do extrato alcoólico 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 H₂O 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.

O teor de açúcares solúveis presentes na raiz, colmo ou folha das plantas foi feito segundo Yemm e Wills (1954). Em tubos pirex, foram pipetados 5 ml do reagente de antrona (0,4 g de antrona em 200 ml de H₂SO₄, 5:2) e adicionados 1 ml do extrato alcoólico, 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.

3.7.5 Atividade da enzima nitrato redutase

A atividade da enzima Redutase do Nitrato foi determinada “in vivo” através da metodologia descrita por Jarwoski (1971) adaptado por Faria (1992), nas raízes e folhas das plantas. Em uma seringa descartável de 10 ml, foram colocados 0,5 g do material vegetal, adicionando-se a seguir uma solução de incubação (KNO₃ 50 mM em Tampão Tris 0,05 M) a pH 7,5. Tampando a ponta da seringa e puxando o êmbolo gerou-se um vácuo para que a solução infiltrasse no tecido e fosse retirado o ar dissolvido na solução. Foram realizados 5 vácuos em cada amostra, que foram deixadas 1 hora no escuro, em temperatura ambiente. Em seguida, uma alíquota de 1ml foi adicionada em tubo de ensaio contendo 1 ml de Sulfanilamida (1% em HCl 3N) e 1 ml de solução de N-naftil-etileno-di-amino (0,02%). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 542 nanômetros e a determinação foi baseada em uma curva de calibração padrão feita com soluções de nitrito de concentrações conhecidas.

3.7.6 Produção e teor de nitrogênio nos grãos

Foram avaliados a produção total e o acúmulo de nitrogênio nos grãos com e sem casca (Tedesco, 1983). Duzentos miligramas 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 H₂O₂ 30%, 1,5 ml de H₂SO₄ concentrado e 0,7 g da mistura catalisadora (100 g de Na₂SO₄, 10 g de CuSO₄.5H₂O e 1 g 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 H₂SO₄ padronizado, para a determinação do teor de nitrogênio (%N) acumulado na parte aérea da planta. O acúmulo total de nitrogênio foi obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio pela biomassa seca da parte aérea.

3.8 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa SISVAR (DEX/UFLA), aplicando-se o teste de diferença mínima significativa (LSD) com nível de significância de 0,05 na separação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização *in vitro* das Estirpes de Bactérias Diazotróficas

A atividade de redução de acetileno (ARA) permite avaliar o potencial das bactérias em reduzir o nitrogênio atmosférico, uma vez que a simples presença de película característica no meio semi-sólido não é garantia do potencial de FBN das estirpes, como observado por Stoltzfus et al. (1997) e Sala et al. (2005). A estirpe M2, uma mutante natural não fixadora de nitrogênio (Baldani et al., 1996), não apresentou ARA nas condições testadas, confirmando sua incapacidade de fixar N₂ (Tabela 3). A estirpe Cd de *Azospirillum brasilense* apresentou a maior ARA, em comparação com as demais estirpes. O primeiro ponto de análise foi feito às 48h, quando as culturas apresentavam película característica de fixação na parte superior do meio, entretanto, para a estirpe Cd, nas condições testadas, o pico de fixação provavelmente ocorreu antes do tempo da amostragem (48 h), uma vez que com a segunda amostragem (72 h) já se observou uma redução acentuada na ARA.

Tabela 3: Atividade de redução de acetileno (ARA), por estirpes do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em condições de cultivo em meio semi-sólido com 48 e 72 h. de crescimento.

Bactéria	48h	72h
	-----?mol etileno.mg de proteína ⁻¹ .h ⁻¹ -----	
M130	20,2	37,2
ZAE94	54,8	42,4
M2	n.d.	n.d.
Cd	304,2	201

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense* - nd.: não detectável nas condições testadas .

Dados médios de três repetições

Rodrigues et al (2006) analisando isolados de *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, observaram uma variação no período de ocorrência da ARA máxima entre os dois gêneros. Para *Herbaspirillum* a ARA máxima tendeu a ocorrer aos dois dias após a inoculação, enquanto que para *Burkholderia* somente após seis dias. A capacidade de redução foi similar, obtendo-se valores máximos de ARA próximos a 30 ?mol etileno.ml⁻¹.h⁻¹ para estes dois gêneros.

Nas condições testadas, todos os tratamentos bacterianos demonstraram capacidade de produzir auxina (Tabela 4). A estirpe Cd de *Azospirillum brasilense* apresentou a maior produção de AIA a partir de 48 h de cultivo, no entanto nas primeiras 24 h a estirpe M2, estirpe não fixadora de *Herbaspirillum seropedicae*, apresentou a maior concentração de AIA. Para as estirpes M130 e ZAE94, praticamente não foram observadas alterações nas concentrações de AIA em função do tempo, tendo a estirpe M130 de *Burkholderia brasilensis* apresentado as menores concentrações.

Tabela 4: Produção de ácido 3-indol acético (AIA) por estirpes do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em condições de cultivo em meio líquido suplementado com triptofano, em três diferentes tempos.

Bactérias	24h	48h	72h
	-----µg AIA.mg de proteína ⁻¹ -----		
M130	8,1	8,8	9,8
ZAE94	26,9	22,8	23,0
M2	48,2	28,2	29,9
Cd	34,1	85,3	80,5

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp; Cd – *A. brasilense*.

Dados médios de três repetições e expressos em micrograma de ácido indol acético por miligrama de proteína.

Reis Jr. et al. (2004) observaram que todos os isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp foram capazes de produzir AIA. A maior produção de compostos indólicos por estirpes de *Azospirillum*, em comparação à bactérias do gênero *Herbaspirillum*, também foi observada por Radwan et al. (2002), onde na presença de triptofano, a estirpe Cd de *Azospirillum brasilense* foi capaz de produzir 378,7 µM de AIA, enquanto isolados de *Herbaspirillum seropedicae* produziram concentrações de AIA que variaram de 27,7 µM até 128,8 µM de AIA. Esta elevada produção de compostos indólicos pode afetar o desenvolvimento das plantas. Radwan et al (2004), observaram em condições axênicas, uma redução no comprimento de raízes e colmos de plântulas de milho e arroz, principalmente nas plantas inoculadas com a estirpe Cd, na presença de triptofano.

4.2 Promoção de Crescimento de Plântulas de Arroz por Bactérias Diazotróficas

4.2.1 Condições axênicas

A adição de ácido indol acético (AIA) ao meio de cultivo, reduziu o acúmulo de massa fresca das plântulas de arroz em condições axênicas, tanto da cultivar IR42 quanto da IAC4440. Tendo a adição de 300 µM de AIA, reduzido em até 80% a massa da parte aérea e em até 30% da massa das raízes (Tabela 5). Efeito diferente do observado por Radwan et al. (2004) com plântulas de trigo e arroz, onde a adição de AIA afetou principalmente o crescimento das raízes e colmos, porém pouco influenciou no acúmulo de massa fresca das plântulas.

Tabela 5: Biomassa fresca da parte aérea e raízes das cultivares de arroz IR42 e IAC4440, cultivadas em condições axênicas, em meio de cultivo acrescido de diferentes doses de ácido indol acético (AIA).

Variedade	AIA (μM)	Parte aérea		Raiz	
		-----mg.planta ⁻¹ -----			
IR42	0	73	a	58	a
	100	45	b	40	b
	200	33	bc	48	ab
	300	15	c	40	b
IAC4440	0	76	a	48	a
	100	21	b	26	b
	200	21	b	29	b
	300	13	b	36	b
CV (%)		41,66		24,60	

Valores seguidos da mesma letra minúscula dentro de cada coluna, para cada cultivar, não diferem segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

Dados médios de 4 repetições e expressos em miligramas de massa fresca por planta.

Quando bactérias diazotróficas foram inoculadas ao meio de cultivo, o acúmulo de massa fresca das duas cultivares foi modificado (Tabela 6).

Quando o nitrogênio não foi aplicado, em comparação ao controle não-inoculado, todos os tratamentos inoculados propiciaram uma redução significativa no acúmulo de biomassa da parte aérea e raízes da cultivar IR42. No entanto, nas plantas da cultivar IAC4440, sob a mesma condição, a inoculação com a estirpe Cd, bem como a inoculação de ZAE94+M2, propiciaram acúmulos superiores ao controle não inoculado, tanto na raiz quanto na parte aérea. Diferenças entre genótipos na resposta à inoculação também foram observadas por Sala et al. (2005). Os autores observaram em plântulas de trigo que no genótipo ITD-19 todos os isolados testados aumentaram significativamente o comprimento da raiz principal enquanto no genótipo IAC-24, apenas um isolado promoveu aumento e outros dois causaram redução significativa. Entretanto em ambos genótipos, não foram observadas diferenças no acúmulo de biomassa seca da parte aérea.

Tabela 6: Biomassa fresca da parte aérea e raízes das cultivares de arroz IR42 e IAC4440, com ou sem adubação nitrogenada e inoculadas com bactérias do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em condições axênicas (trinta dias após o plantio).

Bactéria	IR42						IAC4440					
	-----mg N.ml ⁻¹ -----											
	0			25			0			25		
PARTE AÉREA												
-----mg.planta ⁻¹ -----												
M130	31	c	B	130	a	A	64	b	B	206	a	A
ZAE94	37	bc	B	80	abc	A	44	b	B	110	cd	A
M130+ZAE94	40	bc	A	49	d	A	47	b	B	85	d	A
M130+M2	24	c	B	62	cd	A	48	b	B	134	bc	A
ZAE94+M2	69	b	A	86	bc	A	101	a	B	157	b	A
M130+ZAE94+M2	37	bc	A	72	bcd	A	63	b	A	83	d	A
M2	51	bc	B	107	ab	A	53	b	B	136	bc	A
Cd	52	bc	A	80	bcd	A	102	a	A	111	cd	A
Controle	116	a	A	90	bc	A	30	b	A	41	e	A
CV (%)	31,74											
RAIZ												
-----mg.planta ⁻¹ -----												
M130	33	b	B	66	a	A	66	b	B	148	a	A
ZAE94	31	b	A	42	b	A	41	c	B	68	cd	A
M130+ZAE94	44	ab	A	35	b	A	51	bc	A	47	de	A
M130+M2	33	b	A	35	b	A	56	bc	A	77	bc	A
ZAE94+M2	42	ab	A	55	ab	A	97	a	A	96	b	A
M130+ZAE94+M2	40	ab	A	38	b	A	55	bc	A	43	e	A
M2	48	ab	A	47	ab	A	39	c	A	74	bc	A
Cd	52	ab	A	57	ab	A	99	a	A	59	cde	B
Controle	62	a	A	55	ab	A	42	c	A	51	de	A
CV (%)	29,39											

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

Valores seguidos da mesma letra minúscula dentro de cada coluna, e valores seguidos da mesma letra maiúscula em cada linha, dentro de cada cultivar, não diferem segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

Dados médios de quatro repetições e expressos em miligramas de massa fresca por planta.

De uma maneira geral, a aplicação de nitrogênio incrementou a biomassa acumulada, principalmente na parte aérea, demonstrando a necessidade de uma suplementação nitrogenada, uma vez que as plantas dos tratamentos sem nitrogênio, mesmo as inoculadas, apresentaram sintomas de deficiência de N aos 30 dias após o plantio. A aplicação de uma dose de nitrogênio correspondente a 50 kgN.ha⁻¹, tem demonstrado ser a que permite a melhor resposta de plantas de arroz à inoculação com bactérias diazotróficas (Sabino, 2003; Guimarães, 2006).

Uma vez que a disponibilidade de nitrogênio afeta o processo de FBN, foi observado que para um mesmo tratamento de inoculação, a aplicação de N gerou uma variação no acúmulo de biomassa, principalmente na parte aérea. Como por exemplo, a inoculação com a estirpe M130, nas plantas da cultivar IAC4440 inoculadas com esta estirpe, a aplicação de nitrogênio resultou em um aumento significativo de 220% e 124% no acúmulo de biomassa da parte aérea e raízes, respectivamente.

A massa radicular das plântulas da cultivar IR42 na presença de nitrogênio, não foi influenciada significativamente pela inoculação das bactérias diazotróficas, porém, alguns tratamentos de inoculação apresentaram uma tendência à redução similar à observada com a aplicação de AIA ao meio de cultivo (Tabela 5). Na cultivar IAC4440 o aumento foi inverso ocorrendo aumentos significativos com a inoculação. Radwan et al. (2004) observaram que quando triptofano foi adicionado ao meio de cultivo à inoculação de bactérias diazotróficas reduziu o comprimento das raízes e colmo de plântulas de trigo e arroz em condições axênicas, sendo esta redução similar a observada à aplicação de AIA. No entanto, biomassa das raízes ou da parte aérea, praticamente não foi afetada.

Nas duas cultivares, os maiores acúmulos significativos de biomassa, tanto nas raízes quanto na parte aérea foram observados com a inoculação da estirpe M130 em conjunto com a aplicação de N. Trabalhando com bactérias previamente isoladas de trigo, Roesch et al. (2005) observaram um aumento no comprimento e na massa seca das raízes, bem como no conteúdo de nitrogênio das raízes e da parte aérea, similar ao do controle nitrogenado. Como observado por Bashan e Levanony (1990), o nível de nitrogênio aplicado bem como a cultivar utilizada, são dois fatores que contribuem para a complexidade da resposta de produção das plantas, sendo que os maiores aumentos de produção foram obtidos com aplicação de N em níveis subótimos para a máxima produção. Como todas as estirpes testadas, foram capazes de produzir AIA em meio de cultivo (Tabela 4) e, com exceção da estirpe M2, reduzir acetileno (Tabela 3), é provável que parte dos efeitos observados seja devido à produção de fitormônios, e não somente a FBN, atuando em um sistema aditivo como já observado por outros autores (Sala et al., 2005; Radwan et al., 2004, Batista et al., 2002).

4.2.2 Condições não-axênicas

Em função dos resultados obtidos no experimento em condições axênicas (Tabela 6) e também dos resultados obtidos por outros autores (Sabino, 2003; Guimarães, 2006), neste experimento e nos posteriores, todas as plantas, de todos os tratamentos foram suplementadas com nitrogênio, sendo aplicada uma dose correspondente a 50 kgN.ha⁻¹.

De um modo geral a cultivar IAC4440 não teve a biomassa influenciada pela inoculação com as bactérias dizotróficas, exceto na massa fresca da parte aérea, onde a inoculação isolada da estirpe M130 ou a inoculação conjunta desta com a estirpe ZAE94(M130+ZAE94) reduziu o acúmulo em 44% (Tabela 7).

Na cultivar IR42, os maiores acúmulos de biomassa fresca e seca, da parte aérea e das raízes, foram observados com a inoculação da estirpe ZAE94, embora estes não tenham diferindo significativamente do controle não-inoculado. Diferindo do observado no experimento em condições axênicas, a inoculação da estirpe M130 reduziu a biomassa da cultivar IR42 (Tabela 7).

Embora sem diferir do tratamento controle, na cultivar IR42 o maior acúmulo de N em termos percentuais foi observado pela inoculação da estirpe Cd e o maior acúmulo total de nitrogênio foi observado nas plantas inoculadas com a estirpe ZAE94 (Tabela 8). Do mesmo modo, na cultivar IAC4440 houve diferenças quanto ao acúmulo de N na forma percentual e total. O maior acúmulo percentual foi observado no tratamento controle e o maior acúmulo total no tratamento com a estirpe M130, porém, nos dois casos, a inoculação conjunta de M130 e ZAE94 reduziu significativamente o acúmulo de N. Como observado por Sabino (2003), a inoculação afeta o acúmulo de N percentual e total das plantas de modo diferenciado (Tabela 7). Recentemente, Sala et al. (2005) observaram que não havia diferenças entre os tratamentos de inoculação, no acúmulo de massa seca de trigo, embora o genótipo ITD-19 tenha apresentado um aumento significativo no acúmulo de nitrogênio na parte aérea.

Tabela 7: Biomassa fresca e seca da parte aérea e raízes das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 inoculadas com bactérias do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em experimento em copos com areia.

PARTE AÉREA								
Bactéria	Fresca				Seca			
	IR42		IAC4440		IR42		IAC4440	
-----g.planta ⁻¹ -----								
M130	1,4	c	1,4	cd	0,37	b	0,60	a
ZAE94	2,9	a	2,4	a	0,59	a	0,51	a
M130+ZAE94	1,6	c	1,2	d	0,47	ab	0,49	a
M130+M2	2,1	bc	2,1	ab	0,40	b	0,55	a
ZAE94+M2	1,8	bc	1,6	bcd	0,48	ab	0,51	a
M130+ZAE94+M2	2,2	abc	2,2	ab	0,47	ab	0,46	a
M2	2,2	abc	1,8	bcd	0,45	ab	0,46	a
Cd	2,1	bc	1,8	abc	0,41	ab	0,52	a
Controle	2,6	ab	2,1	ab	0,52	ab	0,58	a
CV (%)	20,29				21,68			
RAIZ								
Bactéria	Fresca				Seca			
	IR42		IAC4440		IR42		IAC4440	
-----g.planta ⁻¹ -----								
M130	1,4	cd	2,0	a	0,11	b	0,17	a
ZAE94	2,4	a	1,8	a	0,16	a	0,15	a
M130+ZAE94	2,1	ab	1,7	a	0,14	ab	0,13	a
M130+M2	1,6	bcd	1,9	a	0,12	ab	0,15	a
ZAE94+M2	2,2	ab	2,1	a	0,15	ab	0,15	a
M130+ZAE94+M2	1,8	bcd	2,1	a	0,14	ab	0,14	a
M2	1,2	d	1,8	a	0,15	ab	0,15	a
Cd	1,8	abc	2,0	a	0,13	ab	0,15	a
Controle	2,1	ab	2,1	a	0,13	ab	0,16	a
CV (%)	18,70				20,31			

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

Valores em cada coluna, seguidos da mesma letra minúscula, não diferem segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

Dados médios de 4 repetições.

Tabela 8: Teor de nitrogênio percentual (%) e acúmulo total de nitrogênio (g.planta⁻¹) na parte aérea das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 inoculadas com bactérias do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em experimento em copos com areia.

Bactéria	Nitrogênio							
	IR42				IAC4440			
	-----%-----				-----g.planta ⁻¹ -----			
M130	1,1	b	1,7	ab	0,40	b	1,12	a
ZAE94	1,5	ab	1,3	ab	0,93	a	0,58	bc
M130+ZAE94	1,8	ab	1,0	b	0,82	ab	0,46	c
M130+M2	1,6	ab	1,4	ab	0,61	ab	0,80	abc
ZAE94+M2	1,0	b	1,2	ab	0,50	ab	0,58	bc
M130+ZAE94+M2	1,3	ab	1,6	ab	0,66	ab	0,72	abc
M2	1,4	ab	1,4	ab	0,59	ab	0,64	abc
Cd	1,9	a	1,3	ab	0,78	ab	0,73	abc
Controle	1,7	ab	1,8	a	0,91	a	1,03	ab
CV (%)	31,89				42,40			

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

Valores em cada coluna, seguidos da mesma letra minúscula, não diferem segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

Dados médios de 4 repetições

Na cultivar IR42 não foram observadas diferenças significativas em função da inoculação na área e no comprimento radicular das plantas, embora todos os tratamentos inoculados tenham apresentado valores superiores ao controle, atingindo aumentos de até 62% (área) e 77% (comprimento), quando as plantas foram inoculadas com M130+ZAE94 (Tabela 9). Ao contrário, na cultivar IAC4440, a inoculação tendeu a reduzir o desenvolvimento radicular, sendo observadas reduções significativas, de até 45%, no comprimento das raízes, com a inoculação das estirpes de *Herbaspirillum*. Esta redução não pode ser relacionada à capacidade de FBN da bactéria, pois foi observada nas plantas inoculadas com a estirpe ZAE94, tanto quanto nas inoculadas com a estirpe não-fixadora, M2.

Em um experimento com plantas de cana-de-açúcar em vasos com areia e vermiculita, Canuto et al. (2003) não observaram diferenças significativas entre 44 estirpes de bactérias diazotróficas de diferentes gêneros (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp.) e o controle não-inoculado no acúmulo de massa seca da raiz e parte aérea, bem como no volume radicular. No entanto, em um experimento posterior nas mesmas condições utilizando as estirpes que apresentaram um maior acúmulo de massa seca total, os autores observaram variações, incluindo efeitos negativos, no desenvolvimento das plantas.

Tabela 9: Área e comprimento radicular das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 inoculadas com bactérias do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em experimento em copos com areia.

Bactéria	Área				Comprimento			
	IR42		IAC4440		IR42		IAC4440	
	-----cm ² -----				-----m-----			
M130	105,2	a	102,9	a	20,4	a	20,0	ab
ZAE94	95,8	a	77,2	a	17,8	a	14,8	b
M130+ZAE94	110,3	a	95,5	a	21,4	a	20,0	ab
M130+M2	68,8	a	106,1	a	13,8	a	18,5	ab
ZAE94+M2	90,9	a	89,9	a	17,6	a	18,5	ab
M130+ZAE94+M2	93,7	a	90,8	a	18,6	a	19,5	ab
M2	75,7	a	84,3	a	13,9	a	16,3	b
Cd	84,9	a	112,6	a	16,0	a	21,7	ab
Controle	68,2	a	108,8	a	12,1	a	26,7	a
CV (%)	27,44				33,37			

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

Valores em cada coluna, seguidos da mesma letra minúscula, e valores na mesma linha seguidos da mesma letra maiúscula, dentro de cada parâmetro, não diferem segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

Dados médios de 4 repetições.

4.3 Produção de Grãos de Cultivares de Arroz Inoculadas com Bactérias Diazotróficas

Apesar de todas as variações observadas durante os experimentos em meio de cultivo e areia (tabelas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), a produção de grãos das duas cultivares não foi afetada pela inoculação das bactérias diazotróficas (Tabela 10). Estes resultados estão de acordo com os obtidos nos experimentos em casa de vegetação conduzidos por Baldani et al. (2000), onde a inoculação das estirpes M130, M209 (*Burkholderia* spp.) e ZAE94 (*H. seropedicae*) em plantas de arroz, não aumentou a produção de grãos, embora diferenças entre 11% a 20% no acúmulo de massa seca na parte aérea tenham sido observadas. Segundo os autores a contribuição da FBN por estas bactérias foi inferior a 5%. No entanto, Guimarães (2006), observou que a cultivar IR42, quando inoculada com ZAE94 e com M130, juntamente com uma adubação de 50 KgN.ha⁻¹, teve um aumento de 48% na produção de grãos, em relação ao controle não-inoculado e sem adubação, enquanto que a cultivar IAC4440, não teve sua produção de grãos alterada pela inoculação. Como discutido por Bashan e Levanony (1990), a inoculação das plantas com bactérias diazotróficas, em especial *Azospirillum*, pode resultar em mudanças significativas em vários parâmetros de crescimento das plantas que podem afetar ou não à sua produção. Trabalhando com arroz, Peng et al. (2002) observaram aumentos na produção de grãos das plantas inoculadas com rizóbio, que segundo os autores, estavam mais relacionadas a estímulos no crescimento através de mecanismos que aumentaram a taxa fotossintética do que a FBN.

O acúmulo de nitrogênio nos grãos foi avaliado de duas formas: grãos com casca e grãos previamente descascados (Tabela 11). Quando os grãos foram avaliados com casca, a cultivar IR42 não apresentou diferenças significativas no acúmulo de nitrogênio, tanto no

percentual quanto no total, em função da inoculação. No entanto, quando a casca foi retirada, todos os tratamentos inoculados apresentaram um maior acúmulo de N, percentual e total, sendo observado aumentos significativos de 16% e 22% no N% quando as plantas foram inoculadas com M130+ZAE94 e com M130+M2, respectivamente.

Tabela 10: Biomassa seca e produção de grãos das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 inoculadas com bactérias do gênero *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em experimento em vasos com solo (3 plantas.vaso⁻¹).

Bactéria	Biomassa seca				Produção			
	IR42		IAC4440		IR42		IAC4440	
	-----g.vaso ⁻¹ -----							
M130	19,9	a	22,1	a	17,6	a	17,6	a
ZAE94	20,7	a	22,3	a	17,6	a	16,0	a
M130+ZAE94	19,1	a	21,8	a	16,5	a	15,9	a
M130+M2	20,1	a	21,4	a	15,5	a	16,9	a
ZAE94+M2	19,6	a	19,3	a	15,2	a	15,1	a
M130+ZAE94+M2	19,7	a	21,3	a	16,2	a	15,1	a
M2	19,7	a	23,4	a	16,5	a	16,4	a
Cd	19,4	a	22,0	a	16,4	a	16,7	a
Controle	19,2	a	22,6	a	16,7	a	16,1	a
Média	19,7	A	21,8	A	16,5	A	16,2	A
CV (%)	11,2				10,7			

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

Valores em cada coluna seguidos da mesma letra minúscula, e valores na mesma linha seguidos da mesma letra maiúscula, dentro de cada parâmetro, não diferem segundo o teste LSD a 5% de probabilidade. Dados médios de 4 repetições

Diferindo da cultivar IR42, na cultivar IAC4440, diferenças significativas só foram observadas quando os grãos foram avaliados com casca. Onde foi observado um aumento de 11% no N% dos grãos das plantas desta cultivar do tratamento de inoculação triplo (ZAE94+M130+M2), embora este não tenha diferido estatisticamente do controle não-inoculado.

Dados contraditórios entre ganhos de produção e/ou ganho em acúmulo de nitrogênio nos grãos são freqüentemente observados. Trabalhando com trigo, Rodrigues et al. (2000) observaram que não houve efeito da inoculação sobre a produção de grãos, embora o teor de nitrogênio tenha aumentado significativamente nos tratamentos com bactéria e sem adição de nitrogênio. No entanto, trabalhado com plantas de trigo, cevada e aveia, Dalla Santa et al. (2004) não observaram diferenças em função da inoculação no conteúdo de N-total dos grãos para as três culturas, embora diferenças na produção de grãos tenham sido observadas. Na cultivar de arroz de sequeiro Guarani, Guimarães et al. (2003) não verificaram ganhos em termos de acúmulo de nitrogênio, porém em condições de casa de vegetação observaram aumentos de 19% com a estirpe M130 e de até 25% com a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. Em condições de campo, a estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* aumentado em 50% a produção de grãos, porém sem variações no acúmulo de nitrogênio. A cultivar IR42,

apresentou em casa de vegetação, aumento de 20% no conteúdo total de nitrogênio de seus grãos, embora variações na produção não tenham sido observadas em função da inoculação (Ferreira et al, 2003).

Tabela 11: Teor de nitrogênio percentual (N%) e acúmulo total de nitrogênio (N-total) dos grãos das cultivares de arroz IR42 e IAC440 em experimento de vasos com solo.

Variedade	Bactéria	Grãos com casca		Grãos sem casca	
		%	g.vaso ⁻¹	%	g.vaso ⁻¹
IR42	M130	0,91	a 16,0	A 1,04	bc 18,2
	ZAE94	0,87	a 15,3	A 1,04	bc 18,3
	M130+ZAE94	0,90	a 15,0	A 1,04	bc 17,2
	M130+M2	0,97	a 14,8	a 1,14	ab 17,7
	ZAE94+M2	0,93	a 14,1	a 1,20	a 18,2
	M130+ZAE94+M2	0,90	a 14,6	a 1,08	abc 17,5
	M2	0,87	a 14,2	a 1,03	bc 17,1
	Cd	0,95	a 15,4	a 1,01	bc 16,6
	Controle	0,94	a 15,6	a 0,99	c 16,5
IAC4440	M130	0,84	b 14,8	a 1,02	a 17,9
	ZAE94	0,91	ab 14,6	a 1,04	a 16,7
	M130+ZAE94	0,90	ab 14,3	a 0,99	a 15,7
	M130+M2	0,91	ab 15,2	a 1,06	a 17,9
	ZAE94+M2	0,92	ab 14,0	a 1,04	a 16,0
	M130+ZAE94+M2	0,98	a 14,9	a 1,09	a 16,4
	M2	0,94	ab 15,4	a 1,07	a 17,5
	Cd	0,83	b 13,7	a 1,01	a 16,7
	Controle	0,88	ab 14,2	a 1,07	a 17,2
CV (%)		9,5	10,4	9,7	10,8

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

Valores em cada coluna, seguidos da mesma letra minúscula, não diferem segundo o teste LSD a 5% de probabilidade. Média de 4 repetições

De acordo com Bashan e Levanony (1990), o principal problema dos experimentos em casa de vegetação e campo são as respostas inconsistentes da planta à inoculação, apresentando estes, uma baixa repetibilidade. Uma das variáveis que contribui para a complexidade das respostas à inoculação é a interação do genótipo da planta e a estirpe inoculada (Sala et al., 2005). Comparando as três condições aqui testadas (tubos, areia e solo), observa-se uma grande variabilidade na contribuição das estirpes no desenvolvimento das plantas. A resposta foi bastante variável, dependendo da cultivar e do ambiente, fato este frequentemente observado em plantas de arroz e outras plantas não-leguminosas (Oliveira et al., 2002; Canuto et al., 2003; Weber et al., 2003; Sala et al., 2005, Baldani et al., 2000).

4.4 Desenvolvimento de Cultivares de Arroz Inoculadas com Bactérias Diazotróficas

4.4.1 Contagem de bactérias diazotróficas

A avaliação da presença das bactérias diazotróficas foi realizada no período vegetativo, de florescimento e de enchimento de grãos em amostras compostas de raízes, colmos e folhas das plantas, pelo método do número mais provável (NMP) (Döbereiner et al., 1995).

Os dados obtidos sugerem a ocorrência de algum erro metodológico (Tabela 12), uma vez que a população de bactérias diazotróficas presente nas plantas de arroz, está abaixo das encontradas em experimento anteriores (Rodrigues et al., 2006, Ferreira, 2004; Guimarães, 2001; Sabino, 2003; Baldani, 1996). A exata determinação do (s) fator (es) que pode (m) ter limitado o crescimento bacteriano é difícil, pois pequenas alterações no meio de cultivo, pH e/ou temperatura, dentre outras, podem alterar o crescimento bacteriano. Um fato que deve ser destacado foi o forte ressecamento ocorrido nos tecidos vegetais, principalmente nas folhas, durante o processamento do material para análise dos compostos nitrogenados, uma vez que o NMP foi determinado no material que restou desta análise. Com o objetivo de resolver este problema, nas coletas subsequentes, o material permaneceu envolto em papel toalha umedecido, sendo colocado dentro de sacos plástico, de modo a reduzir a perda de água.

Tabela 12: Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas obtidas a partir do meio de cultivo JMV (M130 e controle) e do meio de cultivo JNFb (ZAE94, M2, Cd e controle), nas cultivares de arroz IR42 e IAC4440 durante o período vegetativo (50 dias).

Variedade	Bactéria	RAIZ		COLMO		FOLHA	
		JNFb	JMV	JNFb	JMV	JNFb	JMV
IR42	ZAE94	5,18	N.A.	4,60	N.A.	n.d.	N.A.
	M130	N.A.	4,95	N.A.	4,60	N.A.	n.d.
	M2	4,95	N.A.	4,60	N.A.	4,98	N.A.
	Cd	4,60	N.A.	5,65	N.A.	4,95	N.A.
	Controle	5,40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IAC4440	ZAE94	5,65	N.A.	4,85	N.A.	n.d.	N.A.
	M130	N.A.	n.d.	N.A.	n.d.	N.D.	n.d.
	M2	4,95	N.A.	4,40	N.A.	n.d.	N.A.
	Cd	5,65	N.A.	5,65	N.A.	4,95	N.A.
	Controle	5,65	4,60	5,18	n.d.	n.d.	n.d.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas; JNFb – meio de cultura semi-seletivo para *H. seropedicae*; JMV - meio de cultura semi-seletivo para *B. brasilensis*.

N.A. Número de células não avaliado; n.d. – número de células não detectadas nas condições testadas

Análise realizada em uma amostra composta oriunda de 4 repetições. Valores expressos em números de células bacterianas por grama de massa fresca.

O erro metodológico que afetou a contagem de bactérias diazotróficas no período vegetativo (Tabela 12), não ocorreu nas contagens realizadas no período de florescimento (Tabela 13) e na coleta final, durante a maturação dos grãos (Tabela 14). O que indica que as

modificações adotadas durante o processamento das amostras foram adequadas, para garantir a viabilidade das células, mesmo em situações em que é necessário um período maior para o processamento das amostras.

Tabela 13: Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas obtidas a partir do meio de cultivo JMV (M130 e controle) e do meio de cultivo JNFb (ZAE94, M2, Cd e controle), nas cultivares de arroz IR42 e IAC4440 durante o período de florescimento.

Variedade	Bactéria	RAIZ		COLMO		FOLHA	
		JNFb	JMV	JNFb	JMV	JNFb	JMV
IR42	ZAE94	4,48	N.A.	6,15	N.A.	3,60	N.A.
	M130	N.A.	5,18	N.A.	4,40	N.A.	3,60
	M2	5,20	N.A.	5,40	N.A.	n.d.	N.A.
	Cd	4,98	N.A.	4,18	N.A.	n.d.	N.A.
	Controle	4,65	4,40	6,04	5,40	4,65	n.d.
IAC4440	ZAE94	5,40	N.A.	5,65	N.A.	3,95	N.A.
	M130	N.A.	4,98	N.A.	3,95	N.A.	3,60
	M2	4,98	N.A.	5,40	N.A.	3,60	N.A.
	Cd	5,40	N.A.	5,40	N.A.	n.d.	N.A.
	Controle	4,98	4,65	4,65	3,95	n.d.	n.d.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas; JNFb – meio de cultura semi-seletivo para *H. seropedicae*; JMV - meio de cultura semi-seletivo para *B. brasilensis*.

N.D. Número de células não determinado; n.d. – número de células não detectadas nas condições testadas. Análise realizada em uma amostra composta oriunda de 4 repetições. Valores expressos em números de células bacterianas por grama de massa fresca.

Com exceção da última coleta (Tabela 14), nas folhas a população de bactérias diazotróficas foi muito baixa, e em muitos casos inferiores aos níveis mínimos de detecção pela técnica do NMP.

A presença de bactérias diazotróficas no tratamento controle avaliada tanto no meio JMV (semi específico para *B. brasilensis*) quanto no JNFb (semi-específico para *H. seropedicae*), foi similar a observada nos tratamentos inoculados nas duas cultivares e nas três épocas avaliadas (Tabela 12, Tabela 13 e Tabela 14). Estes resultados sugerem que em sistemas com solo, o tratamento controle não-inoculado apresenta bactérias diazotróficas naturais que atingem populações semelhantes às observadas nos tratamentos inoculados (Baldani, 1996). No entanto, a presença das bactérias diazotróficas associadas à planta não significa, necessariamente, que a mesma seja beneficiada por quantidades significativas de N, proveniente da FBN (Boddey, 1995).

Uma flutuação na população de bactérias diazotróficas ocorreu ao longo do ciclo das duas cultivares de arroz, fato este já observado por trabalhos anteriores (Rodrigues et al., 2006, Ferreira, 2004, Guimarães, 2001, Baldani, 1996). Como observado por Campos et al. (1999), não foram observadas diferenças entre a população de bactérias diazotróficas presentes na cv. IR42 e na cv. IAC4440, embora a cv. IAC4440 seja considerada como um controle negativo, em termos de FBN (Oliveira, 1994). Rodrigues et al. (2006) observaram que diferenças populacionais entre estas duas cultivares foram influenciadas pelo solo de cultivo. Como sugerido por Reis Jr. et al. (2000) diferenças na população de bactérias diazotróficas associadas a planta, não são capazes de explicar diferenças no metabolismo de nitrogênio, uma vez que estes autores não verificaram diferenças entre partes da planta ou época de coleta, na população nativa de *Herbaspirillum* e *Glucanacetobacter diazotrophicus*, em quatro genótipos de cana-de-açúcar com diferentes potenciais de FBN.

Tabela 14: Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas obtidas a partir do meio de cultivo JMV (M130 e controle) e do meio de cultivo JNFb (ZAE94, M2, Cd e controle), nas cultivares de arroz IR42 e IAC4440 durante o período de maturação dos grãos.

Variedade	Bactéria	RAIZ		COLMO		FOLHA	
		JNFb	JMV	JNFb	JMV	JNFb	JMV
IR42	ZAE94	4,65	N.A.	6,15	N.A.	5,40	N.A.
	M130	N.A.	4,65	N.A.	5,18	N.A.	4,98
	M2	5,18	N.A.	5,65	N.A.	5,40	N.A.
	Cd	4,98	N.A.	5,40	N.A.	n.d.	N.A.
	Controle	5,65	5,40	n.d.	6,15	n.d.	6,04
IAC4440	ZAE94	4,98	N.A.	6,15	N.A.	6,04	N.A.
	M130	N.A.	5,40	N.A.	4,65	N.A.	4,40
	M2	4,65	N.A.	3,60	N.A.	3,95	N.A.
	Cd	4,98	N.A.	6,04	N.A.	3,95	N.A.
	Controle	3,60	3,95	6,04	5,40	3,95	4,40

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas; JNFb – meio de cultura semi-seletivo para *H. seropedicae*; JMV - meio de cultura semi-seletivo para *B. brasilensis*.

N.D. Número de células não determinado; n.d. – número de células não detectadas nas condições testadas. Análise realizada em uma amostra composta oriunda de 4 repetições. Valores expressos em números de células bacterianas por grama de massa fresca.

4.4.2 Biomassa seca e acúmulo de nitrogênio

Durante o período vegetativo, a biomassa seca das duas cultivares praticamente não foi influenciada pela inoculação das bactérias diazotróficas, exceto nas raízes da cultivar IAC4440, onde a inoculação da estirpe M130 promoveu o maior acúmulo (Tabela 15). A inoculação da estirpe M130 aumentou em 60% o acúmulo de nitrogênio nas raízes da cultivar IR42, fato este não observado na parte aérea (colmo e folhas). Na cultivar IAC4440, não foram obtidas diferenças significativas em função da inoculação, embora nas raízes aumentos máximos de até 60%, tenham sido observados com a inoculação das estirpes ZAE94, M130 e Cd (Tabela 16). Estes resultados diferem daqueles observados por Sabino (2003), onde a inoculação da estirpe ZAE94, independentemente das plantas terem sido suplementadas com nitrogênio mineral, propiciou os maiores teores de nitrogênio na parte aérea, durante o período vegetativo das plantas da cultivar IR42. A combinação da inoculação de ZAE94 em conjunto com aplicação de 50 kgN.ha⁻¹ propiciou o maior acúmulo de nitrogênio (34% de aumento em relação ao controle).

Tabela 15: Biomassa seca das raízes, dos colmos e das folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período vegetativo (50 dias).

Variedade	Bactéria	-----g.planta ⁻¹ -----			
		Raiz	Colmo	Folha	PA
IR42	ZAE94	1,39 a	0,83 a	0,46 a	1,29 a
	M130	1,57 a	0,92 a	0,47 a	1,41 a
	M2	1,35 a	0,92 a	0,47 a	1,37 a
	Cd	1,62 a	1,06 a	0,57 a	1,63 a
	Controle	1,35 a	0,91 a	0,45 a	1,36 a
IAC4440	ZAE94	1,62 a	0,90 a	0,48 a	1,38 a
	M130	1,85 a	1,09 a	0,56 a	1,65 a
	M2	1,27 a	0,95 a	0,53 a	1,48 a
	Cd	1,27 a	0,94 a	0,46 a	1,40 a
	Controle	1,37 a	0,90 a	0,49 a	1,39 a
CV (%)		19,6	18,4	25,0	20,2

Valores seguidos da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si, segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

PA- Colmo e folhas

Média de 4 repetições. Valores expressos em grama de massa fresca por planta.

Tabela 16: Teor de nitrogênio (%) nas raízes, nos colmos e nas folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período vegetativo (50 dias).

Variedade	Bactéria	-----%-----			
		Raiz	Colmo	Folha	PA
IR42	ZAE94	0,76 ab	0,68 ab	2,17 a	1,43 a
	M130	0,89 a	0,68 ab	1,97 a	1,33 a
	M2	0,59 b	0,60 b	2,25 a	1,43 a
	Cd	0,87 ab	0,76 a	2,25 a	1,51 a
	Controle	0,55 b	0,64 ab	2,04 a	1,34 a
IAC4440	ZAE94	0,81 a	0,62 a	2,07 a	1,35 a
	M130	0,79 a	0,62 a	1,88 a	1,25 a
	M2	0,57 a	0,62 a	1,86 a	1,24 a
	Cd	0,80 a	0,54 a	1,85 a	1,20 a
	Controle	0,53 a	0,65 a	1,95 a	1,30 a
CV (%)		10,5	9,87	11,2	10,8

Valores seguidos da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si, segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

Média de 4 repetições. Dentro de cada cultivar, valores seguidos da mesma letra não diferem segundo o teste LSD a 5% de probabilidade. Valores expressos em miligrama de nitrogênio por miligrama de massa seca.

Do mesmo modo que no período vegetativo, no período de florescimento, a biomassa seca praticamente não foi alterada nas duas cultivares em função da inoculação. Exceto nas raízes da cultivar IR42 inoculadas com a estirpe Cd (55%) e nas OF da cultivar IAC4440

inoculadas com a estirpe ZAE94 (35%) (Tabela 17). No entanto, diferindo do período vegetativo, a inoculação afetou o teor de nitrogênio, porém os efeitos variaram em função da cultivar e da parte analisada. De um modo geral, na cultivar IR42 a inoculação aumentou o teor de nitrogênio das plantas como um todo, porém na cultivar IAC4440 o efeito foi inverso, tendo a inoculação reduzido o teor de nitrogênio (Tabela 18). Na cultivar IR42, nos colmos e F2 não foram observadas diferenças significativas no teor de nitrogênio das plantas inoculadas em relação ao controle não inoculado. Nas demais partes (OF, FB, Folhas e PA) todas as bactérias inoculadas, incluindo a estirpe M2 (não-fixadora) promoveram o aumento no teor percentual de nitrogênio das plantas. Foram observados aumentos de 46% (OF), 50% (FB), 25% (Folhas) e 24% (PA). Estes resultados diferem dos observados por Guimarães (2006) onde a aplicação de 50 kgN.ha⁻¹ em conjunto com a inoculação das estirpes ZAE94 ou M130 reduziu o teor de nitrogênio nas plantas da cultivar IAC4440 enquanto que na cultivar IR42, não foram observadas diferenças em relação ao controle não-inoculado.

Tabela 17: Biomassa seca das raízes, dos colmos e das folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período de florescimento.

Variedade	Bactéria	Raiz	Colmo	OF	F2	FB	Folhas	PA
IR42	ZAE94	3,45 abc	3,29 a	0,45 a	0,23 a	0,19 a	0,82 a	4,11 a
	M130	3,91 ab	2,70 a	0,42 a	0,18 a	0,14 a	0,73 a	3,43 a
	M2	2,43 c	2,98 a	0,41 a	0,19 a	0,16 a	0,76 a	3,74 a
	Cd	4,23 a	3,61 a	0,48 a	0,23 a	0,19 a	0,89 a	4,5 a
	Controle	2,73 bc	2,78 a	0,37 a	0,19 a	0,15 a	0,70 a	3,48 a
IAC4440	ZAE94	2,54 a	2,90 a	0,66 a	0,17 a	0,09 a	0,92 a	3,82 a
	M130	3,23 a	2,79 a	0,60 ab	0,21 a	0,14 a	0,94 a	3,73 a
	M2	2,46 a	2,41 a	0,49 b	0,16 a	0,11 a	0,76 a	3,17 a
	Cd	2,12 a	2,81 a	0,52 ab	0,19 a	0,11 a	0,81 a	3,62 a
	Controle	2,70 a	2,62 a	0,49 b	0,15 a	0,10 a	0,73 a	3,35 a
CV (%)		27,57	23,69	23,34	27,12	34,60	31,53	24,88

Valores seguidos da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si, segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

PA – Folhas e colmo; Fb – folha localizada abaixo da panícula; F2 – primeira folha abaixo da FB; OF – demais folhas da planta.

Média de 4 repetições. Valores expressos em grama de massa fresca por planta.

Tabela 18: Teor de nitrogênio (%) presente nas raízes, nos colmos, nas folhas bandeiras (Fb), nas folhas 2 (F2), nas outras folhas (demais folhas – OF) e nas folhas (conteúdo médio das Fb, F2 e OF) e parte aérea (conteúdo médio dos colmos, Fb, F2, e OF) das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período de florescimento.

Cultivar	Bactérias	Raiz	Colmo	OF	F2	FB	Folhas	PA
-----mgN.mg de planta ⁻¹ -----								
IR42	ZAE94	0,45 a	0,43 a	0,65 ab	1,25 a	2,10 a	1,33 a	1,11 a
	M130	0,43 ab	0,43 a	0,85 a	1,41 a	2,11 a	1,46 a	1,20 a
	M2	0,39 b	0,47 a	0,74 a	1,38 a	2,27 a	1,47 a	1,22 a
	Cd	0,42 ab	0,39 a	0,74 a	1,42 a	2,08 a	1,41 a	1,16 a
	Controle	0,41 b	0,40 a	0,58 b	1,41 a	1,52 b	1,17b	0,98 b
IAC4440	ZAE94	0,47 a	0,49 a	1,16 ab	0,80 b	2,02 a	1,33 b	1,12 ab
	M130	0,47 a	0,40 a	1,06 ab	1,11 ab	2,01 a	1,39 b	1,14 ab
	M2	0,40 b	0,42 a	0,73 b	1,65 a	1,54 b	1,31 b	1,09 b
	Cd	0,42 b	0,36 a	1,40 a	0,96 ab	1,82 ab	1,40 b	1,14 ab
	Controle	0,45 ab	0,49 a	0,86 b	1,83 a	2,14 a	1,61 a	1,33 a
CV (%)		19,7	14,6	18,2	15,7	14,1	11,3	10,5

Valores seguidos da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si, segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

PA – Folhas e colmo; Fb – folha localizada abaixo da panícula; F2 – primeira folha abaixo da FB; OF – demais folhas da planta. Média de 4 repetições. Valores expressos em mg de nitrogênio por mg de massa seca.

No período de enchimento de grãos, ao contrário das demais avaliações, a biomassa seca da cultivar IR42 foi positivamente influenciada pela inoculação (Tabela 19). Todos os tratamentos inoculados, incluindo a estirpe M2 (não-fixadora) apresentaram uma biomassa seca superior ao tratamento não inoculado, embora em algumas partes (F2 e FB), estes aumentos não tenham sido estatisticamente significativos. Foram observados aumentos máximos de 60% (Colmo), 43% (OF), 36% (F2), 33% (FB), 51% (PAN), 32% (Folhas) e 45% (PA), em relação ao controle (Tabela 19). Estes resultados diferem dos observados por Guimarães (2006) onde houve uma redução no acúmulo de biomassa seca das plantas da cultivar IR42 com a inoculação da estirpe M130. Didonet et al (2000), não observaram em plantas de trigo inoculadas, variações em função da inoculação, no acúmulo de massa seca, durante a antese e a maturação fisiológica dos grãos. Corroborando os dados obtidos por Oliveira (1992) que trabalhando com 4 cultivares de arroz, não observou diferenças no acúmulo de massa seca da parte aérea em função da inoculação.

Comparando com o período de florescimento (Tabela 18), houve uma redução no teor de nitrogênio da parte aérea das plantas da cultivar IR42 (Tabela 20), de forma mais acentuada na FB, demonstrando sua importância na remobilização de nitrogênio para os grãos. No entanto, tal efeito foi influenciado pela inoculação das bactérias diazotróficas. As plantas inoculadas, incluindo as inoculadas com a estirpe M2, apresentaram uma redução teor de nitrogênio, enquanto que nas plantas do tratamento controle praticamente não foram observadas alterações (Tabela 18 e 20). No período de maturação dos grãos, não foram observadas diferenças na biomassa seca das duas cultivares, em nenhuma das partes analisadas (Tabela 21).

Tabela 19: Biomassa seca das raízes, dos colmos e das folhas da cultivar de arroz IR42 no período de enchimento de grãos..

Cultivar	Bactéria	Raiz	colmo	OF	F2	FB	Pan	Folhas	PA
-----g.planta ⁻¹ -----									
IR42	ZAE94	2,33 a	1,81 ab	0,33 a	0,19 a	0,15 a	2,73 a	0,67 a	5,21 a
	M130	2,28 a	1,81 ab	0,32 a	0,18 a	0,16 a	2,19 ab	0,66 a	4,65 ab
	M2	1,66 a	2,55 a	0,33 a	0,19 a	0,15 a	2,45 a	0,66 a	5,66 a
	Cd	2,18 a	2,17 ab	0,29 ab	0,17 a	0,14 a	2,18 ab	0,59 ab	4,93 ab
	Controle	1,74 a	1,60 b	0,23 b	0,14 a	0,12 a	1,81 b	0,50 b	3,90 b
CV (%)		30,52	26,51	16,64	18,86	22,03	18,88	16,84	18,64

Valores seguidos da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si, segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

PA – Folhas e colmo; Fb – folha localizada abaixo da panícula; F2 – primeira folha abaixo da FB; OF – demais folhas da planta, PAN- panícula.

Média de 4 repetições. Valores expressos em grama de massa fresca por planta

Tabela 20: Percentual de nitrogênio (N%) presente nas raízes, nos colmos, nas folhas bandeiras (Fb), nas folhas 2 (F2), nas outras folhas (demais folhas – OF) e nas folhas (conteúdo médio das Fb, F2 e OF) e parte aérea (conteúdo médio dos colmos, Fb, F2, e OF) da cultivar de arroz IR42 no período de enchimento de grãos.

Cultivar	Bactéria	Raiz	Colmo	OF	F2	FB	PAN	Folhas	PA
-----%-----									
IR42	ZAE94	0,52 a	0,32 a	0,72 a	1,19 a	1,58 b	1,09	1,16 a	0,95
	M130	0,48 a	0,33 a	0,56 b	1,14 a	1,62 a	0,93 ab	1,11 a	0,92
	M2	0,45 a	0,31 a	0,62 ab	1,13 a	1,75 a	1,14 a	1,16 a	0,95
	Cd	0,46 a	0,31 a	0,61 ab	1,15 a	1,71 a	0,96 ab	1,15 a	0,94
	Controle	0,49 a	0,33 a	0,61 ab	1,18 a	1,69 a	0,84 b	1,16 a	0,95
CV (%)		10,5	9,74	11,4	12,7	10,2	10,6	11,4	10,9

Valores seguidos da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si, segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

PA – Folhas e colmo; Fb – folha localizada abaixo da panícula; F2 – primeira folha abaixo da FB; OF – demais folhas da planta; PAN- panícula.

Média de 4 repetições. Valores expressos em mg de nitrogênio por mg de massa seca.

Tabela 21: Biomassa seca das raízes, dos colmos e das folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período de maturação dos grãos.

Variedade	Bactéria	Raiz	Colmo	OF	F2	FB	Folhas	PA
		-----g.planta ⁻¹ -----						
IR42	ZAE94	2,51 a	1,99 a	0,17 a	0,16 a	0,13 a	0,46 a	2,45 a
	M130	2,37 a	2,09 a	0,19 a	0,17 a	0,12 a	0,48 a	2,57 a
	M2	2,01 a	2,74 a	0,18 a	0,17 a	0,14 a	0,49 a	3,23 a
	Cd	2,73 a	2,08 a	0,17 a	0,18 a	0,14 a	0,49 a	2,57 a
	Controle	2,05 a	2,10 a	0,14 a	0,15 a	0,14 a	0,43 a	2,53 a
IAC4440	ZAE94	2,38 a	2,15 a	0,16 a	0,15 a	0,15 a	0,46 a	2,61 a
	M130	2,41 a	2,10 a	0,15 a	0,14 a	0,13 a	0,41 a	2,51 a
	M2	2,22 a	2,87 a	0,15 a	0,13 a	0,12 a	0,40 a	3,27 a
	Cd	2,17 a	2,41 a	0,17 a	0,13 a	0,13 a	0,43 a	2,84
	Controle	2,48 a	2,58 a	0,15 a	0,13 a	0,14 a	0,42 a	3,00
CV (%)		25,9	22,1	21,4	28,3	27,2	25,1	24,3

Valores seguidos da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si, segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

PA – Folhas e colmo; Fb – folha localizada abaixo da panícula; F2 – primeira folha abaixo da FB; OF – demais folhas da planta.

Média de 4 repetições. Valores expressos em grama de massa fresca por planta.

4.4.3 Frações solúveis

Nas análises dos teores de nitrato (Tabela 22), aminoácidos livres (Tabela 23) e carboidratos solúveis (tabela 24) foram observadas grandes variações entre as repetições de um mesmo tratamento, resultando em um elevado coeficiente de variação (CV%) em todas as análises.

Os teores de nitrato (Tabela 22) observados estão de acordo com os encontrados em plantas de arroz crescidas em solução nutritiva com 0,2 mM de nitrato (Rodrigues, 2005).

O acúmulo de nitrato variou em função da parte da planta analisada, encontrando-se no colmo das duas cultivares os maiores acúmulos. Nas folhas da cultivar IR42 não foram observadas diferenças significativas, os dados indicam uma tendência de maior acúmulo para as plantas inoculadas. No colmo, a estirpe Cd propiciou um aumento de 88%, enquanto na raiz, 15% de aumento, tenha sido observado com a estirpe M130. Na cultivar IAC4440 a contribuição da inoculação mostrou tendências diferentes. Nas folhas, o maior acúmulo foi observado nas plantas do tratamento sem inoculação. Nos colmos, a estirpe M130 promoveu o maior aumento (34%), enquanto nas raízes a estirpe Cd estimulou o acúmulo em 30% (Tabela 22). Rodrigues (2001) observou em plantas de arroz, um aumento no teor de nitrato proporcional ao teor de nitrogênio aplicado. Uma vez que as plantas de arroz foram cultivadas sob inundações, pouco nitrato deveria estar disponível no solo, de modo que a absorção do nitrato deve ter sido propiciada pelo sistema de alta afinidade (HATS), sendo este um sistema induzido, com elevada afinidade pelo substrato atuando em concentrações inferiores a 5mM (Siddiqi et al., 1990 citados por Rodrigues, 2005). Ou então, pelo sistema constitutivo de alta

afinidade (cHATS) garante a absorção do nitrato, mesmo em concentrações muito reduzidas (Vidmar et al., 2000).

Tabela 22: Acúmulo de nitrato nas raízes, nos colmos e nas folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período vegetativo.

Variedade	Bactéria	Raiz		Colmo		Folha	
		----- $\mu\text{mol.g massa fresca}^{-1}$ -----					
IR42	ZAE94	22,6	ab	42,3	ab	26,3	a
	M130	33,6	a	40,1	b	49,9	a
	M2	22,7	b	41,2	b	51,7	a
	Cd	27,8	b	83,7	a	39,0	a
	Controle	29,2	ab	44,5	ab	17,2	a
IAC4440	ZAE94	30,7	bc	57,6	b	58,3	ab
	M130	39,0	ab	103,0	a	56,5	ab
	M2	26,3	c	87,4	ab	60,5	ab
	Cd	41,2	a	91,4	ab	26,3	b
	Controle	31,4	abc	76,8	ab	84,5	a
CV (%)		22,4		44,6		59,7	

Valores seguidos da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si, segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

Média de 4 repetições. Valores expressos em μgrama de nitrato por g de massa fresca.

Os teores de aminoácidos livres das folhas de todas as plantas inoculadas da cultivar IR42 foram superiores aos das plantas controle (Tabela 23), estando estes resultados de acordo com os obtidos por Sabino (2003). Porém no colmo, o incremento observado pela inoculação com a estirpe Cd, pode indicar um distúrbio no metabolismo. Valores similares a estes foram observados por Borges (2004) em plantas de milho cultivada sob um excesso de nitrogênio (1300 mgN/vaso). Comportamento inverso foi observado na cultivar IAC4440 onde o tratamento controle teve o maior acúmulo de aminoácidos livres nas folhas, enquanto nas raízes e colmos não foram observadas diferenças significativas.

Os teores de açúcar solúvel são indicadores da energia prontamente disponível para o metabolismo celular (Souza, 1995). O acúmulo de açúcar solúvel nas raízes das duas cultivares não foi influenciado pela inoculação, embora no tratamento com a estirpe M130 uma tendência de aumentos de 40% (IR42) e 73% (IAC4440) possam ser observados (Tabela 24). Nas folhas, na cultivar IAC4440 o maior acúmulo foi observado no tratamento controle, seguida pelo tratamento com a estirpe M2. Na cultivar IR42 não foram observadas diferenças significativas, mesmo com o aumento de 150% observado nas plantas inoculadas com a estirpe M2 (Tabela 24). Baptista (2002) não observou variação nos teores de açúcares solúveis das folhas de plantas de arroz, em resposta à concentração de nitrogênio disponível no meio, independente da fonte ser nítrica ou amoniacal. Diferindo do observado por Souza et al.(1999) não foi possível observar uma relação negativa entre teores de açúcar e N-amino livre presente nas plantas

Corroborando com os dados obtidos por Gomes et al. (2006) em cana-de-açúcar, as variações observadas nas concentrações das frações solúveis (Tabelas 22, 23 e 24) não puderam ser relacionadas com a população de diazotróficos presentes nas diferentes partes das plantas de arroz (Tabela 12).

Tabela 23: Acúmulo de aminoácidos livres nas raízes, nos colmos e nas folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período vegetativo.

Variedade	Bactéria	Raiz	Colmo	Folha
-----mmol.g de massa fresca ⁻¹ -----				
IR42	ZAE94	16,27 ab	30,14 b	23,97 ab
	M130	22,86 a	39,05 b	40,20 ab
	M2	14,23 b	39,25 b	34,84 ab
	Cd	12,34 b	86,18 a	40,97 a
	Controle	17,82 ab	32,20 b	19,66 b
IAC4440	ZAE94	16,16 a	32,93 a	24,76 ab
	M130	16,67 a	52,65 a	30,08ab
	M2	13,93 a	50,22 a	31,42 ab
	Cd	15,86 a	43,73 a	21,07 b
	Controle	15,39 a	44,73 a	42,92 a
CV (%)		28,90	46,29	46,44

Valores seguidos da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si, segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp. *brasiliensis*; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

Média de 4 repetições. Valores expressos em milimolar de leucina por g de massa fresca.

Tabela 24: Acúmulo de açúcar solúvel nas raízes, nos colmos e nas folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período vegetativo.

Variedade	Bactéria	Raiz	Colmo	Folha
-----mg glicose.g massa fresca ⁻¹ -----				
IR42	ZAE94	4,02 a	18,76 ab	3,87 a
	M130	5,19 a	17,64 b	5,77 a
	M2	2,57 a	19,45 ab	7,61 a
	Cd	2,32 a	35,50 a	6,43 a
	Controle	3,73 a	16,07 b	3,05 a
IAC4440	ZAE94	6,94 a	15,87 a	5,03 b
	M130	7,19 a	28,91 a	7,30 b
	M2	4,95 a	21,80 a	9,99 ab
	Cd	4,90 a	21,22 a	4,78 b
	Controle	4,15 a	19,06 a	14,60 a
CV (%)		46,31	55,47	68,47

Valores seguidos da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si, segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

Média de 4 repetições. Valores exp ressos em mg glicose por g de massa fresca.

4.4.4 Atividade da enzima nitrato redutase

Apesar das plantas de arroz estarem em condições de inundação, onde ocorre uma menor disponibilidade de N, na forma nítrica, nos solos, em função da desnitrificação

(Ingrahan, 1981), a assimilação de nitrato pelas plantas ocorre de maneira significativa (Barlaan et al., 1998).

A atividade da nitrato redutase (ANR) das folhas foi superior ao observado nas raízes e colmos (Tabela 25). Confirmando que em arroz, o nitrato é preferencialmente reduzido na parte aérea das plantas (Souza et al., 2002).

Durante o período vegetativo, as duas cultivares apresentaram um padrão de ANR diferenciado em função da inoculação, tendo a cultivar IR42 respondido positivamente, enquanto a cultivar IAC4440, ou não foi influenciada ou teve a ANR reduzida (Tabela 25). Efeitos, variados, na ANR em função da inoculação são freqüentemente observados (Baldani et al., 1986, Ferreira et al., 1987; Salomone e Döbereiner, 1996; Machado et al., 1995).

Na cultivar IR42, apenas nas raízes e colmos houve respostas significativas à inoculação, embora nas folhas aumentos de até 70% tenham sido observados. Nesta cultivar, a inoculação proporcionou um grande incremento na ANR nas raízes, onde a estirpe ZAE94 estimulou a enzima em 59%. Na cultivar IAC4440, o efeito foi inverso, com todos os tratamentos inoculados apresentando ANR inferior ao controle, com reduções de até 22% na ANR das raízes das plantas. A ausência de efeito da inoculação da ANR nas folhas já havia sido previamente verificada (Machado et al., 1998; Machado et al., 1992).

Nos colmos, a inoculação da estirpe ZAE94 promoveu um aumento de 115% na ANR da cultivar IR42, enquanto que a estirpe M2 estimulou em 21% a ANR na cultivar IAC4440.

Embora a NR apresente importância fundamental na redução do nitrato, não necessariamente aumentos na sua atividade, durante o período vegetativo, corresponderão a ganhos de produção. Como observado por Hirel et al. (2001) os genótipos de milho mais produtivos foram os que apresentaram uma menor redução do nitrato no período vegetativo, pois este, foi reduzido e translocado para o grão durante a fase reprodutiva.

Tabela 25: Atividade da enzima nitrato redutase nas raízes, nos colmos e nas folhas das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 no período vegetativo.

Variedade	Bacteria	----- μmol NO ₂ ⁻ . g planta ⁻¹ -----		
		Raiz	Colmo	Folha
IR42	ZAE94	0,186 a	0,295 a	2,129 a
	M130	0,148 ab	0,218 abc	1,688 a
	M2	0,123 ab	0,258 ab	2,127 a
	Cd	0,123 b	0,174 bc	1,708 a
	Controle	0,117 b	0,137 c	1,271 a
IAC4440	ZAE94	0,184 a	0,209 ab	1,579 a
	M130	0,129 a	0,224 ab	1,502 a
	M2	0,143 a	0,264 a	1,558 a
	Cd	0,133 a	0,139 b	1,305 a
	Controle	0,165 a	0,218 ab	1,587 a
CV (%)		24,94	28,82	64,36

Valores seguidos da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si, segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas.

Média de 4 repetições. Valores expressos em micromolar de nitrito formado por g de tecido vegetal em 1 hora de reação.

4.4.5 Produção e teor de nitrogênio nos grãos

Não foram observados efeitos significativos na produção dos grãos em nenhuma das duas cultivares (Tabela 26). Embora na cultivar IR42, a inoculação com ZAE94 tenha promovido mais de 20% de aumento na produção dos grãos, este não foi significativo.

Do mesmo modo que o experimento anterior (item 4.3) todas as plantas inoculadas da cultivar IR42 apresentaram um teor percentual de nitrogênio nos grãos, avaliados sem casca, significativamente superior ao tratamento sem inoculação (Tabela 26). As estirpes ZAE94 e M130, isoladamente, propiciaram aumentos em torno de 20% no teor de nitrogênio sem ocasionar redução na produção de grãos da cultivar IR42. Na cultivar IAC4440, somente quando os grãos foram avaliados com a casca foram observados aumentos significativos, com destaque para a estirpe M130 que propiciou aumentos de 34% no teor de nitrogênio em relação ao controle não inoculado (Tabela 26).

Ferreira (2004), observou que a inoculação da estirpe ZAE94 promoveu aumentos de até 19% na produção de grãos da cultivar IAC4440.

Guimarães (2003) observou aumento no conteúdo de nitrogênio e produção de grãos de arroz, em experimento conduzido em casa de vegetação.

Em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum*, Cavallet et al. (1998), observou aumentos de 17% na produção de grãos, independentemente do manejo da adubação nitrogenada. Didonet et al. (2000), trabalhando com trigo, não obtiveram efeito da inoculação no rendimento de grãos, porém foi observado um melhor alocamento de N e biomassa para os grãos, resultando em maior massa de mil grãos e em menor quantidade de N restante na palhada das plantas na maturação fisiológica. Rodrigues et al. (2000) não observaram efeito da inoculação na produção de grãos, porém o tratamento com bactéria e sem nitrogênio aumentou significativamente o teor de N das plantas de trigo, sendo que aproximadamente 70% do N foi transportado das partes vegetativas para os grãos.

Tabela 26: Produção (g. planta⁻¹), teor de nitrogênio (%) dos grãos das cultivares de arroz IR42 e IAC4440.

Variedade	Bactéria	Produção		Nitrogênio			
				Com casca		Sem casca	
		g.planta ⁻¹		-----%-----			
IR42	ZAE94	6,06	a	1,17	a	1,00	a
	M130	5,20	a	1,14	a	1,03	a
	M2	5,86	a	1,09	ab	0,90	ab
	Cd	5,27	a	1,07	ab	0,83	b
	Controle	4,93	a	0,96	b	0,88	ab
IAC4440	ZAE94	5,51	a	1,31	a	0,93	b
	M130	6,57	a	1,30	a	1,13	a
	M2	4,32	a	1,29	a	0,99	a
	Cd	6,64	a	1,27	a	0,84	b
	Controle	5,97	a	1,20	a	0,84	b
CV (%)				13,8		11,96	12,30

Valores seguidos da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si, segundo o teste LSD a 5% de probabilidade.

ZAE94 – *H. seropedicae*; M2 – mutante natural não-fixador de *H. seropedicae*; M130 – *Burkholderia* spp.; Cd – *A. brasilense*; Controle – não-inoculado com bactérias diazotróficas

CONCLUSÕES

As cultivares de arroz IR42 e IAC4440 responderam de modo diferenciado a inoculação com as bactérias diazotróficas, estando esta relacionada ao ambiente de cultivo das plantas.

Não houve correlação entre o potencial de produção de ácido indol acético (AIA) e a atividade de redução de acetileno (ARA) das estirpes de bactérias diazotróficas testadas e a sua capacidade de promover o crescimento das cultivares de arroz IR42 e IAC4440.

A inoculação das estirpes de bactérias diazotróficas propiciou um maior teor de nitrogênio nos grãos da cultivar IR42 sem ocasionar uma redução na produtividade da cultivar.

Os parâmetros fisiológicos avaliados (atividade da enzima nitrato redutase e partição das frações solúveis: nitrato, aminoácidos livres e carboidratos solúveis) não apresentaram relação com a produção das cultivares de arroz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTH, I.; FRENZEL, P.; CONRAD, R.; Denitrification coupled to nitrification in the rhizosphere of rice. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 30, n. 4, p. 509-515, 1998.
- ASSIS, M.P. de; CARVALHO, J.G.; CURI, N.; BERTONI, J.C.; ANDRADE, W.E.B. Limitações nutricionais para a cultura do arroz em solos orgânicos sob inundação. I. Crescimento. **Cienc. Agrot.**, Lavras, v.324, n.1, p.87-95, 2000.
- BALDANI V.L.D.; ALVAREZ M.A.D.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp in the rhizosphere and in roots of field-grown wheat and sorghum. **Plant And Soil**. v. 90, n. 1-3, p. 35-46, 1986.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J.. Characterization Of '*Herbaspirillum Seropedicae*' Nov. Sp A Root Associated Nitrogen Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Estados unidos, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciência** **77 (3)**: 549-579, 2005.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**. v. 4, n. 1-2, p 37-40, 1987.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DOBEREINER, J. A 4th *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 56, n. 3, p. 365, 1984.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen-nov, sp-nov, a root-associated nitrogen-fixing bacterium.. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Internation Journal of Systematic Bacteriology**, **46 (3)**: 802-810, 1996.
- 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; OLIVARES, F.L.; DOBEREINER, J. Identification and Ecology of *H. seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Balaban, v. 13, p. 65-73, 1992.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**. v. 30, n. 5-6, p. 485-491, 2000.

BALDANI, Vera L.d. ; BALDANI, José Ivo ; OLIVARES, F.I. ; DOBEREINER, Johanna . Identification and Ecology of *H. seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, Balaban, v. 13, p. 65-73, 1992.

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

BAPTISTA, J.A. **Caracterização genética de arroz (*Oryza sativa* L.) através de marcadores moleculares RAPD e eficiência na aquisição de N.** UFRRJ:Seropédica, 2002. Tese de doutorado.

BARLAAN, E.A.; SATO, H.; ICHII, M. Nitrate reductase activities in rice genotypes in irrigated lowlands. **Crop. Sci.** **38**: 728-734, 1998. MACHADO, A.T.; SODEK, L.; DÖBEREINER, J.; REIS, V.M. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho nitroflint. **Pesq. Agrop. Brasil** **33** (6), 1998.

BASHAN, Y. Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux in intact wheat roots. **Canadian J. Bot.** **36**:419-425, 1990.

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

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E.. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**. v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Can. J. Microbiology** **36**: 591-608, 1990.

BATISTA, Q.R., SOUZA-FILHO, G.A., OLIVEIRA, M.A., OLIVARES, F.L. Efeito da composição do inóculo bacteriano sobre a promoção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar. *In: Anais da Fertbio 2002*. 2002.

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

BENNET, J.; LADHA, J.K. Introduction: Feasibility of nodulation and nitrogen fixation in rice. *In: KUSH, G.S.; BENNET, J. (eds) Nodulation and Nitrogen Fixation in Rice*. International Rice Research Institute. Manila, Philippines, p. 1-14, 1992.

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

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

BORGES, E.A. **Absorção, acúmulo e remobilização de nitrogênio em variedades de milho (*Zea mays* L.)**. UFRRJ:Seropédica, 2004. Tese de Doutorado.

Brasil, M. S. ESTUDOS DA OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM VARIEDADES DE ARROZ. SEROPÉDICA: UFRURALRJ, 2005. TESE DE DOUTORADO.

- BUCHER, C.A.; MATIAS, G.C.S.; PAIVA, D.M.; SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Absorção de nitrato por duas variedades de arroz. **Rev. Univ. Rural Ser. Ci. Vida**, **24** (1): 25-30, 2004.
- CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp nov. an N-2-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, n. 4, p. 1165-1172, 2004.
- CAMARGO, F.A.O.; GIANELLO, C.; TEDESCO, M.J.; VIDOR, C. Nitrogênio orgânico no solo. In: SANTOS, G.A.; CAMARGOS, F.A.O. (eds.) **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo: Ecossistemas Tropicais e Subtropicais**. Porto Alegre: Gênese, 1999.
- CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 74, p. 214-219, 1988.
- CAMPOS, D.V.B. **Identificação de genótipos de arroz irrigado com potencial para a fixação biológica de nitrogênio**. Seropédica:UFRRJ, 94p. 1999. Dissertação de Mestrado.
- CAMPOS, D.V.B.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIARGA, S.S. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura do arroz sob inundação. **Agronomia**, **37** (2): 41-46, 2003.
- CANUTO, E.L.; SALLES, J.F.; OLIVEIRA, A.L.M.; PERIN, L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, **37** (2): 67-72, 2003.
- 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.
- DALLA SANTA, H.S.; SOUSA, N.J.; BRAND, D.; DALLA SANTA, O.R.; PANDEY, A.; SOBOTKA, M.; PACA, J.; SOCCOL, C.R. Conidia production of *Beauveria* sp by solid-state fermentation for biocontrol of *Ilex paraguariensis* caterpillars. **Folia Microbiologica**. v. 49, n. 4, p. 418-422, 2004.
- DIDONET, A.D.; LIMA, O.S.; CANDATEN, A.A.; RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido a inoculação de *Azospirillum*. **Pesq. Agrop. Brás.** **35**(2): 401-411, 2000.
- DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (eds.). **Microbiologia do solo**. Campinas, 1992.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D. & BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas em plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.
- ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** **51**: 17-26, 2001.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO Cultivo do Arroz Irrigado no Estado do Tocantins: Introdução e Importância Econômica. In: **Sistemas de Produção**, nº3, Versão Eletrônica, Nov/2004.

Embrapa Arroz e Feijão – CNPAF. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz?AroozIrrigadoTocantins?in dex.htm>, acessado em 2/1/2006.

ENGELHARD, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. **Environmental Microbiology**. v. 2, n. 2, p. 131-141, 2000.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 6, p. 2790-2798, 2001.

FAGERIA, N.K.; SLATON, N.A.; BALIGAR, V.C. Nutrient management for improving lowland rice productivity and sustainability. **Advances in Agronomy**. v. 80, p. 63-152, 2003.

FAGERIA, N.K.; STONE, L.F. Manejo do nitrogênio. In: FAGERIA et al. (ed.) **Manejo da fertilidade do solo para o arroz irrigado**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p.51-94, 2003.

FARIA, C.R.S.M. **Atividade da nitrato redutase em folhas de *Pterodon pubescens* (Leguminosae) e *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae) crescendo em condições naturais do cerrado**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 1992.

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

FERREIRA, J.S. **Seleção e avaliação de veículos para a inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz inundado**. Dissertação de Mestrado. Seropédica, UFRRJ, 44 p., 2004.

FERREIRA, J.S.; SABINO, D.C.C.; GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Seleção de Veículos para o preparo de inoculantes com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Agro nomia**, **37**(2):06-12, 2003.

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

FORDE, B.G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**. v. 1465, n. 1-2, p. 219-235, 2000.

GILLIS, M.; VANTRANVAN, V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLENS, A.; SEGERS, P.; KERTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia vietnamiensis* sp. Nov. N₂-fixing isolates rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.176, p. 221-226, 1995.

- GOMES, A. A.; REIS, V. M. ; BALDANI, V. L. D. ; GOI, S. R. Relação entre a distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana de açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 1105-1113, 2005.
- GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular e extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling process. **Soil Biol. Biochem**, **37**: 395-412, 2005.
- GUERRERO, M.VG.; VEGA, J.M.; LOSADA, M. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. **Ann., Rev. Plant. Physiol.**, **32**: 169-204, 1981.
- GUIMARAES, S. L. ; SILVA, R. A. ; BALDANI, J. I. ; BALDANI, V. L. D. ; DOBEREINER, J. . Effects of the inoculation of endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of two rice varieties (Guarani and CNA8305) grown under field conditions. *In*: **12th International Congress on Nitrogen Fixation**, 1999, Foz do Iguacu, 1999.
- GUIMARÃES, S.L. **Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral**. Seropédica, UFRRJ, 2006. Tese de Doutorado. 88p.
- GUIMARÃES, S.L. **Seleção de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas para inoculação em três cultivares de arroz inundado**. RJ: Seropédica: UFRRJ, 2001. Dissertação de Mestrado. 52p.
- GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**. v. 37, n. 2, p. 25-30, 2003.
- HIREL B., BERTIN P., QUILLERE I., et al. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant physiology**. v. 125, n. 3, p. 1258-1270, 2001.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture growing plants without soil. **Circ. Calif. Agric. Exp. Stn.** **347**: 461-462, 1950.
- IBGE, **Indicadores IBGE: Estatística da produção Agrícola – Dezembro de 2006**. Instituto Brasileiro de Geostatística:IBGE, 2006. Disponível em www.ibge.gov.br .
- JAIN, D. K.; PATRIQUIN, D. G. Characterization of a substance produced by Azospirillum which causes branching of wheat root hairs. **Can. J. Microbiol.** **31**:206-210. 1985.
- JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; BARRAQUIO, W.L.; MATHAN, N.; LADHA, J.K. Endophytic diazotrophs associated with rice. *In*: LADHA, J.K.; REDDY, P.M (eds) **The quest for nitrogen fixation in rice**. Proceedings of a workshop, 9-12 August 1999, Los Baños Laguna, Philippines, 2000.
- JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W.L.; REDDY, P.M.; IANNETTA, P.P.M.; OLIVARES, F.L.; LADHA, J.K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions** **15 (9)**: 894-906, 2002.
- KENNEDY, I.R.; CHODHURY, A.T.M.A.; KECSKÉS, M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry** **36 (8)**: 1229-1244, 2004.

- KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.** 140:679-693. 1989.
- KHIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 157-168, 2001.
- KLOPPER, J.W.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; HALLMANN, J. Recent studies on the microbial ecology of bacterial endophytes in plants. **In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 26, Rio de Janeiro, 1997. **Resumos**. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1997. CD-ROM.
- KLOPPER, J.M. A Review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR. **In: 6th International PGPR Workshop, 5-10 October 2003, Calicut, India**. 2003.
- KNAUTH, S.; HUREK, T.; BRAR, D.; REINHOLD-HUREK, B. Influence of different *Oryza* cultivars on expression of nifH gene pools in roots of rice. **Environmental Microbiology**. v. 7, n. 11, p. 1725-1733, 2005.
- LADHA, J.K.; REDDY, P.M. Steps toward nitrogen fixation in rice. **In: LADHA, J.K.; REDDY, P.M (eds) The quest for nitrogen fixation in rice**. Proceedings of a workshop, 9-12 August 1999, Los Baños Laguna, Philippines, 2000.
- LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.T.; OLIVEIRA, I.C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G.M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 47: 569-593, 1996.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MACHADO, A. T. ; MAGALHÃES, J. R. ; MAGNAVACA, R. ; SILVA, M. R. E. . Determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio em diferentes genótipos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 4, n. 1, p. 45-47, 1992.
- MACHADO, A. T. ; SODEK, L. ; DOBEREINER, J.; REIS, V. M.; Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 961-970, 1998.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. Academic Press,. 1995. 2^a edition.
- MINFLIN, B.J.; LEA, P.J. Amino acid metabolism. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 28:299-329, 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) **Ecofisiologia de cultivos anuais: Trigo, Milho, Soja,, Arroz e Mandioca**. São Paulo: Nobel, 1999.

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

Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Londres, v. 43, p.1274- 1279, 1971.

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 et al (2002)

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

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

OLIVEIRA, A.L.M.; URGUAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**. v. 242, n. 205, p. 205-215, 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 et al., 1983),

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

PAULA, M.B. de; CARVALHO, J.G. de; SOARES, A.A.; NOGUEIRA, F.D. Avaliação da fertilidade de solo de várzea (Glei Húmico) para a cultura do arroz. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, V.25. n. 4, p. 571-577, 1990.

PENG, S.; BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; GYANESHWAR, P.; CHEN, Y. Influence of Rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. **Agronomy Journal** **94**: 925-929, 2002.

RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesq. Agrop. Bras.**, **39** (10): 987-994, 2004.

RADWAN, TEE.; MOHAMED, Z.K; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, **32**, p.39-54, 2002.

Reinhold-Hurek et al., 1993).

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; CLAEYSSSENS, M.; VANMONTAGU, M. Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp, a root-invading diazotroph. **Journal of Bacteriology**. v. 175, n. 21, p. 7056-7065, 1993.

REIS JR., F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.; URQUIARGA, S., REIS, V.M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp em diferentes condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Rev. Bras. Ci. Solo**, 28:103-113, 2004.

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

REIS, V. M. & TEIXEIRA, K. Fixação Biológica de nitrogênio – Estado da Arte. P. 151-180, 2005. In: Aquino, A. M. e Linhares (Eds.) **Processos Biológicos no Sistema solo-planta**, Embrapa Agrobiologia, Brasília-DF, Embrapa Informação tecnológica, 2005, 368p.

REIS, V. M. ; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. . Biological dinitrogen fixation in Gramineae and palm trees. **Critical Reviews In Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, n. 3, p. 227-247, 2000

REIS, V. M. ; SANTOS, P. E. L.; SALGADO, S.T.; VOGEL, J.; STOFFLES, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; MELLADO, J. C. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Oxford, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REIS, V.M.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M.S. (ed.) **Nutrição Mineral de Plantas**. SBCS, Viçosa, 2006. 154-194p.

RIBAUDO, C.M.; RONDANINI, D.P.; CURÃ, J.A. Effect of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation on maize nitrogen metabolism. **Maydica**, **51**: 481-485, 2006.

RICEWEB, www.riceweb.org/plant.htm, acessado em 28/01/2003.

RODRIGUES, F.S. **Absorção e compartimentalização do nitrogênio em plantas de arroz submetidas ao fluxo sazonal de NO₃⁻**. UFRRJ:Seropédica, 2005. Tese de Doutorado.

RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **41** (2): 275-284, 2006.

RODRIGUES, O.; DIDONET, A.D.; GOUVEIA, J.A.; SOARES, R.C. Nitrogen translocation en wheat inoculated with *Azospirillum* and fertilized with nitrogen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 35, n. 7, p. 1437-1481, Brasília, 2000.

ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.O.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural** **35** (5): 1201-1204, 2005.

- SABINO, D.C.C. **Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas.** RJ: Seropédica: UFRRJ, Dissertação de Mestrado, 2003.
- SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A.P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **R. Bras. Ciência Solo**, **29**: 345-352, 2005.
- SALOMONE, I.G.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biol. Fert. Soils** **21**: 193-196, 1996.
- SARWAR, M. & KREMER R.J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**. v. 20, n. 5, p. 282-285, 1995.
- 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 Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** , 41: 225-253, 1990.
- SOUZA, S. R.; STARK, M. L. M.; FERNANDES, M. S. **Enzimas de assimilação de nitrogênio em plantas.** Copyright, 2002.
- SOUZA, S.R. **Efeitos da aplicação foliar de nitrogênio pós-antese sobre as enzimas de assimilação do nitrogênio e acúmulo de proteína em grãos de arroz** UFRRJ:Seropédica, 1995. Tese de Doutorado.
- SPRENT, J.I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms pure and applied aspects.** London Chapman and Hall ed. p. 256, 1990.
- STOLTZFUS, J.R.; S.O. R.; MALARVITHI, P.P.; LADHA, K.K.; BRUJIN, F.J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant Soil**, **194**: 25-36, 1997.
- TEDESCO, M. J. **Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de planta por H₂O₂-H₂SO₄.** UFRGS. (Informativo Interno, 1), 1982. 23p.
- URQUIARGA, S.S; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R. Dinâmica do N no solo. *In*: FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R. O.; DÖBEREINER, J. NEVES, M.C.P.; PIMENTEL, C.; MIRANDA, R. M. (Eds.) **Anais do I Simpósio Brasileiro sobre N em Plantas.** p. 127-167, Itaguaí, 1993.
- VALVERDE A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA A.; IGUAL, J.M.. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, n. 6, p. 1979-1983, 2003.
- VANDAMME, P.; HENRY, D.; COENYE, T.; NZULA, S.; VANCANNEYT, M.; LIPUMA, J.J.; SPEERT, D.P.; GOVAN, J.R.W.; MAHENTHIRALINGAM, E. *Burkholderia anthina* sp nov and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. **Fems Immunology and Medical Microbiology**. v. 33, n. 2, p. 143-149, 2002.

- VARGAS-GARCIA, M.C.; LOPEZ, M.J.; ELORRIETA, M.A.; SUAREZ, F.; MORENO, J. Properties of polysaccharide produced by *Azotobacter vinelandii* cultured on 4-hydroxybenzoic acid. **Journal of Applied Microbiology**. v. 94, n. 3, p. 388-395, 2003.
- VICTORIA RL, MARTINELLI LA, TRIVELIN PCO, MATSUI E, FORSBERG BR, RICHEY JE. The use of stable isotopes in studies of nutrient cycling - carbon isotope composition of amazon varzea sediments. **Devol ah Biotropica**. v. 24, n 2, p. 240-249, 1992.
- VIDEIRA, S.S.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Identificação e avaliação da diversidade de novos isolados de bactérias diazotróficas em plantas de arroz (*Oryza sativa*). **Rev. Univ. Rural Ser. Ci. Vida**, **24 (2)**: 35-40, 2004.
- VIDMAR, J.J.; ZHUO, D.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. Isolation and characterization of HvNRT2.3 and HvNRT2.4, cDNAs encoding high-affinity nitrate transporters from roots of barley. **Plant Physiology**, **122**: 783-792, 2000.
- WEBER, O.B.; CORREIA, D.; ROCHA, M.W.; ALVEZ, G.C.; OLIVEIRA, E.M.; SÁ, E.G. Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação **Pesq. Agrop. Bras.** **38 (12)**: 1419-1426, 2003.
- YEMM, E. W. & COCKING, E. F. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, 80, 209-213. 1955.
- YEMM, E.W. & WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**. v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.
- ZHANG, H.; HANADA, S.; SHIEGEMATSU, T.; SHIBUYA, K.; KAMAGATA, Y.; KANAGAWA, T.; KURANE, R. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from na aquifer polluted with TCE. **Internacional Journal Systematic Evolutionary of Microbiology**. v. 50, p.743-749, 2000.

ANEXO

MEIO JMV

5 g	manitol	
6 ml	K ₂ HPO ₄	Sol.10%
18 ml	KH ₂ PO ₄	Sol.10%
2 ml	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sol.10%
1 ml	NaCl	Sol.10%
2 ml	CaCl ₂ .2H ₂ 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**	

Ajustar o pH para 5,0 com KOH e completar o volume para 1000 ml com água destilada. Adicionar 1,6g de agar por litro para meios semi-sólidos.

MEIO JNFb

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

Ajustar o pH para 5,8 com KH completar o volume para 1000ml com água destilada. Adicionar 1,9g de agar para meios semi-sólidos.

*Solução de micronutrientes para meio de cultura

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

Completar o volume para 1000 ml com água destilada.

**** Solução de vitaminas para meio e cultura**

10 mg de biotina

20 mg de pradoxol – HCL

Dissolver em banho Maria e completar o volume para 100 ml com água destilada estéril e manter solução em geladeira.

Meio de cultura Dygs

2,0 g de glicose

2,0 g de ácido málico

1,5 g de peptona bacteriológica

2,0 g de extrato de levedura

0,5 g K_2HPO_4

0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

1,5 g de ácido glutâmico

Completar o volume para 1000 ml. Ajustar o pH para as diferentes espécies:

pH 5,0 – *Burkholderia* spp.

pH 6,0 – *Herbaspirillum* spp

pH 6,8 – *Azospirillum* spp.

Solução salina para diluição de células

3,4 g KH_2PO_4

0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0,1 g NaCl

0,02 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

2 ml solução de micronutrientes

4 ml FeEDTA (solução 1,64%)

4,5 g KOH

Ajustar o pH para 6,5 com KOH e completar o volume para 1000 ml com água destilada.