

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM ARROZ E TRIGO
POR RIZÓBIOS NATIVOS SIMBIONTES DE *EYTHRINA FALCATA***

**Taís Backes
(Dissertação de Mestrado)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM ARROZ E TRIGO
POR RIZÓBIOS NATIVOS SIMBIONTES DE *EYTHRINA FALCATA***

TAÍS BACKES
Engenheira Florestal (UFSM)

Dissertação apresentada como um
dos requisitos à obtenção do Grau
de Mestre em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil
Setembro de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Backes, Taís
AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM ARROZ E
TRIGO POR RIZÓBIOS NATIVOS SIMBIONTES DE *Erythrina*
falcata / Taís Backes. -- 2016.
68 f.
Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, BR-RS,
2016.

1. rizóbios. 2. promoção de crescimento. 3. arroz.
4. trigo. I. Saccol de Sá, Enilson Luiz, orient. II.
Título.

TAÍS BACKES
Engenheira Florestal - UFSM

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM CIÊNCIA DO SOLO

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo

Faculdade de Agronomia


Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil


Aprovado em: 30.09.2016
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 29.03.2021
Por

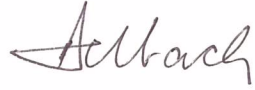

ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ
Orientador-PPG Ciência do Solo


FLÁVIO A. de O. CAMARGO
Coordenador do
Programa de Pós-Graduação
em Ciência do Solo


FLÁVIO ANASTÁCIO DE OLIVEIRA CAMARGO
Departamento de Solos/UFRGS


PATRÍCIA DORR DE QUADROS
PPG Microbiologia Agrícola e do
Ambiente/UFRGS


RAFAEL GOULART MACHADO
EMATER - Passo Fundo/RS


PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade
de Agronomia

*Para adquirir sabedoria há que ser humilde,
e depois de adquirida há que ser mais humilde ainda..."*

Samael Aun Weor

AGRADECIMENTOS

Pelo dom da vida, pois só pela vontade de Deus somos e temos tudo para que possamos desfrutar dessa graça que é viver.

Aos meus pais, Jaime e Inês, e minha irmã, Patrícia, que me proporcionaram todo amor, educação e incentivo para que eu trilhasse meu caminho da melhor forma possível, não tenho nem como expressar em palavras toda minha gratidão e amor por vocês, só cheguei até aqui pelas bases sólidas e valorosas em que fui criada.

Ao meu orientador, Enilson, que me acolheu e me deu a chance de aprender um pouco mais sobre como ser uma cientista do solo e trabalhar com microbiologia, agradeço a todos os ensinamentos e convivência.

Ao meu noivo, Lucas Bach, que todo esse tempo de mestrado esteve comigo nas horas boas e ruins e sempre fazendo com que essas horas ruins passassem logo, me ensinando que a vida é feita de amor e companheirismo.

Às companheiras de laboratório, amigas e conselheiras: Renata Bataioli, Bruna Winck, Clarissa Borges, Franciane Lemes, Franquiele Bonilha, Marcia Orantas e Vanessa Silva. Ninguém faz nada sozinho e por isso, agradeço imensamente a vocês por tudo, sempre que precisei, estavam ao lado dando força, ensinando e ajudando, em fatos, no trabalho. Obrigada pela amizade e diversão que tive com todas vocês, vou sempre levar vocês no coração. Também ao Gleidson, Marcio, Vitor Rigotti e Victor Bassani, obrigada pelos cafés e conversas.

Ao Departamento de Solos e aos professores que colaboraram para minha formação humana e intelectual, em nome da Faculdade de Agronomia e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela estrutura e recursos que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho e da realização do curso.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM ARROZ E TRIGO POR RIZÓBIOS NATIVOS SIMBIOTES DE *Erythrina falcata*¹

Autor: Taís Backes

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

RESUMO

A utilização de rizóbios como promotores de crescimento em gramíneas são estudadas em muitos trabalhos, pois estes micro-organismos apresentam capacidade de fixação biológica de nitrogênio em plantas leguminosas e possuem outros mecanismos que beneficiam plantas não-leguminosas produzindo fitormônios e aumentando a absorção de nutrientes. O Rio Grande do Sul é um estado reconhecido como produtor de arroz (*Oryza sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*) produzidas frequentemente onde também ocorrem leguminosas nativas que fazem simbiose com rizóbios, como a corticeira-da-serra (*Erythrina falcata*). Assim, uma vez que esses rizóbios fazem simbiose com *E. falcata* podem atuar como promotores de crescimento de plantas de arroz e trigo. Este trabalho teve como objetivo isolar e selecionar rizóbios nativos de *E. falcata* que possam ser inseridos em lavouras de culturas anuais. Os isolados de rizóbios foram obtidos de nódulos de *E. falcata* cultivadas em casa de vegetação inoculadas com suspensão de solo. Para realizar a autenticação e avaliar a eficiência simbiótica dos isolados, estes foram re-inoculados em *E. falcata* e observou-se a nodulação e quantificada a produção de massa seca das plantas. Os rizóbios foram caracterizados quanto à sua morfologia, capacidade de solubilização de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e produção de ácido indol-acético (AIA), com e sem adição de triptofano. Ainda, os rizóbios foram avaliados quanto ao efeito na germinação em sementes de arroz e trigo, e à promoção de crescimento em casa de vegetação. Identificaram-se os isolados pela amplificação e sequenciamento do DNA utilizando um fragmento do 16S ribossomal. Apenas os rizóbios Ef4, Ef12 e Ef13 solubilizaram fosfato tricálcico, e todos produziram AIA com adição de triptofano. Os isolados não foram eficientes na fixação de nitrogênio em *E. falcata*. Por outro lado, todos os rizóbios aceleraram a germinação de sementes de arroz, porém em trigo não houve efeito das inoculações. Os tratamentos com inoculação dos rizóbios Ef3, Ef11 e Ef13 em arroz apresentaram valores semelhantes ao tratamento com 100% de N. O rizóbio Ef13 e Ef4 estimularam o aumento no número de perfilhos em arroz. As plantas de arroz inoculadas com Ef13 foram capazes de absorver mais nitrogênio que os demais tratamentos inoculados. Com base na análise de DNA, todos os isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*.

Palavras-chave: Inoculação, rizobactérias, corticeira-da-serra.

¹ Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (59 p.) Setembro, 2016.

GROWTH PROMOTION IN RICE AND WHEAT BY SYMBIOTIC NATIVE RIZHOBIA OF *Erythrina falcata*²

Author: Taís Backes

Adviser: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

ABSTRACT

The use of rhizobia to growth promoting in grasses has been well studied in several works, because besides their role in promoting fixation of atmospheric nitrogen in leguminous plants, rhizobia may also provide several other benefits in non-leguminous plants by producing phytohormones and facilitating plant nutrients acquisition. Rio Grande do Sul state is recognized as a great rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum aestivum*) producer. These cultures are often cropped under natural grassland or forest slopes, where there was co-occurrence of native species of legumes fixing atmospheric nitrogen such as *Erythrina falcata* (Corticeira-da-serra). Then, since these native rhizobia associated with *Erythrina falcata* can act as growth promoting in rice and wheat plants, our work aimed to isolate and select native rhizobia from corticeira-da-serra, in order to selected rhizobia that are capable to promote growing in those crops. Isolates of rhizobia were obtained from nodules of Corticeira-da-serra cultivated in greenhouse conditions that were previously inoculated with soil suspension. After, in order to perform the authentication and evaluate the symbiotic efficiency of each isolate, we re-inoculated the on Corticeira-da-serra and observed if there was nodulation and determined plant production dry matter. Rhizobia were characterized regarding their morphology, ability to solubilise tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), and indole acetic acid (IAA) production with and without tryptophan. Yet, rhizobia were evaluated regarding their effects on germination of rice and wheat seeds and plant production in greenhouse conditions. We identify the isolates through amplification and DNA sequencing using 16S ribosome fragment. Only rhizobias identified as UFRGS Ef4, Ef12 and Ef13 was able to solubilize tricalcium phosphate, while all of them could produce IAA with tryptophan. Our isolates of rhizobia were not efficiency in fixing nitrogen in *E. falcata*. On the other hand, all the isolates increased seeds germination rate of rice but in wheat don't have effect on inoculation. Rice inoculated with Ef3, Ef11 and Ef13 showed similar values when compared to rice fertilized with 100% of recommended dose of nitrogen. However, our finding showed that Ef13 can stimulate the number of branch. The rice plants inoculated with UFRGS Ef13 absorbed more nitrogen when compared to the others treatments. On wheat, no differences were observed in seed germination and number of branch. Finally, based on dna analysis all the isolates in this work were identified as *Bradyrhizobium* ssp.

Keywords: Inoculation, rhyzobacteria, corticeira-da-serra.

²M. Sc. Dissertation in Soil Science. Graduate Program in Soil Science, Faculty of Agronomy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (59p.) September, 2016.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Fixação biológica de nitrogênio e rizóbios	3
2.2 Promoção de crescimento em plantas.....	5
2.3 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal.....	6
2.3.1 Produção de fitormônios.....	6
2.3.2 Solubilização de fosfato inorgânico	8
2.4 Rizóbios promotores de crescimento em gramíneas.....	8
2.5 Corticeira-da-serra.....	9
3 OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo Geral.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Obtenção dos nódulos e dos isolados bacterianos.....	13
4.2 Caracterização morfológica das colônias dos isolados.....	14
4.3 Autenticação dos isolados	15
4.4 Solubilização de fosfato tricálcico	16
4.5 Avaliação da produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético (AIA)	16
4.6 Avaliação dos rizóbios quanto á eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio em corticeira-da-serra.....	17
4.7 Efeito da inoculação dos isolados sobre a germinação de sementes de arroz e trigo	19
4.8 Avaliação da capacidade dos rizóbios na promoção de crescimento de plantas de arroz e trigo em experimento em casa de vegetação	19
4.9 Extração de DNA e amplificação da região do gene 16S rRNA	20
4.10 Análise estatística.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
5.1 Caracterização morfológica e autenticação dos isolados	22
5.2 Solubilização de fosfato tricálcico	23
5.3 Avaliação da produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético (AIA)	24

5.4 Avaliação da eficiência dos rizóbios na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de corticeira-da-serra	25
5.5 Efeito da inoculação dos isolados sobre a germinação de sementes de arroz e trigo	29
5.6 Avaliação da inoculação de rizóbios na capacidade de promoção de crescimento de plantas de arroz e trigo em casa de vegetação	31
5.7 Caracterização genética dos isolados de corticeira-da-serra	36
6 CONCLUSÕES	40
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
9 APÊNDICES	53

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1 - Morfologia colonial de rizóbios isolados de nódulos radiculares de plantas de <i>E. falcata</i> cultivadas em casa de vegetação.....	22
Tabela 2 – Índice de solubilização de fosfato (ISF) em placas com meio de cultura LMA, produção de ácido indol-acético (AIA) em meio LM, sem e com adição de triptofano por rizóbios isolados de <i>E. falcata</i>	24
Tabela 3 - Massa seca da raiz (MSR), massa seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e índice de eficiência relativa (IER) dos isolados de <i>E. falcata</i> em relação aos tratamentos controles.....	27
Tabela 4 – Relação da massa seca da parte aérea (MSPA) com massa seca de nódulos (MSN) e relação da massa seca de nódulos (MSN) com número de nódulos (NN) de plantas de <i>E. falcata</i> inoculados com isolados de <i>E. falcata</i>	29
Tabela 5 - Índice de velocidade de germinação (IVG) e do percentual total de germinação ao final de sete dias em sementes de trigo e arroz.....	30
Tabela 6 - Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), índice de eficiência relativa (IER), de plantas de arroz em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de <i>E. falcata</i>	32
Tabela 7 – Número de folhas, número de perfilhos e volume de raiz de plantas de arroz inoculadas com rizóbios isolados de <i>E. falcata</i>	33

Tabela 8 - Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), número de folhas, volume de raiz e índice de eficiência relativa (IER), de plantas de trigo em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de *E. falcata*.....35

Tabela 9 - Identificação dos isolados de rizóbios pela sequência parcial dos genes 16S rRNA obtida com o programa BLAST.....39

RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1** – Massa seca da parte aérea (mg) de plantas de corticeira-da-serra inoculadas com isolados de *E. falcata*. Médias (3 repetições) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (10%)..... 26
- Figura 2** – Plantas e raízes com nódulos de corticeira-da-serra.....28
- Figura 3** – Nitrogênio total da parte aérea (N total) de arroz inoculadas com isolados de *E. falcata*.....34

1. INTRODUÇÃO

Bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, que nodulam plantas da família das leguminosas despertam grande interesse econômico, pois essa simbiose pode acarretar na redução de custos com adubação nitrogenada. Inoculantes contendo rizóbios são utilizados em cultivos, como a soja, suprimindo toda demanda de nitrogênio que a cultura necessita, acarretando em menos gastos e poluição por lixiviação de nitratos.

Já, a inoculação em gramíneas, com os rizóbios sendo utilizados como promotores de crescimento, tem como benefícios a diminuição do uso de fertilizantes, e conseqüentemente menos custo de produção com maior aproveitamento dos nutrientes.

Os rizóbios são estudados não apenas devido à simbiose com leguminosas, mas também por habitarem o solo e colonizarem plantas não-leguminosas, contribuindo para o desenvolvimento dessas plantas, servindo como promotores de crescimento. Em plantas não-leguminosas, os rizóbios não fixam nitrogênio nem formam nódulos, mas podem colonizar, endofiticamente, raízes, caules e folhas dessas plantas, estimulando seu crescimento. Diversos mecanismos são utilizados pelos rizóbios na promoção de crescimento vegetal, podendo ser de forma direta ou indireta, como por exemplo, pela produção de fitormônios, solubilização de fosfatos inorgânicos, disponibilização de fósforo e pela capacidade de antagonismo a fitopatógenos.

Os estudos realizados com a inoculação de rizóbios em diversas gramíneas como arroz, trigo, aveia e milho, têm mostrado que essa associação pode acarretar em incremento de massa de parte aérea e raiz, aumentando o comprimento de parte aérea e raiz, também em uma maior produção em grãos e melhor aproveitamento e absorção de nutrientes.

A corticeira-da-serra é uma planta leguminosa arbórea e destaca-se por habitar tanto locais secos como úmidos, sendo seu uso recomendado para

recuperação de áreas degradadas e matas ciliares, e também, para arborização urbana devido às belas inflorescências que produz. É uma árvore endêmica da América do Sul e está na lista das espécies ameaçadas de extinção. Por apresentar capacidade de fazer simbiose com rizóbios, onde o nitrogênio atmosférico é fixado tornando-o disponível para a planta, acaba por beneficiar indiretamente o solo e as plantas próximas pelos exsudatos radiculares e decomposição de resíduos da corticeira ricos em nitrogênio.

Árvores nativas, que por lei, são proibidas de corte, muitas vezes são encontradas em margens de áreas de cultivos agrícolas. Além disso, a preservação de espécies como a corticeira-da-serra é importante, não só por ser nativa e estar ameaçada, como também pela simbiose que mantém com rizóbios que são bactérias que podem associar-se e promover o crescimento de plantas que estão no mesmo tipo de solo. Com isso, supõe-se que os rizóbios nativos teriam vantagens competitivas em relação a micro-organismos inoculados para promover o crescimento, pois já estariam adaptados ao tipo de solo e à microbiota local.

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi isolar e selecionar rizóbios nativos de solos do Rio Grande do Sul, simbiontes em plantas de corticeira-da-serra (*Erythrina falcata*), que sejam capazes de promover o crescimento vegetal de gramíneas como o arroz (*Oryza sativa*) e o trigo (*Triticum aestivum*).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Rizóbios e fixação biológica de nitrogênio

A principal fonte de nitrogênio no solo é a matéria orgânica que entra no sistema por diversos compostos orgânicos provenientes de micro-organismos fixadores de nitrogênio, como os rizóbios, por resíduos de plantas e também pela aplicação de nitrogênio mineral (WEBER; MIELNICZUK, 2009). No entanto, essa conversão enzimática do nitrogênio atmosférico realizada por micro-organismos chamados diazotróficos, de forma simbiótica ou assimbiótica (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006) pode acarretar na diminuição de aplicações de N nas culturas.

A interação leguminosa/rizóbio ajuda no enriquecimento e incorporação de N no solo, que favorece a regeneração natural e que irá ser utilizado pelos cultivos subsequentes. Em rotação ou consórcio com culturas anuais, fornece ótima cobertura e proteção ao solo, produção de forragem de qualidade para pastejo, favorece a diversidade de flora e fauna silvestre; e tolerância à baixa fertilidade e compactação do solo (SIQUEIRA et al., 2008). Por conta de todas as vantagens e em meio à crise mundial de energia, e a crescente preocupação em produzir preservando o meio ambiente, há no mundo inteiro, um interesse cada vez maior por todos os aspectos da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (FANGERIA, 1998).

Os rizóbios são bactérias do solo, Gram-negativas, não formadoras de endósporos, com tamanho variando de 0,5-0,9 por 1,2-3,0 μm , que podem ser de vida livre ou simbiontes com plantas da família das leguminosas. Quando em simbiose, formam nódulos que são estruturas formadas nas raízes das leguminosas, onde ocorre a FBN (SOMASEGARAM & HOBEN, 1994; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A simbiose rizóbio/leguminosa é iniciada com a liberação de flavonoides pela planta, que são reconhecidos pela bactéria e que ativam os

genes nod dos rizóbios e fazem o fator de nodulação (fator Nod) expressar-se, sendo responsável por uma série de alterações na expressão gênica da planta hospedeira, induzindo à formação do nódulo (KOUCHI et al., 2010).

A bactéria começa a produzir lipoquitos-oligosacarídeos, que são reconhecidos pelas células radiculares e que fazem com que alguns hormônios da planta sejam ativados, ocorrendo o encurvamento do pelo radicular (GAGE, 2004). A partir disso, o pelo radicular envolve as bactérias por completo e há a formação de um cordão de infecção, onde os microorganismos penetram na planta (GAGE, 2004; OBERTELLO et al., 2003).

Com a evolução da infecção, é formado um canal dentro do canal radicular, enquanto no periciclo é iniciado o rearranjo do citoesqueleto microtubular e na parte interna do córtex ocorre a ativação das células e as células infectadas se fundem, aumentando assim seu tamanho, e se dividindo, dando origem ao primórdio nodular. O que resulta na formação do primórdio nodular é a diferenciação celular que se estende progressivamente para o meio e para a área mais externa do córtex (FAGAN et al., 2007).

A partir disso, há uma intensa divisão celular, com um sistema vascular lateral, que ocasiona o amadurecimento do primórdio nodular até a estrutura do nódulo nas raízes. Dentro dos nódulos há milhares de simbiosomas, que são estruturas de proteção para que as células bacterianas não fiquem em contato com o citoplasma vegetal, na região central do nódulo fazendo a fixação de nitrogênio (KOUCHI et al., 2010).

Dentro dos simbiosomas há a formação da leg-hemoglobina, que faz o papel de transporte de oxigênio para as bactérias (REIS et al., 2006). Pelo fato da enzima nitrogenase, que transforma o N_2 a NH_3 , ser oxidada em contato com o oxigênio, e ao mesmo tempo necessitar de O_2 para gerar ATP e redutores para a nitrogenase, existe essa proteína, leg-hemoglobina, responsável pelo transporte de oxigênio nos simbiosomas e que fornece quantidades controladas de O_2 (FISHER & NEWTON, 2002).

Como consequência da formação dos nódulos, as bactérias deixam de ter vida livre, interrompem o processo de divisão, aumentam de tamanho passando a ter forma de bacteróides, e é nessas condições, dentro dos nódulos, que a FBN ocorre (GUIMARÃES et al, 2003; KOUCHI et al, 2010).

A distribuição dos micro-organismos simbiosomas de plantas

leguminosas, com mais de 98 espécies agrupadas, se dá em três principais subclasses filogenéticas α , β e γ proteobacteria. Com 13 gêneros, incluindo os gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, está a subclasse das α -proteobacteria e as β -proteobacteria, com dois gêneros que pertencem à ordem Burkholderiales, e um gênero da ordem Pseudomonales da subclasse γ -proteobacteria (WEIR, 2016).

2.2 Promoção de crescimento em plantas

A capacidade de promoção de crescimento vegetal por alguns rizóbios vem sendo observada quando inoculados em arroz, trigo e milho, não pela capacidade de fixar nitrogênio, mas por mecanismos, como a produção de substâncias fitoreguladoras, aumento da disponibilidade de fósforo, ou mecanismos indiretos, como o controle biológico de fitopatógenos (HAHN et al., 2013).

Estudos mostram a interação de rizóbios com plantas da família Poaceae, onde foram observados aumentos significativos na disponibilidade de nitrogênio e nutrientes por meio da interação de bactérias fixadoras de nitrogênio com gramíneas, que são plantas que não fazem associação simbiótica com rizóbios (BODDEY et al., 1995; JAMES, 2000; RONCATO-MACCARI et al., 2003).

Conhecidas na literatura como “plant growth-promoting rhizobacteria” (PGPR) ou “rizobactérias promotoras de crescimento de plantas” (RPCP), essas bactérias promotoras de crescimento vegetal colonizam e exercem efeitos benéficos nas plantas, podendo aumentar a taxa de germinação de sementes, ajudar no desenvolvimento de órgãos, na produção de flores e no rendimento das culturas em casa de vegetação e no campo (DEY et al., 2004).

Chi et al. (2005), relatou a colonização de rizóbios em arroz, iniciando com bactérias habitando a superfície do rizoplano, seguido da colonização endofítica das raízes e migrando para a base do caule, bainha da folha e por fim, nas folhas de arroz. Singh et al. (2006), Perrine-Walker et al. (2007) e Osório Filho (2014) também demonstraram que rizóbios infectam e colonizam intercelularmente o interior das folhas e raízes de arroz.

2.3 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal

Os mecanismos de promoção de crescimento de planta por rizóbios em não-leguminosas podem ser de ação direta ou indireta. Sem causar sintomas de doenças. Os rizóbios possuem a capacidade de colonizar as raízes, caules e folhas da gramínea, produzindo substâncias hormonais como o ácido indol-acético, estimulando diretamente o crescimento destes vegetais (MANTELIN & TOURAINE, 2004; CHEN et al., 2005); suprimindo as suas necessidades nutricionais com a fixação biológica de nitrogênio (TAIZ & ZIEGER, 2004) e solubilização de fosfatos (BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001). Os mecanismos indiretos se relacionam com a proteção das plantas contra micro-organismos patogênicos (MISHRA et al., 2006; DUTTA et al., 2007).

2.3.1 Produção de fitormônios

Fitormônios são compostos orgânicos que atuam em concentrações extremamente baixas influenciando nos processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos das plantas (FUENTES-RAMIREZ & CABALLERO-MELLADO, 2006). Tradicionalmente, essas substâncias reguladoras de crescimento de plantas têm sido divididas em grupo das auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e um grupo chamado de inibidores, que inclui o ácido abscísico (ABA), compostos fenólicos e alcalóides (FRANKENBERGER & ARSHAD, 1995; FERGUSON & LESSENGER, 2006). Atualmente, a capacidade de sintetizar auxinas é o mecanismo mais bem estudado em rizobactérias (TSAVKELOVA et al., 2006; SPAEPEN et al., 2007).

Dentre as auxinas mais importantes está o ácido indol-acético (AIA) que é o principal responsável pela divisão e expansão de células, diferenciação de tecidos de plantas e pelo estímulo ao alongamento de raízes. Em muitas rizobactérias de vida livre, bactérias simbióticas, e também espécies bacterianas patogênicas, tem sido detectada a capacidade de sintetizar AIA (COSTACURTA & VANDERLEYDEN, 1995; TSAVKELOVA et al., 2006).

A síntese de AIA, para a grande maioria das rizobactérias, é realizada a partir do precursor triptofano por vias metabólicas diferentes. Também pode ser sintetizado através de vias independentes do triptofano, embora em

quantidades inferiores (SPAEPEN et al., 2007; OSORIO FILHO, 2014).

Nos micro-organismos, a síntese de AIA pode ocorrer por três distintas vias. A que ocorre na maioria das bactérias pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, é a via ácido indol-3-pirúvico e aldeído indol-3-acético. A segunda via, observada em *Pseudomonas* e *Azospirillum*, envolve a conversão do triptofano em aldeído indol-3-acético, que pode envolver uma via alternativa em que se forma triptamina. E a terceira é através da biossíntese indol-3-acetamida, que é a rota realizada por bactérias fitopatogênicas (KHAN et al., 2014).

Em plantas não-leguminosas, o AIA produzido por rizóbios pode induzir a formação de raízes e, conseqüentemente, um incremento em volume, peso e área da superficial de raízes (DAZZO & YANNI, 2006). Outro resultado da inoculação com bactérias que produzem auxinas é o aumento da formação de raízes adventícias (SOLANO et al., 2010).

Outro hormônio, que mais de 80% dos micro-organismos isolados da rizosfera são capazes de produzir “*in vitro*”, são as citocininas (BAREA et al., 1976). No entanto, bactérias promotoras de crescimento têm produção de citocininas menos expressiva que a produção de auxinas (BOIERO et al., 2007). Esse grupo de hormônios promove a divisão celular, o desenvolvimento de raízes e formação de pelos radiculares, porém são compostos lábeis e de difícil quantificação e identificação (FRANKENBERGER & ARSHAD, 1995).

Estudos com rizobactérias produtoras de fitormônios vegetais demonstraram que a inoculação em trigo e arroz promoveu maior crescimento vegetal em relação aos tratamentos controle (KHALID et al., 2004; OSORIO FILHO et al., 2016). No entanto, houve efeitos negativos e positivos em relação ao alongamento e peso das raízes em diferentes cultivares de trigo na inoculação de rizobactérias isoladas (KHALID et al., 2004).

2.3.2 Solubilização de fosfato inorgânico

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para o metabolismo de plantas e apesar da quantidade de fósforo nos solos ser, geralmente, bastante alta, a maior parte deste fósforo está insolúvel, em formas minerais, e acaba

sendo lentamente disponibilizado para as plantas (RODRIGUEZ et al., 2006; RICHARDSON et al., 2009). Além disso, parte do fósforo inorgânico solúvel que é usado como adubo químico acaba sendo imobilizado pela intensa adsorção nas partículas do solo, tornando-se também indisponível para as plantas, sendo assim desperdiçado (GLICK, 2012).

Uma opção para melhorar a eficiência da utilização do fósforo do solo são micro-organismos que excretam substâncias capazes de solubilizar fosfatos insolúveis. Além de solubilizar fosfato de cálcio, mecanismo adequado para solos alcalinos, microrganismos do solo podem, também, solubilizar fosfato de ferro, de alumínio, de magnésio e outros, melhorando a eficiência da utilização de fósforo do solo pela excreção de substâncias solubilizadoras (GYANESHWAR et al., 2002; VESSEY, 2003; CHAGAS JR et al., 2010).

A formação de complexos de ferro ou de alumínio com ácidos orgânicos (acetato, lactato, malato, etc), excretados pelas bactérias, formam complexos de ferro ou de alumínio, dependendo dos fosfatos presentes nos solos e tornam o fósforo disponível para as plantas (GYANESHWAR et al., 2002). Outros mecanismos utilizados pelas bactérias da rizosfera para solubilizar fosfatos insolúveis além da produção de ácidos orgânicos, é a excreção de íons H^+ e a biossíntese de fosfatases (ARCAND & SCHNEIDER, 2006).

Os rizóbios estão entre os micro-organismos de solo com o maior potencial de solubilização (RODRIGUEZ E FRAGA, 1999). Também têm sido descritos como solubilizadores de fosfato, estirpes ectorizosféricas como *Pseudomonas* e *Bacillus* (IGUAL et al., 2001).

2.4 Rizóbios promotores de crescimento em gramíneas

O arroz (*Oryza sativa* L.) e o trigo (*Triticum aestivum*) são monocotiledôneas, pertencentes à família Poaceae e estão entre os cereais mais cultivados e consumidos no Brasil e no mundo (CONAB, 2016; USDA, 2016).

O efeito benéfico da interação de rizóbios com gramíneas já tem sido demonstrado em trabalhos com diferentes tipos de cultivos, como arroz (YANNI et al., 2001; MISHRA et al., 2006; OSORIO FILHO et al., 2016), trigo (ETESAMI et al., 2009, YANNI et al., 2016), milho (*Zea mays*) (RIGGS et al., 2001; CASSAN et al., 2009; HAHN et al., 2013), e aveia (*Avena sativa*) (STAJKOVIC-

SRBINOVIC et al., 2014).

A utilização de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de cereais, como o arroz, acaba por suprir parte da demanda de nitrogênio para as culturas, onde os adubos minerais são substituídos por bactérias diazotróficas (FERREIRA et al., 2003; XIE et al., 2003). Em trigo, Yanni et al., (2016) mostram que os rizóbios desenvolvem naturalmente uma associação endofítica e também podem aumentar a produção de grãos.

Osorio Filho et al. (2016), verificaram que pela inoculação de rizóbios em arroz, a produção de massa seca aumentou e que esse efeito aumenta conforme a dose de nitrogênio aplicada, indicando que é possível reduzir a quantidade de adubo nitrogenado aplicado na cultura com a inoculação dessas bactérias.

Porém, Choudhury e Kennedy (2004), sugerem que a associação entre plantas e bactérias seja controlada pelo genótipo das plantas, isto é, dependendo da cultivar, pode ter mais ou menos interação dos rizóbios com a planta.

2.5 Corticeira-da-serra

Plantas pertencentes à família das leguminosas têm maiores teores de nitrogênio que plantas de outras famílias (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Essa característica faz com que a presença das leguminosas aumente a atividade biológica e estas atuem como agentes formadores e estabilizadores da matéria orgânica do solo (LAVELLE, 2000; RESH et al., 2002). Contribuindo, também, com a recuperação do solo pela deposição de material vegetal com baixa relação C:N (NARDOTO et al., 2008), permitindo a recolonização vegetal e o aumento da biodiversidade (SIDDIQUE et al., 2008).

Com cerca de 120 espécies conhecidas, do gênero *Erythrina* (SCHRIRE, 2005), essas plantas são utilizadas para diversos fins, um deles são para os sistemas agroflorestais, possuindo grande importância para prática de manejo de áreas e manutenção da fauna silvestre (EMBRAPA, 2004). Também, em alguns lugares são usadas em plantações para sombreamento e suporte, especialmente para videiras e pimenteiros (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1979).

Já, especificamente, a corticeira-da-serra (*Erythrina falcata* Benth.), também chamada de mulungu e sapatinho-de-judeu, é utilizada na recomposição de ecossistemas degradados, fins medicinais e também para a arborização urbana, pois possuem densas inflorescências formadas de flores vermelhas alaranjadas, atraentes e vistosas, de longa duração que recobrem a árvore na primavera (LORENZI, 2002). Os frutos, do tipo legume, amadurecem em setembro-novembro, entretanto permanecem sobre a árvore por mais alguns meses (ALMEIDA, 2010).

A corticeira-da-serra é uma espécie arbórea da família Leguminosae, e pertencente à subfamília Papilionoideae e faz simbiose com rizóbios, formando nódulos radiculares (NEVES et al., 2006). Ela é endêmica da região sul e sudeste do Brasil, também possuindo registro de ocorrência na Bolívia, na Argentina, no Paraguai e no Peru (CARVALHO, 2003, EMBRAPA FLORESTAS, 2004).

Ocorre nas florestas Ombrófila Mista e Estacional Semidecidual, e tem uma ampla distribuição, desde ecossistemas de florestas úmidas, com inundações periódicas de rápida duração (DURIGAN & DIAS, 1990) ou em áreas com solo permanentemente encharcado (TORRES et al., 1992), até florestas decíduas e semidecíduas, e no cerrado. A corticeira é recomendada para a restauração de matas ciliares por ser considerada adaptada a solos muito úmidos (LORENZI, 2002).

Tem como característica ser de grande porte, podendo chegar a 35 metros de altura e até 70 centímetros de diâmetro. É uma espécie secundária tardia, heliófita, decídua, seletiva higrófila, característica de início de encosta e de áreas de várzea, pela capacidade de tolerar alagamento de suas raízes (KRUKOFF, 1939; LORENZI, 1992).

Tolera sombreamento de intensidade baixa a moderada, mas durante os dois primeiros anos, a corticeira-da-serra, não suporta baixas temperaturas e quando adultas podem tolerar temperaturas mínimas de até 8°C, em florestas naturais (CARVALHO, 2003).

Atualmente, segundo Embrapa (2010), há a recomendação da estirpe BR 5609 (*Bradyrhizobium elkanii*) para inoculação em corticeira-da-serra (*Erythrina falcata*) e apenas um trabalho de Freitas et al. (1980), com eficiência simbiótica e interação de rizóbios com *Erythrina falcata*, por isso a importância desse trabalho para conhecer e entender a simbiose nessa arbórea.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar e selecionar rizóbios nativos de *Erythrina falcata* que possam ser inseridos em lavouras de culturas anuais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do trabalho amostras de solos foram coletadas, na camada de 0 – 20 cm, em março de 2014 na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, localizada em Eldorado do Sul. Foram selecionadas dez áreas com diferentes tipos de cultivos como: áreas com cobertura vegetal de pastagem, mata nativa, cultivo de jacarandá com capim elefante, cultivo de guabiju com bracatinga, cultivo de eucalipto, soja, ervilhaca e milho. O solo dos locais é classificado como um Argissolo Vermelho distrófico típico (EMBRAPA, 2006).

4.1. Obtenção dos nódulos e dos isolados bacterianos

Para a obtenção dos nódulos realizou-se o cultivo de plântulas de corticeira-da-serra (*Erythrina falcata*), utilizando-se sementes que foram previamente desinfestadas e pré-germinadas. A quebra de dormência das sementes de corticeira-da-serra foi realizada por escarificação manual, atritando as sementes em lixa abrasiva. Logo após foram desinfestadas por imersão em álcool (70%) durante trinta segundos, hipoclorito de sódio (2,5 %) por trinta segundos e cinco lavagens sucessivas com água destilada esterilizada.

As sementes desinfestadas foram pré-germinadas colocadas em placas de petri com papel-filtro, previamente autoclavadas umedecidas com 3 mL de água destilada estéril, no escuro, à 28°C. Após as plântulas foram transferidas para vasos “Leonard” (VINCENT, 1970) contendo, na parte superior, substrato com vermiculita e areia, na proporção 2:1 e na parte inferior solução nutritiva (SARRUGE, 1970). Os vasos foram esterilizados em autoclave a 120°C, durante duas horas.

Em cada vaso “Leonard” foram colocadas duas plântulas e inoculou-se alíquotas de 5 mL da suspensão das amostras de solos (10 gramas de solo

em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada). As plantas foram cultivadas na casa de vegetação do Departamento de Solos da UFRGS.

Após 60 dias, as plantas foram coletadas, as raízes lavadas e os nódulos destacados e armazenados em frascos contendo sílica e levados ao laboratório para posterior isolamento dos rizóbios.

Para o isolamento bacteriano, os nódulos foram reidratados em água esterilizada durante uma hora e previamente desinfestados em álcool 70% por trinta segundos, em hipoclorito de sódio (2,5 %) por 30 segundos e 5 lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Após a desinfestação externa, cada nódulo foi macerado, usando-se pinça esterilizada, em placas contendo meio Agar levedura manitol (LMA) (VINCENT, 1970) com adição de vermelho congo.

A inoculação nas placas foi realizada utilizando-se o método do esgotamento. Após serem obtidos isolados com colônias homogêneas e características persistentes, realizou-se a caracterização da morfologia colonial dos isolados bacterianos que, posteriormente, foram inoculados em tubos contendo meio de cultura LMA e incubados por sete dias a 28°C, e armazenados sob refrigeração.

4.2. Caracterização morfológica das colônias dos isolados

A morfologia colonial dos isolados foi avaliada observando-se as características das colônias quanto ao tipo de bordos, forma, elevação da colônia, brilho da superfície, tamanho, densidade ótica e viscosidade.

Também foi avaliada a reação dos cultivos dos isolados em meio LMA (VINCENT, 1970) com adição do corante indicador Azul de Bromotimol (25 mg/L). A avaliação foi realizada durante dez dias de incubação em estufa a 28°C. A mudança da coloração do meio verde (pH 7) para a cor amarela indica a acidificação do meio (abaixo de 6), já a alteração para o azul, indica a alcalinização do mesmo, com pH acima de 7,6 (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994).

Após, realizou-se o teste de coloração de Gram utilizando-se o Kit da NewProv (lote 12238E), contendo um conjunto de soluções para coloração de Gram.

As lâminas para a avaliação foram preparadas com esfregaços do cultivo dos isolados na lâmina, com alças flambadas. Com a solução de Cristal Violeta a lâmina foi recoberta por 30 segundos, e após escorrer o excesso de corante, verteu-se a solução de Lugol agindo sobre as lâminas por um minuto. Lavou-se com a solução de álcool-acetona e após com água. Finalmente, a solução de Fucsina Fenicada de Gram foi adicionada à lâmina, e após 30 segundos foi lavada com água. Para interpretação da coloração de Gram a lâmina foi observada em microscópio com óleo de imersão. Os micro-organismos Gram-negativos têm a coloração avermelhada.

4.3. Autenticação dos isolados

Os isolados bacterianos, obtidos anteriormente de nódulos de corticeira-da-serra, foram cultivados em frascos contendo 30 mL de meio LM e mantidos sob agitação constante a 120 rpm, durante seis dias a uma temperatura de 28°C.

As sementes de corticeira-da-serra passaram pelo mesmo processo de quebra de dormência, desinfestação e pré-germinação descritos anteriormente no item 3.1. Três sementes pré-germinadas foram colocadas em vasos com substrato areia e vermiculita (2:1), esterilizados em autoclave durante duas horas a 120°C, e inoculou-se 5 mL da cultura bacteriana crescida em meio de cultura.

O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições de cada tratamento. Os vasos ficaram em casa de vegetação e para o cultivo das plantas, utilizou-se solução nutritiva (SARRUGE, 1975), previamente autoclavada, isenta de nitrogênio para não inibir a nodulação.

A avaliação da formação de nódulos radiculares nas plantas foi realizada 64 dias (por ser uma espécie arbórea) após a inoculação, observando-se visualmente a formação de nódulos.

4.4. Solubilização de fosfato tricálcico

Os rizóbios de *E. falcata* já autenticados, Ef3, Ef4, Ef6, Ef7, Ef9, Ef11, Ef12 e Ef13, foram cultivados em meio líquido conforme descrito no item 3.3.

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada em placas de petri contendo o meio com 10 g.L⁻¹ glicose, 5 g.L⁻¹ de NH₄Cl, 1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 15 g.L⁻¹ de Agar (VERMA et al., 2001), em pH 6,8, adaptado por Silva (2016), onde se substituiu 4 g.L⁻¹ de fosfato de cálcio (CaHPO₄) por 1 g.L⁻¹ de fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂), como fonte de fosfato.

O caldo bacteriano obtido foi inoculado nas placas de petri, com uma alíquota de 20µL com três repetições por isolado. As placas foram incubadas em estufa, por 10 dias, a uma temperatura de 28°C.

A formação de um halo transparente em torno da colônia indica a capacidade de solubilização do fosfato pelo isolado, o qual foi verificado a cada 24 horas por oito dias. As medidas dos diâmetros dos halos e das colônias foram utilizadas para a obtenção do índice de solubilização de fosfato (ISF), que é a razão do diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia (BERRAQUERO et al., 1976).

Utilizou-se o isolado de *Burkholderia* sp. UFRGS VP16, como controle positivo, já testado como solubilizador de fosfato e o isolado UFRGS VP5, como controle negativo por não apresentar a capacidade de solubilizar fosfato (ALVES, 2005), ambos da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.5. Avaliação da produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético (AIA)

Utilizando a metodologia adaptada proposta por Asghar et al. (2002) foi avaliada a capacidade dos rizóbios em produzir ácido indol-acético. Esta metodologia é baseada na oxidação dos compostos indólicos por sais férricos, pois em pH 2,6 o ferro decompõe os compostos indólicos lentamente.

Para isso, os isolados bacterianos foram cultivados em meio líquido LM com adição de triptofano (50 mg/L) e sem adição de triptofano, por seis dias a 28°C sob agitação de 120 rpm.

Após os seis dias, 2 mL do caldo bacteriano foi transferido para tubos eppendorff centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos. Uma alíquota de 1,5 mL foi retirada do sobrenadante e adicionou-se 1 mL da solução de Salkowski (2 mL de FeCl₃ 0,5M + 98 mL de HClO₄ 35%). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos, para que ocorresse a reação

de oxidação. Após, realizou-se a leitura do AIA em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 550 nm.

Para a quantificação dos teores equivalentes de AIA, utilizou-se uma curva padrão com AIA sintético nas seguintes concentrações 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 e 150 μL . A partir da curva padrão os valores das leituras das amostras foram substituídos e a produção de AIA pelo rizóbio, quantificada.

4.6. Avaliação dos rizóbios quanto à eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio em corticeira-da-serra

Os tratamentos consistiram dos isolados Ef3, Ef4, Ef6, Ef7, Ef9, Ef11, Ef12, Ef13, mais dois tratamentos controles não inoculados, um sem adição de nitrogênio e outro com adição de nitrogênio (NH_4NO_3), equivalente a 45 kg.ha⁻¹, calculada com base no tempo de cultivo e na recomendação técnica para o cultivo da acácia-negra, por ser uma das únicas espécies florestais leguminosas no Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CQFS, 2004).

O experimento foi realizado em vasos “Leonard” (VINCENT, 1970) contendo uma mistura composta por vermiculita e areia (2:1), no compartimento superior. Os vasos foram esterilizados em autoclave durante duas horas a 120°C.

Em cada vaso foram colocadas três sementes de corticeira-da-serra desinfestadas e pré-germinadas (item 3.1). Após, adicionou-se a solução nutritiva (SARRUGE, 1975) isenta de nitrogênio, no compartimento inferior dos vasos Leonard. A inoculação dos vasos foi realizada adicionando-se 2 mL do caldo de cultivo de cada rizóbio em meio LM (item 3.3), com uma concentração média de 1,9.10⁸ UFC.mL⁻¹.

Após três semanas foi realizado o desbaste das plantas deixando-se apenas uma por vaso. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento.

As plantas foram coletadas após 60 dias de cultivo. A parte aérea da planta foi separada do sistema radicular e acondicionada em sacos de papel e colocada em estufa com ventilação forçada para secagem a 65°C por três dias. O sistema radicular foi levado ao laboratório para coleta dos nódulos radiculares

que foram destacados das raízes, contabilizados e, posteriormente, também levados à estufa junto com as raízes para secagem. As avaliações realizadas foram: peso de matéria seca da raiz e da parte aérea, o número de nódulos e o peso de massa seca de nódulos.

A capacidade dos isolados em promover aumento da massa vegetal total, em comparação com os tratamentos controle, foi calculada pelo índice de eficiência relativa adaptado de Brockwell et al. (1966):

$$\text{IER (\%)} = \frac{(\text{MS inoculado} - \text{MS controle sem N})}{(\text{MS controle com N} - \text{MS controle sem N})}$$

Onde: IER (%) = índice de eficiência relativa; MS inoculado = massa seca da parte aérea do tratamento inoculado; MS controle sem N = massa seca da parte aérea do controle sem adição de nitrogênio; MS controle com N = massa seca parte aérea do controle com adição de nitrogênio.

Foi realizado o cálculo da relação de massa seca da parte aérea com a massa seca de nódulos (MSPA/MSN), para verificar quanto do incremento da massa seca da parte aérea das plantas de corticeira estaria relacionado à massa de nódulos, e a relação massa seca de nódulos com o número de nódulos (MSN/NN).

$$\text{Relação MSPA/MSN (mg)} = \frac{(\text{MSPA inoculado} - \text{MSPA controle sem N})}{(\text{MS de nódulos})}$$

$$\text{Relação MSN/NN (mg)} = \frac{(\text{Massa seca de nódulos})}{(\text{Número de nódulos})}$$

4.7.Efeito da inoculação dos isolados sobre a germinação de sementes de arroz e trigo

O teste de germinação foi realizado com sementes de arroz (*Oryza sativa*), cultivar IRGA 424 RI e trigo (*Triticum aestivum*), cultivar BRS-parrudo, inoculadas com os isolados bacterianos retirados de nódulos de corticeira-da-serra. As sementes foram desinfestadas por imersão em álcool (70%) por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 segundos e cinco

lavagens com água destilada esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos. Após, utilizando-se pinça flambada, as sementes foram distribuídas em placas de petri com papel filtro, que serve como substrato para a germinação, anteriormente esterilizadas em autoclave.

Todos os isolados de *E. falcata* foram testados (Ef3, Ef4, Ef6, Ef7, Ef9, Ef11, Ef12, Ef13) e crescidos em frascos erlenmeyer com meio de cultura conforme descrito no item 3.3. Os rizóbios foram inoculados nas placas com sementes, adicionando-se 2 mL de caldo, com uma concentração média de $1,9.10^8$ UFC.mL⁻¹(Apêndice III) das culturas bacterianas.

Em cada placa colocou-se 50 sementes com quatro repetições para cada isolado. O tratamento controle sem inoculação foi constituído da adição de 2 mL do meio LM esterilizado. As placas foram colocadas em estufa a 25°C e, a cada 24 horas, as sementes germinadas foram contadas e retiradas das placas. Realizou-se a avaliação até o sexto dia.

Foram calculadas a porcentagem de germinação das sementes e também o índice de velocidade de germinação (IVG), sendo a soma do número de sementes germinadas a cada dia dividido pelo número de dias transcorridos a partir do primeiro dia em que ocorreu alguma germinação (MAGUIRE,1962).

4.8.Avaliação da capacidade dos rizóbios na promoção de crescimento de plantas de arroz e trigo em experimento em casa de vegetação

A interação entre os rizóbios e as plantas de arroz e trigo foi avaliada pela inoculação dos rizóbios isolados de corticeira-da-serra. Sementes de arroz foram desinfestadas e pré-germinadas, segundo a metodologia já descrita no item 3.1. Em seguida, as sementes pré-germinadas foram colocadas em vasos plásticos de 500 mL contendo mistura de vermiculita e areia (2:1) esterilizada em autoclave a 120°C por duas horas. Em cada vaso, foram colocadas 3 plântulas, que foram inoculadas com 2 mL de caldo de cada rizóbio crescido em meio de cultura LM por seis dias, com uma concentração média de $1,9.10^8$ UFC.mL⁻¹ (Apêndice III).

No total foram 10 tratamentos com cinco repetições, sendo 8 com inoculação dos rizóbios mais 50% da dose de nitrogênio recomendada para as

culturas, um com adição de 100% da dose recomendada para a cultura (120 kg.ha⁻¹ de N para o arroz e 80 kg.ha⁻¹ de N para o trigo) e outro, apenas com 50% da dose de nitrogênio recomendada para as culturas.

Após 10 dias, realizou-se o desbaste deixando-se apenas uma planta por vaso. Foram realizadas seis medidas do comprimento da parte aérea durante os 30 dias em que as plantas permaneceram na casa de vegetação.

Após 30 dias, foi contado o número de folhas e perfilhos por planta e as plantas foram retiradas dos vasos, a raiz foi lavada e o volume radicular determinado pelo método da proveta, onde a raiz foi imersa na proveta com um volume conhecido de água, e foi verificado o deslocamento de água. A raiz e a parte aérea das plantas foram acondicionadas em sacos de papel identificados e colocados em estufa para secagem a 60°C até que o peso se tornou constante e realizou-se a determinação da massa da matéria seca da raiz e da parte aérea e nitrogênio da parte aérea.

4.9.Extração de DNA e amplificação da região do gene 16S rRNA

A extração do DNA genômico dos isolados foi realizada utilizando o Wizard Kit (Promega), de acordo com o protocolo disponibilizado. A amplificação da sequência conservada do gene 16S rRNA foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), onde a região de DNA do gene que codifica a porção 16S do ribossomo foi amplificada com os oligonucleotídeos 8F (AGAGTTTGATCCTTGGCTCAG) e 1492R (GCYTACCTTGTT-ACGACTT) (EDWARDS et al., 1989).

A preparação das amostras para a amplificação dos ácidos nucleicos foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 22 µL de uma mistura para reação de PCR Master Mix (Ludwig), 1 µL do primer 8F, 1 µL do primer 1492R e 1 µL das amostras de DNA extraídas dos isolados.

A reação foi incubada em termociclador “Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler”. O ciclo inicial foi a 94°C por 5 min, depois 40 ciclos divididos em: 94°C por 1 min para desnaturação, 52°C por 1min para o anelamento, e 72°C por 2min para extensão, e mais um ciclo final de extensão em 72°C por 10 min. Realizou-se, com o produto da amplificação, a eletroforese em gel de

agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®) e visualizados sob luz ultravioleta.

Os fragmentos de DNA foram enviados para sequenciamento no laboratório de biologia molecular da UFRGS que utiliza o equipamento automático ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) com sequencias obtidas com tamanho de 600 nucleotídeos. As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com as sequências de DNA existentes na base de dados do “National Center for Biotechnology Information – Basic Local Aligment Search Tool” (NCBI-BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando-se o software Chromas.

4.10. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância empregando-se o software R Core Team (2015), a comparação de médias foi realizada pelo teste de Duncan ao nível de 10% de probabilidade.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.Caracterização morfológica e autenticação dos isolados

Foram obtidos 13 isolados bacterianos provenientes de nódulos radiculares de *Erythrina falcata*, dentre os quais 8 tiveram capacidade de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em plantas de *E. falcata* no teste de autenticação. Os 8 isolados foram caracterizados quanto à morfologia colonial (Tabela 1), e apresentaram bordo liso, forma circular, elevação convexa e superfície brilhosa, características comuns em colônias microbianas de rizóbios.

Tabela 1 - Morfologia colonial de rizóbios isolados de nódulos radiculares de plantas de *E. falcata* em meio de cultura incubados por 9 dias.

Isolado UFRGS	Tamanho da colônia			Densidade ótica	Consistência	pH 9 dias
	4 dias	6 dias	9 dias			
	mm					
Ef4	8	13	*	opaca	butirosa	ácido
Ef3	0	1	3	translúcida	viscosa	ácido
Ef6	0	0,5	2,5	translúcida	butirosa	neutro
Ef7	0	0,5	2,1	translúcida	gomosa	neutro
Ef9	0	1	2,5	translúcida	gomosa	neutro
Ef11	0	0,5	2	translúcida	gomosa	neutro
Ef12	0	0,5	2	translúcida	gomosa	neutro
Ef13	0	1	*	translúcida	gomosa	neutro

*colônias coalescentes

Quanto às características apresentadas na Tabela 1, pode-se observar que o isolado UFRGS Ef4 apresentou densidade ótica opaca, diferentemente dos outros isolados.

Pode-se observar que o diâmetro da colônia do rizóbio Ef4, com 8 mm no quarto dia, teve um maior crescimento em menos tempo de incubação que os demais, e acidificou o meio de cultura, já as colônias dos outros rizóbios em meio de cultura tiveram crescimento lento, alcalinizando o meio de cultura e

produzindo pouca quantidade de muco. Características de rizóbios de crescimento lento (EF3, Ef6, Ef7, Ef9, Ef11, Ef12 e Ef13), e colônias com poucos milímetros, crescendo a partir do quinto dia, são encontradas em bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, e outras com observação de crescimento das colônias desde o segundo dia (EF4), de crescimento rápido podem ser classificadas como pertencentes ao gênero *Rhizobium*. A rápida expansão da colônia pelo meio de cultura fez com que no quinto dia não fosse possível a identificação das colônias, pois estas já estavam coalescentes.

5.2.Solubilização de fosfato tricálcico

A capacidade para solubilização de fosfato tricálcico foi considerada positiva quando se verificava a formação de um halo transparente em volta da colônia. Três isolados demonstraram capacidade de solubilizar o fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (UFRGS Ef4, Ef12 e Ef13) e também o isolado UFRGS-VP16 (*Burkholderia* sp.), com o Índice de Solubilização de Fosfato (ISF) de 3,96, utilizado como controle positivo por já ter demonstrado capacidade de solubilização de fosfato (ALVES, 2005). Os valores do índice de solubilização de fosfato foram de 1,21, para os rizóbios Ef13 e Ef4 e 1,23 para o isolado Ef12 (Tabela 2), e esses valores não diferiram pelo teste de Duncan (10%). Os halos de solubilização foram visualizados a partir do décimo dia após a inoculação nas placas em todos os isolados que demonstraram essa capacidade. Chagas Junior et al., (2010), encontraram resultados semelhantes com variação do índice de solubilização de fosfato entre 1,10 e 1,55 em 10 dos rizóbios estudados.

Observou-se que o rizóbio Ef4 que solubilizou fosfato também foi capaz de acidificar o meio de cultura. No trabalho de Hara e Oliveira (2004), a diminuição do pH por meio de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico e málico, é relacionado com a capacidade dos isolados de rizóbio em solubilizar fosfato de cálcio. A capacidade de solubilização de fosfato não é observada apenas pela presença de ácido e da sua concentração, mas também dependerá do tipo de fosfato e de ácido presente na solução e sua concentração (MARRA et al., 2012).

Já, os rizóbios Ef12 e Ef13 que solubilizaram fosfato, não alteraram o pH do meio de cultura, que permaneceu neutro. O que indica que o mecanismo capaz de solubilizar fosfato pode não ser a produção de ácidos orgânicos, pois

a solubilização pode ocorrer independente da produção de ácidos, e que pode estar relacionada a fatores que envolvem o crescimento microbiano e a extrusão de prótons (H⁺) resultantes da assimilação de NH₄⁺ (CHAGAS JUNIOR et al., 2010; ILLMER et al., 1995).

5.3. Avaliação da produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético (AIA)

A avaliação da produção de ácido indol-acético pelos isolados foi em meio de cultura líquido LM com e sem a adição de triptofano (50 mg.L⁻¹).

Apenas um isolado, Ef4, foi capaz de produzir AIA em meio de cultura LM sem adição de triptofano. Porém, quando testados em meio de cultura com adição de triptofano, todos os isolados foram capazes de produzir AIA, demonstrando diferença no teste de comparação de médias (Tabela 2).

Tabela 2 - Índice de solubilização de fosfato (ISF) dos isolados em meio de cultura LMA e produção de ácido indol-acético (AIA) em LM, sem e com adição de triptofano por rizóbios de *E. falcata*.

Isolados	ISF	AIA sem Triptofano	AIA com Triptofano
		µg/mL	
UFRGS Ef4	1,21	0,61 ± 0,1	21,6 ± 3,3 a**
UFRGS Ef12	1,23	0 0	4,14 ± 1,3 b
UFRGS Ef6	0	0 0	3,55 ± 0,3 b
UFRGS Ef13	1,2	0 0	3,23 ± 0,6 b
UFRGS Ef3	0	0 0	2,94 ± 0,6 bc
UFRGS Ef11	0	0 0	2,29 ± 0,1 bcd
UFRGS Ef9	0	0 0	0,94 ± 0,5 cd
UFRGS Ef7	0	0 0	0,71 ± 0,1 d
UFRGS Vp16	3,96	- -	- -
CV (%)			26,48

**= médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias Duncan (10%), ns= não significativo, CV= coeficiente de variação.

A maior quantidade de AIA produzido no meio de cultura com adição de triptofano foi do rizóbio Ef4 com 21,60 µg.mL⁻¹, já os menores valores foram dos rizóbios Ef11 (2,29 µg.mL⁻¹), Ef9 (0,94 µg.mL⁻¹) e Ef7 (0,71 µg.mL⁻¹), onde a produção de AIA de Ef9 e Ef11 também não diferiram da produção de Ef3. A

produção de AIA dos rizóbios Ef12, Ef6, Ef13, Ef3 e Ef11 não diferiram entre si. O rizóbio Ef4 ($0,61 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi o único capaz de produzir AIA em meio de cultura sem adição de triptofano, observando-se que esse valor é menor que todas as produções de AIA com adição de triptofano.

Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Silva (2016b), onde a produção de AIA de rizóbios de *Desmodium incanum*, em meio de cultura com adição de triptofano, variou de $0,90$ a $62,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e foi superior à produção sem adição de triptofano, que variou de $0,12$ a $7,67 \mu\text{g.mL}^{-1}$. E também no trabalho de Singha et al. (2016), onde 8 rizóbios tiveram a capacidade de produzir ácido indol-acético em meio de cultura com adição de triptofano, com produção máxima de $66 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Verificando-se que a quantidade de AIA sintetizada pode variar em relação à presença ou ausência de triptofano e também da espécie de rizóbio (WANI et al., 2007)

Segundo AHMAD et al. (2005), as concentrações mais elevadas de AIA podem ser tóxicas para as plantas e as mais baixas, ineficazes. Indicando que a promoção de crescimento de plantas é estimulada pela produção de AIA ou demais fitormônios produzidos por bactérias, porém apenas é benéfica dentro de uma faixa de concentração (BISWAS et al., 2000).

5.4.Avaliação da eficiência dos rizóbios na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de corticeira-da-serra

Nos resultados da massa da matéria seca da parte aérea das plantas de corticeira-da-serra (Figura 1), observa-se que pelo teste de Duncan (10%), os tratamentos inoculados com os rizóbios Ef3 (589 mg), Ef9 (586mg), Ef4(541 mg), Ef12 (503 mg), Ef13 (484 mg), Ef6 (442 mg) não diferiram entre si e apresentaram incrementos que variaram de 79% a 59% em relação ao tratamento nitrogenado. Calculando-se a média da massa seca da parte aérea de todos os tratamentos inoculados, encontra-se o valor de 478,25 mg de massa seca com 60 dias de experimento, resultado superior ao encontrado no trabalho de Freitas et al. (1980), também realizado com corticeira-da-serra inoculadas com rizóbios simbiotes, em que foram obtidas plantas que aos 75 dias tinham em média 414 mg de massa seca da parte aérea.

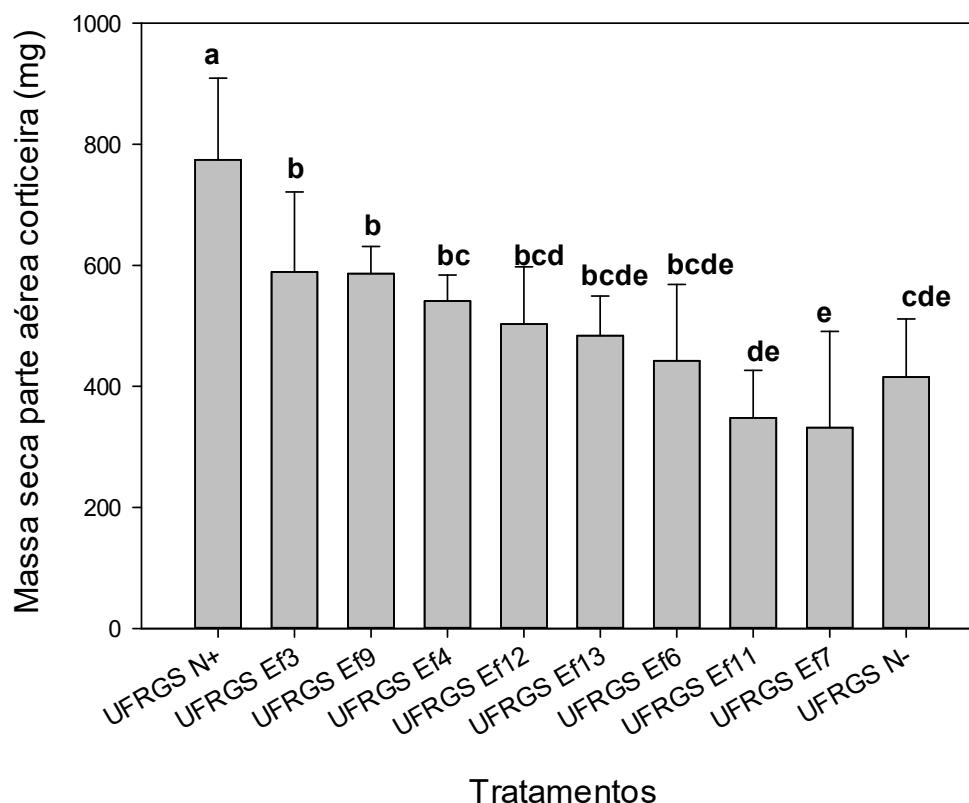


Figura 1 – Massa seca da parte aérea (mg) de plantas de corticeira-da-serra inoculadas com isolados de *E. falcata*. Médias (3 repetições) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (10%).

As plantas inoculadas com os rizóbios Ef4 tiveram o melhor desempenho em relação à massa seca de raiz comparando com os demais tratamentos inoculados, porém não diferindo dos tratamentos inoculados com Ef13, Ef12, Ef6, Ef3, Ef11, Ef9.

O índice de eficiência relativa (IER) variou de 48,4% para o tratamento com Ef3 e -23,3% para o tratamento inoculado com Ef7, demonstrando que houve eficiência simbiótica de quase 50% com apenas 60 dias de cultivo. O fator tempo é que pode explicar a eficiência relativa observada nos tratamentos, pois no trabalho de Freitas et al. (1980), a máxima atividade dos nódulos, observada pela atividade da enzima nitrogenase, ocorreu principalmente aos 75 dias quando a estirpe inoculada apresentou maior eficiência na planta de *E. falcata*.

Tabela 3 - Massa seca da raiz (MSR), massa seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e índice de eficiência relativa (IER) dos isolados de *E. falcata* em relação aos tratamentos controles.

Trat. UFGRS	MSR	MSN		NN		IER
	mg					%
T+N	357 ± 131 a*	-	-	-	-	100
Ef4	245 ± 42 b	11,2 ± 9,5 ab*		10 ± 6,5 ab*		35,1
Ef13	237 ± 45 bc	2,7 ± 1,2 b		2 ± 1,7 b		19,1
Ef12	224 ± 38 bc	7,3 ± 3,4 ab		7 ± 3,1 ab		24,4
Ef6	191 ± 97 bc	11,3 ± 6,4 ab		15 ± 6,6 a		7,42
Ef3	178 ± 49 bc	26,17 ± 25,8 a		22 ± 15,9 a		48,4
Ef11	174 ± 63 bc	17,2 ± 4,4 ab		7 ± 1,5 ab		-18,7
Ef9	147 ± 85 bc	14,33 ± 15,4 ab		4 ± 11,1 ab		47,63
Ef7	136 ± 28 c	2,6 ± 1,6 b		12 ± 11,2 ab		-23,3
T-N	144 ± 9 bc	-	-	-	-	0
CV (%)	33,59	45,53		42,62		-

* = médias (3 repetições) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (10%), CV(%): coeficiente de variação.

Outro fator que pode explicar os resultados de baixa eficiência simbiótica da inoculação em corticeira-da-serra é a especificidade entre rizóbios e hospedeiros, que é um mecanismo que minimiza chances de formação de associações ineficientes entre eles (PERRET et al., 2000). Porém Vargas & Hungria (1997), relatam que uma planta não-hospedeira foi capaz de induzir genes de nodulação em *Bradyrhizobium japonicum* e não de fixação. Portanto, mesmo que haja formação de nódulos pode ser que não haja efetividade na fixação de nitrogênio (SINGLETON et al., 1992).

O número de nódulos variou de 2 a 22 por planta (Tabela 3), destacando-se os tratamentos inoculados com os rizóbios Ef3 e Ef6 com os maiores números de nódulos radiculares, porém não diferindo do número de nódulos das plantas inoculadas com os rizóbios Ef4, Ef12, Ef11, Ef9 e Ef7 (Figura 2).

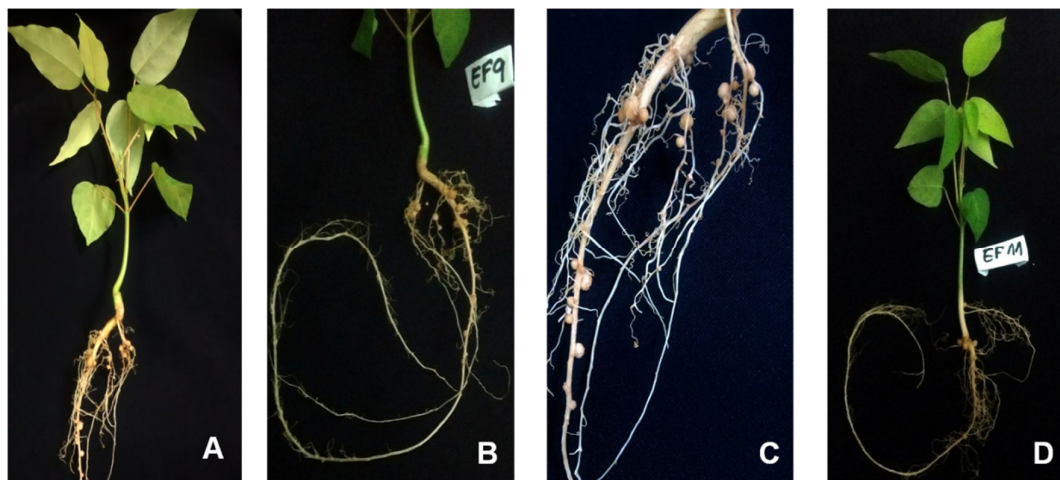


Figura 2 – Plantas de corticeira-da-serra com nódulos radiculares. (A) Inoculado com rizóbio Ef3, (B) Inoculado com rizóbio Ef9, (C) Inoculado com rizóbio Ef4, (D) Inoculado com rizóbio Ef11.

Analisando-se a relação entre a massa seca produzida na parte aérea com massa seca de nódulos das plantas inoculadas, relação MSPA/MSN (Tabela 4), observa-se que o maior valor foi obtido para as plantas inoculadas com o rizóbio Ef13, com 21,46 mg de incremento de massa seca da parte aérea por unidade de massa seca de nódulo. Já no tratamento inoculado com o rizóbio Ef7, observou-se valor negativo de -32,18 mg, pois a massa seca da parte aérea foi menor que o tratamento controle sem nitrogênio e também teve uma baixa massa seca de nódulos em relação aos demais, porém os nódulos podem apenas terem atuado como dreno de energia, prejudicando a produção de matéria seca.

Isso ocorre quando há a interação bactéria/planta, e o rizóbio utiliza parte dos fotoassimilados da planta hospedeira para formação de nódulos e em troca realiza a fixação de nitrogênio. Porém, quando se formam nódulos ineficientes, há uma espécie de parasitismo, pois além de não fixar nitrogênio na planta, parte dos produtos da fotossíntese que seriam utilizados para incremento de matéria seca utiliza-se para a formação de nódulos radiculares, atuando como um dreno fisiológico. Com isso, podemos dizer que os rizóbios podem ser eficientes em algumas plantas específicas, porém também podem comportar-se como parasitas em outras (HERNÁNDEZ et al. 2005; BARAIBAR et al. 1999).

Os valores observados para a relação massa seca de nódulos e número de nódulos, relação MSN/NN da Tabela 4, mostram que o valor de 1,6

mg foi obtido no tratamento inoculado com o rizóbio Ef13, pois produziu poucos nódulos, porém, com maior massa nodular e fixadores de nitrogênio ativos, o que foi observado pela resposta da massa seca da parte aérea.

Em outros tratamentos inoculados, como Ef6 e Ef7, onde a relação massa seca de nódulos e número de nódulos tiveram os menores valores, 0,73 e 0,28, pode ter acontecido que os nódulos foram inefetivos na produção de nitrogênio. O mesmo ocorreu no estudo apresentado por Barberi et al. (1998), em que os tratamentos inoculados com rizóbios em *Erythrina falcata*, encontrou-se nódulos sem atividade da nitrogenase, indicando, portanto, que estavam senescentes ou que eram inefetivos (sem fixação de nitrogênio).

Tabela 4 - Relação da massa seca da parte aérea (MSPA) com a massa seca de nódulos (MSN)* e relação da massa seca de nódulos (MSN) com o número de nódulos (NN) ** das plantas de *E. falcata* inoculadas com rizóbios de *E. falcata*.

Trat.	Relação MSPA/MSN	Relação MSN/NN
Ef3	6,65	1,35
Ef9	11,93	1,38
Ef4	11,25	1,15
Ef12	11,96	1,10
Ef13	21,46	1,60
Ef6	2,42	0,73
Ef11	-4,35	2,32
Ef7	-32,18	0,28

* $(MSPA - (T - N) / MSN)$ e ** (NN / MSN) , nomenclatura e dados relacionados demonstrados na Tabela 3.

5.5. Efeito da inoculação dos isolados sobre a germinação de sementes de arroz e trigo

O efeito da inoculação de isolados de *E. falcata* na germinação de sementes foi significativo pelo teste de Duncan (10%) para todos os parâmetros analisados.

A germinação de ambas as culturas iniciou no segundo dia, e após o terceiro dia, para o trigo, e sétimo dia para o arroz, o número de sementes germinadas não aumentou.

Tabela 5 - Índice de velocidade de germinação (IVG) e percentual total de germinação de arroz ao final de sete dias e percentual do terceiro dia de avaliação das sementes de trigo.

Trat. UFRGS	Arroz		Trigo	
	IVG	Percentual total (%)	IVG	Percentual total (%)
Ef4	18,4 ± 0,4 a*	88 ± 8,4 ab*	13,8 ± 0,2 ab*	95 ± 5,2 a*
Ef3	18,2 ± 0,6 a	89 ± 7,2 ab	14,0 ± 0,8 ab	90 ± 8,0 ab
Ef7	17,8 ± 0,3 ab	94 ± 4,1 a	14,3 ± 1,0 a	95 ± 5,9 a
Ef6	17,7 ± 0,4 ab	90 ± 5,7 ab	12,8 ± 1,2 b	85 ± 2,9 b
Ef13	16,7 ± 0,5 abc	87 ± 4,1 ab	13,3 ± 0,8 ab	85 ± 5,2 b
Ef12	16,2 ± 0,4 bc	87 ± 8,0 ab	14,4 ± 0,4 a	93 ± 3,8 a
Ef11	16,1 ± 0,4 bc	89 ± 2,5 ab	13,3 ± 0,8 ab	89 ± 3,8 ab
Ef9	15,4 ± 0,6 c	84 ± 9,1 b	13,5 ± 1,1 ab	90 ± 5,2 ab
Controle	14,8 ± 0,3 c	85 ± 5,9 ab	14,2 ± 0,1 a	94 ± 1,4 a
CV (%)	8,38	7,46	5,91	4,75

*= médias (4 repetições) seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias Duncan *(10%). CV= coeficiente de variação.

As sementes de arroz inoculadas com os rizóbios Ef4 e Ef3 apresentaram germinação antecipada em relação aos demais tratamentos obtendo o maior índice de velocidade de germinação (IVG), não diferindo também dos tratamentos inoculados com Ef7, Ef6 e Ef13, já o tratamento controle e Ef9 resultaram no pior IVG, não diferindo dos tratamentos Ef13, Ef12 e Ef11. A inoculação com os rizóbios Ef7, Ef12 e o tratamento controle nas sementes de trigo foram os que resultaram no maior IVG, não diferindo também dos tratamentos Ef4, Ef3, Ef13, Ef11, e Ef9, e o menor IVG foi da inoculação com o rizóbio Ef6, que também não diferiu dos tratamentos Ef4, Ef3, Ef13, Ef11, e Ef9.

No trabalho de Stroschein et al. (2011), os resultados foram semelhantes, onde foi verificado aumento do IVG de sementes de arroz quando inoculadas com rizóbios. Em outros trabalhos com arroz e alface, observando o efeito da inoculação de rizóbios produtores de AIA em sementes, também verificou-se aumento na velocidade da germinação das sementes inoculadas e nas fases iniciais do desenvolvimento das plantas (PALANIAPPAN et al., 2010; SCHLINDWEIN et al., 2008; VARGAS et al., 2009).

Em relação ao percentual total de germinação das sementes de arroz a inoculação com Ef7 teve o melhor resultado, juntamente com os rizóbios Ef4,

Ef3, Ef6, Ef13, Ef12, Ef11 e o tratamento controle. As sementes de trigo inoculadas com os rizóbios Ef4, Ef12 e o tratamento controle tiveram os melhores resultados de percentual total de germinação, diferindo dos tratamentos Ef6 e Ef13 com os menores percentuais.

Incrementos na germinação e aumentos da velocidade de germinação de sementes inoculadas com rizóbios produtores de AIA são relatados por autores como Biswas et al. (2000), Gupta et al. (2002), Pandey et al. (2005), Schlindwein et al. (2008), Vargas et al. (2009) e Osorio Filho (2014), demonstrando que a velocidade de germinação é um fator importante para o rápido estabelecimento das culturas, pois a emergência das plântulas é favorecida com o aumento na velocidade de germinação das sementes.

5.6. Avaliação da inoculação de rizóbios na capacidade de promoção de crescimento de plantas de arroz e trigo em casa de vegetação

Os resultados da avaliação de massa da matéria seca da parte aérea do cultivo de arroz após 30 dias são apresentados na Tabela 5. Observa-se que os tratamentos inoculados com os rizóbios não diferiram do tratamento controle sem inoculação com adição de 50% da dose de nitrogênio recomendada quando submetidos ao teste de comparação de médias (Duncan, 10%). Todos os tratamentos inoculados com rizóbios diferiram apenas do tratamento com 100% da dose de nitrogênio recomendada para a cultura de arroz.

O maior índice de eficiência relativa é observado no tratamento inoculado com o rizóbio Ef3, comparado com os demais tratamentos inoculados, com resultado de 29,03%, e três tratamentos inoculados tiveram resultados negativos, Ef6 (-0,56%), Ef4 (-3,50%) e Ef9 (-7,57%), demonstrando que esses rizóbios não promoveram o crescimento de plantas de arroz.

Observando resultados do estudo realizado por Osorio Filho (2014), foram encontrados resultados similares, onde, dependendo da cultivar de arroz utilizada, havia alguns tratamentos inoculados com rizóbios que se destacaram na produção de matéria seca da parte aérea enquanto outros não estimularam o crescimento. O mesmo ocorreu no trabalho de Yanni et. al (2001).

Tabela 6 - Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e índice de eficiência relativa (IER) de plantas de arroz (424RI) em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de *Erythrina falcata*.

Trat. UFRGS	MSPA	MSR	IER
	mg		%
Controle + N*	456 ± 51a**	393 ± 44 a**	100
Ef3	330 ± 75 b	329 ± 93 ab	29,03
Ef11	329 ± 82 b	304 ± 68 bc	28,13
Ef13	319 ± 119 b	265 ± 85 bcd	22,71
Ef12	313 ± 67 b	268 ± 39 abc	19,54
Ef7	300 ± 34 b	297 ± 24 bcd	11,97
Ef6	278 ± 26 b	247 ± 74 bcd	-0,56
Ef4	273 ± 28 b	208 ± 10 d	-3,50
Ef9	266 ± 37 b	237 ± 8 cd	-7,57
Controle N/2*	279 ± 66 b	245 ± 79 bcd	0
CV (%)	20,74	25,25	-

*= Controle + N equivalente a 120 Kg.ha⁻¹ de N e controle N/2 equivalente a 60 Kg.ha⁻¹ de N, **= médias (5 repetições) seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias Duncan (10%), CV= coeficiente de variação.

Em relação ao desenvolvimento das raízes, os tratamentos inoculados com Ef3 e Ef12 não diferiram do tratamento controle com 100% da dose de nitrogênio. Bactérias em geral, e inclusive rizóbios, com efeitos negativos ou nulos para alguns aspectos e cultivos podem ser comuns (BARAZANI & FRIEDMAN, 1999, ANTOUN et al., 1998; HILALI et al., 2001).

A inoculação com os rizóbios Ef4 e Ef13 estimulou o número de perfilhos (Tabela 7). O tratamento controle com adição de 50% da dose de N teve o menor número de perfilhos por planta comparado aos outros tratamentos. Utilizando a cultivar IRGA 424, Osorio Filho et al., (2014), encontrou bactérias capazes de acelerar a germinação de sementes, estimular o crescimento da parte aérea e do sistema radicular e, ainda, aumentar o perfilhamento de plantas de arroz.

Logo a inoculação com rizóbios pode aumentar o número de perfilhos por planta, e conseqüentemente, a produtividade do arroz, pois aumenta o número de panículas produtoras de grãos (Almeida et al., 1998) ou também, manter a produtividade com a diminuição da adubação nitrogenada recomendada. Outra vantagem da capacidade de perfilhamento do arroz é que

com maior número de perfilhos emitidos por planta pode compensar em produtividade caso ocorra baixa densidade de plantas.

Não houve diferença significativa para número de folhas e volume radicular.

Tabela 7- Número de folhas, número de perfilhos e volume de raiz (Vol. Raiz) de plantas de arroz (IRGA 424 RI) em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de *Erythrina falcata*.

Trat. UFRGS	Nº Perfilhos	Nº Folhas	Vol. Raiz cm ³
Controle + N*	5 ± 1 a**	17,8 ± 1 a	5 ± 1,00 a
Ef4	4 ± 1 b	13,8 ± 1 b	3,8 ± 0,84 b
Ef13	4 ± 1 b	13,2 ± 3 b	4,4 ± 0,55 ab
Ef7	3,8 ± 1 bc	14,4 ± 1 b	4,6 ± 0,55 ab
Ef6	3,8 ± 1 bc	13,6 ± 1 b	4 ± 0,71 ab
Ef12	3,8 ± 1 bc	13,4 ± 1 b	4,4 ± 0,55 ab
Ef9	3,8 ± 1 bc	13 ± 2 b	3,8 ± 0,84 b
Ef11	3,6 ± 1 bc	14,4 ± 3 b	4,6 ± 1,14 ab
Ef3	3,6 ± 1 bc	14,2 ± 3 b	5 ± 1,00 a
Controle N/2*	3,2 ± 1 c	12,4 ± 2 b	3,6 ± 0,89 b
CV (%)	15,54	16,32	21,03

*= Controle + N equivalente a 120 Kg.ha⁻¹ de N e controle N/2 equivalente a 60 Kg.ha⁻¹ de N, **= médias (5 repetições) seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de médias Duncan (10%), CV= coeficiente de variação

Pela análise de nitrogênio da parte aérea das plantas de arroz inoculadas com rizóbios (Figura 3), o tratamento inoculado com Ef13 apresentou maior teor de nitrogênio em relação ao tratamento controle que recebeu 50% da dose de nitrogênio recomendada, os demais tratamentos não diferiram do tratamento controle com 50% da dose de N. Mesmo com a grande variabilidade dos dados analisados a inoculação de rizóbios auxilia na absorção de nutrientes, permitindo o melhor aproveitamento do N aplicado, aumentando o acúmulo deste elemento, pois os tratamentos inoculados receberam apenas 50% da dose recomendada.

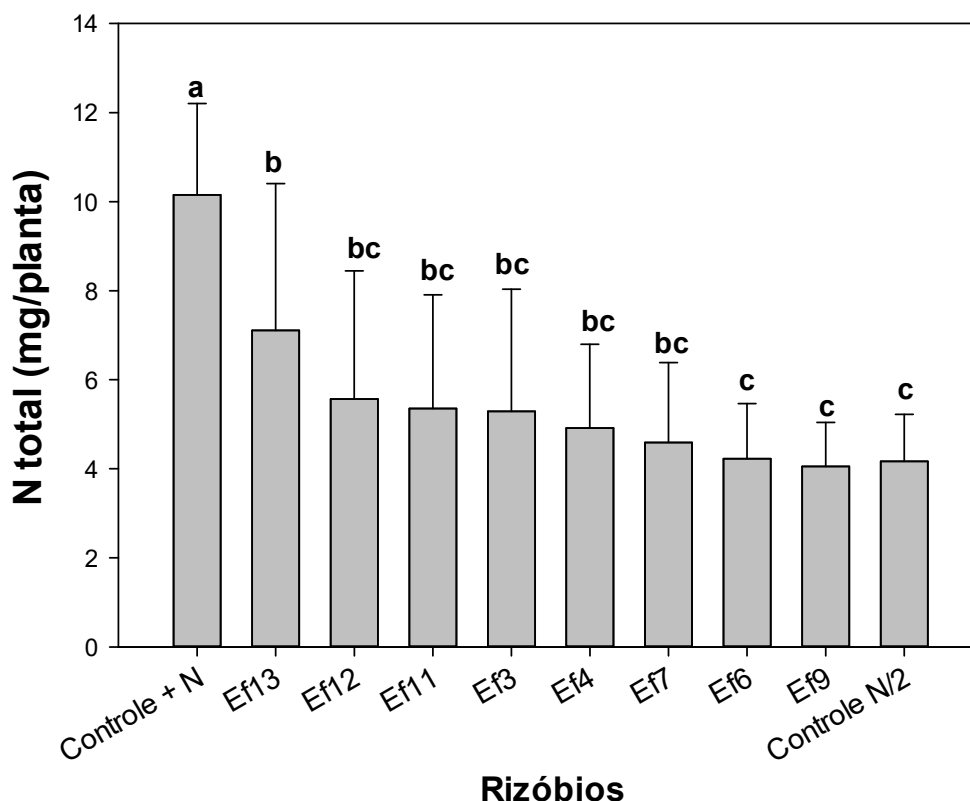


Figura 3 –Nitrogênio total da parte aérea (N total) de arroz inoculadas com isolados de *E. falcata*. Médias (5 repetições) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (10%).

Quando a inoculação com rizóbios tem efeito no aumento da absorção de N, as perdas com a adubação nitrogenada diminuem e também a poluição ambiental. Também resulta na economia desses insumos reduzindo os custos da lavoura, por conta do alto preço dos fertilizantes nitrogenados, aumentando assim a renda agrícola, além de que, a produtividade de grãos seria maior com menos nitrogênio aplicado, pois quando dentro da planta, o nitrogênio é móvel e pode chegar aos grãos.

Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Osorio Filho et al., (2016), em que houve maior absorção e acúmulo de N observada nos tratamentos com inoculação de rizóbios.

Considerando o aumento do número de perfilhos pelos rizóbios Ef4 e Ef13 e do teor de N na folha pelo Ef13, possivelmente a produtividade do arroz e a qualidade de proteína dos grãos de arroz seriam incrementadas. Porém, isso,

de fato, só poderá ser respondido com mais experimentos, onde no futuro, tivesse trabalhos de campo onde o arroz chegasse ao fim do ciclo e produzisse grãos para que se comprovasse que o rizóbio Ef13, simbiote de *Erythrina falcata* promove o crescimento e pode ser utilizado como inoculante de arroz.

Tabela 8- Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), número de folhas, volume de raiz e índice de eficiência relativa (IER) de plantas de trigo em casa de vegetação, inoculadas com rizóbios isolados de *Erythrina falcata*.

Trat.	MSPA	MSR	Nº Folhas	Vol. Raiz
UFRGS	mg			cm ³
Ctrl + N*	175 ± 13 a**	179 ± 22 ab	6 ± 0,0 ab	2 ± 0,0 ab
Ef13	153 ± 13 ab	139 ± 11 b	6 ± 0,0 ab	1,5 ± 0,00 bc
Ef6	152 ± 27 ab	180 ± 84 ab	6 ± 0,0 ab	1,6 ± 0,00 bc
Ef12	145 ± 34 ab	150 ± 29 b	6 ± 0,0 ab	1,5 ± 0,00 bc
Ef7	148 ± 18 ab	255 ± 64 a	7 ± 0,6 a	2,5 ± 0,57a
Ef3	143 ± 38 ab	177 ± 86 ab	6 ± 0,6 ab	1,6 ± 0,57 bc
Ef11	135 ± 30 ab	180 ± 16 ab	6 ± 0,6 ab	1,5 ± 0,57 bc
Ef9	128 ± 10 b	151 ± 30 b	5 ± 0,6 b	1,5 ± 0,57 bc
Ef4	85 ± 27 c	120 ± 86 b	6 ± 0,9 ab	1,1 ± 0,10 c
Ctrl N/2*	158 ± 27 ab	165 ± 30 b	5 ± 0,6 b	1,6 ± 0,57 bc
CV (%)	18,02	32,09	8,51	28,98

*= Controle + N equivalente a 80 Kg.ha⁻¹ de N e controle N/2 equivalente a 40 Kg.ha⁻¹ de N, ns= médias (3 repetições) não significativas quando comparadas pelo teste de comparação de médias Duncan (10%), CV= coeficiente de variação

Na promoção de crescimento realizada com a inoculação de rizóbio em plantas de trigo, os tratamentos com a inoculação de rizóbios, após 30 dias em casa de vegetação, não apresentaram diferença em relação aos controles, para as variáveis analisadas de massa seca da raiz, número de folhas e volume de raiz (Tabela 8). Entretanto, houve diferença na massa seca da parte aérea, onde todos os tratamentos inoculados não diferiram do tratamento controle com 100% da dose de N, exceto Ef4, que apresentou o menor desempenho.

Com esses resultados, pode-se perceber que há variação na interação entre rizóbios isolados de *E. falcata* e plantas de trigo. Em diversos trabalhos encontra-se uma grande variação na interação entre plantas de trigo e diferentes isolados de rizóbios. Após 20 dias em casa de vegetação, Mehboob et al., (2011), observaram que houve promoção de crescimento com a inoculação da maioria dos rizóbios isolados, porém houve estirpes que causaram

efeito deletério para alguns parâmetros. Também, no trabalho Hilali et al., 2001, com algumas estirpes de rizóbios inoculados em trigo incrementaram 24/% de matéria seca, entretanto, outras estirpes tiveram efeito negativo sobre as plantas de trigo.

No trabalho de Afzal e Bano (2008), utilizando estirpes de rizóbio em plantas de trigo, observaram, que a produção de grãos com inoculação não teve incremento em comparação ao tratamento controle não inoculado, mas no estudo de Etesami et al., (2009), houve um aumento na absorção de macronutrientes (N, P e K) nos tratamentos inoculados.

Também, Kaci et al, (2005), obtiveram resultados significantes de promoção de crescimento de trigo com a inoculação de rizóbios, com incremento de 85% de massa seca da parte aérea e 56% de massa seca de raiz em relação ao tratamento não inoculado.

5.7. Caracterização genética dos isolados de corticeira-da-serra

Após a amplificação da região de DNA da porção 16S do ribossomo utilizando os oligonucleotídeos 8F (AGAGTTTGATCCTTGGCTCAG) e 1492R (GCYTACCTTGTT-ACGACTT) (EDWARDS et al., 1989) e do resultado do sequenciamento do DNA, as sequências de DNA dos diferentes isolados foram comparadas com a base de dados do NCBI-BLAST. Pelos resultados identificou-se os isolados em diferentes espécies de rizóbios, pertencentes à Classe Alphaproteobacteria, todas do gênero *Bradyrhizobium*, conhecido pela formação de nódulos radiculares e fixação de nitrogênio em simbiose com leguminosas. A taxa de similaridade das sequências dos isolados obtidos variou de 98% a 100% quando comparadas com as do banco de dados NCBI-BLAST (Tabela 9).

De oito isolados selecionados e utilizados no trabalho o gênero *Bradyrhizobium* foi identificado em cinco amostras, nas demais, dos isolados Ef4, Ef7 e Ef13 ainda não foi possível obter o resultado para identificação por problemas ocorridos no sequenciamento.

O fragmento de 860 pares de bases do fragmento da região 16S de UFRGS Ef3 apresentou 98% de similaridade com *Bradyrhizobium ganzhouense*, descrita recentemente por Lu et al. (2014) por análise de sequências multilocus (MLSA) de nódulos de *Acacia melanoxylon*, na China. Essa espécie,

Bradyrhizobium ganzhouense, também nodula *Acacia aneura*, *Acacia victoriae* e *Acacia implexa* (LU et al., 2014).

Originária do leste da Austrália, a árvore hospedeira do *Bradyrhizobium ganzhouense*, a *Acacia melanoxylon*, foi introduzida no Brasil e no Rio Grande do Sul, há mais de 30 anos, conhecida como "acácia Assis Brasil" ou "acácia negra", cultivada para produção de madeira e tanino (MARCHIORI, 2009). A influência qualitativa e quantitativa sobre a comunidade microbiana da rizosfera se dá pelas diferentes espécies de plantas, bem como genótipos dentro da mesma espécie, por conta das diferenças de seus exsudatos radiculares (RENGEL, 2002), podendo assim, a mudança da microbiota ocorrer em função das diferentes espécies de plantas estabelecidas e introduzidas no local.

Já a análise do fragmento de 970 pb da região 16S do isolado UFRGS EF6, mostra que é possível que esse isolado seja *Bradyrhizobium jicamae* por apresentar 98% de similaridade, com 100% de cobertura dos pares de bases. Essa espécie foi originalmente isolada em Honduras de nódulos de plantas de *Pachyrhizus erosus*, e descrita recentemente por Ramírez-Bahena et al. (2009). A autora também relata que *Bradyrhizobium jicamae* apresentou similaridade de 90,1% com espécie de *Bradyrhizobium elkanii* e 93,8% de similaridade com *Bradyrhizobium pachyrhizi*, que também foi isolado e é simbiote de *Pachyrhizus erosus*. As características morfológicas do isolado do trabalho foram as mesmas descritas do *Bradyrhizobium jicamae*.

A planta hospedeira de *Bradyrhizobium jicamae*, é conhecida como Jacatupé no Brasil e é nativa do sul do México e da região Amazônica, porém já cultivada e bem adaptada em muitos lugares do mundo por sua adaptabilidade climática, e por ser utilizada para consumo (SORENSEN, 1996).

Já o sequenciamento do DNA que codifica a porção 16S ribossomal dos isolados UFRGS Ef9, Ef11 e Ef12 os caracterizam como sendo pertencentes à espécie *Bradyrhizobium elkanii*, com 99%, 100% e 100% de similaridade, respectivamente, com a sequência dessa espécie depositada no GenBank.

A espécie *Bradyrhizobium elkanii* foi originalmente isolada de nódulos de soja e identificada por Kuykendall et al. (1992). Essa espécie encontra-se atualmente como inoculante recomendado pelo MAPA (2011) para diversas culturas anuais e também para leguminosas arbóreas, como *Acacia sp.*, *Erythrina sp.*, *Leucena sp.*, *Enterolobium sp.*, indicando a baixa especificidade e

a ampla faixa de hospedeiros com quem esta espécie de rizóbio pode estabelecer simbiose.

Tradicionalmente, a classificação taxonômica dos rizóbios é baseada nos resultados de especificidade por hospedeiros, análises em meios de cultura da morfologia de colônias, fisiologia do crescimento e reação de pH (ácido/alcalino), resistência intrínseca a antibióticos (PITARD, 2000), porém, foi demonstrado que estirpes de rizóbio de diversos grupos de homologia são capazes de nodular outras leguminosas (CROW et al., 1981), devido a possíveis combinações de material genético (YOUNG et al., 2001; BROUGHTON, 2003; WILLEMS, 2006) e por isso se tem usado a técnica de sequenciamento para contribuir com a identificação da variabilidade de rizóbios existentes.

Tabela 9. Identificação dos isolados de rizóbios pela sequência parcial dos genes 16S rRNA obtida com o programa BLAST.

Isolados	Verossimilhança ⁽¹⁾	Identidade (%) ⁽²⁾	Fragmento ⁽³⁾	GenBank ⁽⁴⁾
UFRGS Ef3	<i>Bradyrhizobium ganzhouense</i>	99	860 pb	gi 959494827 NR_133706.1
UFRGS Ef6	<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	98	970 pb	gi 343202650 NR_043036.1
UFRGS Ef9	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99	960 pb	gi 631251729 NR_112927.1
UFRGS Ef11	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	100	970 pb	gi 631251729 NR_112927.1
UFRGS Ef12	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	100	970 pb	gi 645320835 NR_117947.1

(1)Verossimilhança: organismo que possui a sequência com a qual a sequência parcial do gene 16S rRNA do rizóbio estudado que apresentou maior homologia. (2) Identidade: percentagem de identidade entre a sequência dos isolados estudados e o organismo relacionado. (3) Fragmento: tamanho do fragmento, tamanho da sequência consenso. (4) GenBank, número de acesso da sequência do organismo relacionado.

6.CONCLUSÕES

Rizóbios isolados de *E. falcata* são capazes de solubilizar fosfato tricálcico em meio de cultura e produzir ácido indol-acético em meio de cultura com adição de triptofano. A fixação simbiótica em plantas de corticeira-da-serra pelos rizóbios estudados é ineficiente.

A inoculação com os rizóbios estudados aumenta a velocidade de germinação em sementes de arroz, mas não em sementes de trigo.

Os rizóbios de *E. falcata* estudados, não são capazes de promover o crescimento de plantas de arroz nem aumentar a massa seca da parte aérea, a massa seca da raiz e número de folhas.

A inoculação com os rizóbios Ef13 aumenta a absorção de nitrogênio em plantas de arroz. São necessários mais estudos com o rizóbio Ef13 que foi o que teve melhores resultados tanto em acúmulo de nitrogênio quanto maior número de perfilhos, portanto, tem um grande potencial de ser um inoculante para arroz.

Em plantas de trigo os rizóbios isolados de *E. falcata* não são capazes de promover crescimento.

Todos os rizóbios estudados são pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* com base no sequenciamento de fragmento da região 16S.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os rizóbios isolados da corticeira-da-serra têm interação com as plantas de arroz, porém não produzem nenhum efeito em cultivos de trigo.

Houve um rizóbio isolado de *E. facalta* que obteve melhores resultados em relação à promoção de crescimento de arroz, recomendaria-se um estudo desse rizóbio com outras variedades de arroz o qual pode ter mais eficácia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZAL, A.; BANO, A. *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v. 10, n. 1, p. 85-88, 2008.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 29, n. 1, p. 29-34, 2005.

ALMEIDA, E. E. Caracterização farmacognóstica da espécie *Erythrina falcata* Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 100-105, 2010.

ALMEIDA, M. L. **Modificação do afilhamento de trigo e aveia pela qualidade de luz**. 1998. 121 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

ALVES, J. B. **Seleção de rizóbios para trevo branco**. 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ANTOUN, H. *et al.* Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth-promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanussativus* L.). **Plant Soil**, The Hague, v. 204, p. 57-67, 1998.

ARCAND, M. M.; SCHNEIDER, K. D. Plant and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 78 n. 4, p. 791–807, 2006.

ASGHAR, H. N. *et al.* Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 231-237, 2002.

BARAIBAR, A. *et al.* Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 6, p. 1011-1017, 1999.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, p. 2397-2406, 1999.

BARBERI, A. *et al.* Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no Sul de Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 145-153, 1998.

BAREA, J. M.; NAVARRO, E.; MONTOYA, E. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate solubilizing bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 40, p. 129-134, 1976.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 17, p. 399-406, 1976.

BISWAS, J. C. *et al.* Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, n. 5, p. 880-886, 2000.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 343-350, 2001.

BODDEY, R. M. *et al.* Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, The Hague, v. 174, n. 1, p. 195-209, 1995.

BOIERO, L. *et al.* Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, p. 874-880, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n.13, de 24 de março de 2011. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 25 mar. 2011. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1229256>. Acesso em: 15 set. 2016.

BROCKWELL, J.; HELY, F. W.; NEAL-SMITH, C. A. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, Tamworth, v. 6, n. 23, p. 365-370, 1966.

BROUGHTON, W. J. Roses by other names: taxonomy of the *Rhizobiaceae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 185, p. 2975-2979, 2003.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. v. 1, 1039 p.

CASSAN, F. *et al.* *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E 109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early

seedling growth in corn (*Zea mays* L) and soybean (*Glycine max* L). **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 45, p. 28–35, 2009.

CHAGAS JUNIOR, A. F. *et al.* Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

CHEN, X. *et al.* Modulating DNA bending affects NodD mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, n. 8, p. 2540-2548, 2005.

CHI, F. *et al.* Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, n. 11, p. 7271-7278, 2005.

CHOUDDHURY, A. T. M. A.; KENNEDY, I. R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 39, p. 219-227, 2004.

CONAB - COMPANHIA DE NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Safra 2017/2018: décimo levantamento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, Brasília, DF, v. 10, p. 1-179, jul. 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>. Acesso em: 11 ago. 2016.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 21, p. 1–18, 1995.

CQFS – COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Núcleo Regional Sul, 2004. 400 p.

CROW, V. L.; JARVIS, B. D. W.; GREENWOOD, R. M. Deoxyribonucleic acid homologies among acid-producing strains of *Rhizobium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 31, p. 152-172, 1981.

DAZZO, F. B.; YANNI, Y. G. The natural rhizobium-cereal crop association as an example of plant-bacterial interaction. *In*: UPHOFF, N. *et al.* (ed.). **Biological approaches to sustainable soil systems**. Boca Raton: CRC, 2006. p. 109–127.

DEY, R. *et al.* Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachishypogaea* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, Jena, v. 159, p. 371-394, 2004.

DURIGAN, G.; DIAS, H. C. S. Abundância e diversidade da regeneração natural sob mata ciliar implantada. **Silvicultura**, São Paulo, n. 42, v. 3, p. 308-312, 1990.

DUTTA, S.; MISHRA, A. K.; DILEEP KUMAR, B. K. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 452-461, 2007.

EDWARDS, U. *et al.* Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes characterization of a gene coding for 16S-ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, n. 19, p. 7843-7853, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC334891/>. Acesso em: 19 jun. 2016.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Corticeira-do-seco – *Erythrina falcata* Benth.** Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2004.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2006. 306 p.

ETESAMI, H. *et al.* Effect of superior IAA producing rhizobia on N, P, K uptake by wheat grown under greenhouse condition. **World Applied Sciences Journal**, Faisalabad, v. 6, n. 12, p. 1629-1633, 2009.

FAGAN, E. B. *et al.* Fisiologia da fixaçãobiológica de nitrogênio em soja. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 14, p. 89-106, 2007.

FANGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v. 2, p. 6-16, 1998.

FERGUSON, L.; LESSENGER, J. E. Plant growth regulators. *In*: LESSENGER, J. E. (ed.). **Agricultural medicine**. New York: Springer, 2006. p. 156–166.

FERREIRA, J. S. *et al.* Seleção de veículos para o preparo de inoculante combactérias diazotróficas para arroz inundado. **Agronomia**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 2, p. 6-12, 2003.

FISHER, K.; NEWTON, W. E. Nitrogen fixation: a general overview. *In*: **Nitrogen fixation at the Millennium**. Amsterdam: Elsevier, 2002. p. 1-34.

FRANKENBERGER, W. T. JR.; ARSHAD, M. **Phytohormones in soil**: microbial production and function. New York: Dekker, 1995. 503 p.

FREITAS, J. R. *et al.* Aplicação de matéria orgânica, vermiculita inoculação de *Rhizobium* spp em sementeira de *Erythrina falcata*. **IPEF**, Piracicaba, n. 20, p. 101-113, jun.1980.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J. Bacterial biofertilizers. *In*: SIDDIQUI, Z. A. (ed.). **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 143–172.

GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 68, p. 280-300, 2004.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, London, v. 2012, [art.] ID 963401, [p. 1-15], 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>. Acesso em: 9 out. 2016.

GUIMARÃES, S. L. *et al.* Efeito da inoculação de bactérias diazotrófica endofíticas em arroz de sequeiro. **Agronomia**, Seropédica, v. 37, p. 25-30, 2003.

GUPTA, C.; DUBEY, R.; MAHESHWARI, D. Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v. 35, n. 6, p. 399-405, 2002.

GYANESHWAR, P. *et al.* Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, n. 1, p. 83–93, 2002.

HAHN, L. *et al.* Promoção de crescimento de híbridos de milho inoculados com rizóbios e bactérias diazotróficas associativas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 19, n. 1/2, p. 33-40, 2013.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, S. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e alcalinos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34, n. 2, p. 343-357, 2004.

HERNÁNDEZ, S. *et al.* Evaluation of the genotype-environment interaction in the establishment of *Lotus uliginosus* (Schkuhr) with soil-cores. **Lotus Newsletter**, Columbia, v. 35, n. 1, p. 120-130, 2005.

HILALI, A. *et al.* Effects of inoculation with *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* on wheat cultivated in clover crop rotation agricultural soil in Morocco. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 590- 593, 2001.

IGUAL, J. M. *et al.* Phosphate solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use updated molecular techniques in their study. **Agronomie**, Paris, v. 21, p. 561–568, 2001.

ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. Solubilization of hardlysoluble AIPO₄ with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 27, p. 265-270, 1995.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 197-209, 2000.

KACI, Y. *et al.* Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation

on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 156, p. 522–531, 2005.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 473-480, 2004.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMAD, E. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In: KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (ed.). **Phosphate solubilizing microorganisms**. Cham: Springer, 2014. p. 296.

KOUCHI, H. *et al.* How many peas in a pod? Legumes genes responsible for mutualistic symbioses underground. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 51, n. 9, p. 1381-1397, 2010.

KRUKOFF, A. The american species of *Erythrina*. **Brittonia**, New York, v. 3, n. 2, p. 205-337, 1939.

KUYKENDALL, L. D. *et al.* Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 501– 505, 1992.

LAVELLE, P. Ecological challenges for soil science. **Soil Science**, New Brunswick, v. 165, n. 1, p. 73-86, 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1992. 532 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 1.

LU, J. K. *et al.* *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R. BR. nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 64, p. 1900-1905, 2014. DOI: 10.1099/ijs.0.056564-0. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/260445979_Bradyrhizobium_ganzhouense_sp_nov_effective_symbiotic_bacterium_isolated_from_Acacia_melanoxylon_R_Br_nodules. Acesso em: 3 set. 2016.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination – and in selection for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 394, p. 27-34, 2004.

MARCHIORI, J. C. N. Anatomia de madeira de *Acacia Melanoxylon* R. BR. **Balduinia**, Santa Maria, n. 18, p. 26-32, 2009.

MARRA, L. M. *et al.* Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 357, p. 289–307, 2012.

MEHBOOB, I. *et al.* Growth promoting activities of different *Rhizobium* spp., in wheat. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 43, n. 3, p. 1643-1650, 2011.

MISHRA, R. P. N. *et al.* Rhizobium mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, New York, v. 52, n. 5, p. 383–389, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Tropical legumes: resources for the future**. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1979. 331 p.

NARDOTO, G. B. *et al.* Understanding the influences of spatial patterns on N availability within the Brazilian Amazon Forest. **Ecosystems**, New York, v. 11, n. 8, p. 1234-1246, 2008.

NEVES, T. S. *et al.* Enraizamento de corticeira-da-serra em função do tipo de estaca e variações sazonais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 12, p. 1699-1705, dez. 2006.

OBERTELLO, M. *et al.* Actinorhizal nitrogen fixing nodules: infection process, molecular biology and genomics. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 2, n. 12, p. 528-538, Dec. 2003.

OSORIO FILHO, B. D. *et al.* Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Faisalabad, v. 14, n. 8, p. 707-718, 2014.

OSORIO FILHO, B. D. *et al.* Promoção de crescimento de arroz por rizóbios em diferentes níveis de adubação nitrogenada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 3, p. 478-485, 2016.

PALANIAPPAN, P. *et al.* Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v. 46, n. 8, p. 807-816, 2010.

PANDEY, P. *et al.* Rhizosphere competent *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 produces characteristic siderophore and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). **Current Microbiology**, New York, v. 51, n. 5, p. 303-309, 2005.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 64, p. 180-201, 2000.

PERRINE-WALKER, F. M. *et al.* Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 12, p. 3343-3350, 2007.

PITARD, R. M. **Organização e manutenção da coleção de bactérias diazotróficas do CNPAB – I. Dados referentes ao período de janeiro de 1994 a dezembro de 1999**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 13p. (Embrapa CNPAB. Documentos, 121).

RAMÍREZ-BAHENA, M. H. *et al.* *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 1929-1934, 2009. DOI: 10.1099/ijs.0.006320-0. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/26331479_Bradyrhizobium_pachyrhizi_sp_nov_and_Bradyrhizobium_jicamae_sp_nov_isolated_from_effective_nodules_of_Pachyrhizus_erosus. Acesso em: 9 ago. 2016.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2015. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 2 ago. 2016.

REIS, V. M. *et al.* Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 253-280.

RENGEL, Z. Genetic control of root exudation. **Plant Soil**, The Hague, v. 245, p. 59-70, 2002.

RESH, S. C.; BINKLEY, D.; PARROTA, J. A. Greater soil carbon sequestration under nitrogen-fixing trees compared with *Eucalyptus* species. **Ecosystems**, New York, v. 5, p. 217-231, 2002.

RICHARDSON, A. E. *et al.* Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 321, p. 305–339, 2009.

RIGGS, P. J. *et al.* Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 28, p. 829-836, 2001.

RODRIGUEZ, H. *et al.* Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 287, p. 15–21, 2006.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, n. 4/5, p. 319-339, 1999.

- RONCATO-MACCARI, L. *et al.* Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 39-47, 2003.
- SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. **Summa Phitopathologica**, Piracicaba, v. 1, n. 3, p. 231-234, 1975.
- SCHLINDWEIN, G. *et al.* Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 658-664, 2008.
- SCHRIRE, B. D. Tribo *Phaseoleae*. In: LEWIS, G. *et al.* (ed.). **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. p. 393-431.
- SIDDIQUE, I. *et al.* Dominance of legume trees alters nutrient relations in mixed species forest restoration plantings within seven years. **Biogeochemistry**, The Hague, v. 88, n. 1, p. 89-101, 2008.
- SILVA, F. A. S. **Assistat versão 7.7 beta**. Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande, 2016a.
- SILVA, F. B. **Seleção de rizóbios nativos simbiotes de *Desmodium incanum* e avaliação da promoção de crescimento de gramíneas**. 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016b.
- SINGHA, B.; MAZUMDER, P. B.; PANDEY, P. Characterization of plant growth promoting rhizobia from root nodule of *Crotalaria pallid* grown in Assam. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 15, p. 210-216, 2016.
- SINGH, R. K. *et al.* Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from Rice (*Oryza sativa* L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis. **Current Microbiology**, New York, v. 52, n. 2, p. 117-122, 2006.
- SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B.; NAKAO, P. L. Legume response to rhizobial inoculation in the tropics: myths and realities. In: LAL, R.; SANCHEZ, P.A. (ed.). **Myths and science of soils of the tropics**. Madison: Soil Science Society of America, 1992. p.135-155.
- SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; SILVA, C. A. Matéria orgânica em solos de áreas degradadas. In: SANTOS, G. A. *et al.* (org.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo – Ecossistemas tropicais e sub-tropicais**. 2. ed. Porto Alegre: Metrópole Editora, 2008. v. 1, p. 495-524.
- SOLANO, R. B. *et al.* Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotianaglauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. **Plant and Soil**, The Hague, v. 334, p. 189–197, 2010.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, J. H. **Handbook for rhizobia: methods in legume - Rhizobium technology**. New York: Springer-Verlag, 1994. 450 p.

SORENSEN, M. **Yam bean: *Pachyrhizus D. C.*** Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 141 p.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 31, p. 425–448, 2007.

STAJKOVIC-SRBINOVIC, O. *et al.* Growth and nutrient uptake in oat and barley plants as affected by rhizobacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 19, n. 3, p. 9429-9436, 2014.

STROCHEIN, M. R. D. *et al.* Characterization and influence of alfafa rhizobia in germination and early growth of Rice seedling. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1738-1743, 2011.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artemed, 2004.

TORRES, R. B. *et al.* Espécies florestais nativas para plantio em áreas de brejo. **O Agrônomo**, Campinas, v. 44, n. 1/3, p. 13-16, 1992.

TSAVKELOVA, E. A. *et al.* Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Dordrecht, v. 42, p. 117–126, 2006.

USDA/FAS -UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Grain**: world markets and trade. July, 2016. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2016.

VARGAS, L. K. *et al.* Occurrence of plant growth-promoting traits in clover nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 33, n. 5, p. 1227-1235, 2009.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (ed.). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997. p. 297-360.

VERMA, S. C.; JAGDISH, K. L.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 127-141, 2001.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, p. 571-586, 2003.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p.

WANI, P. A.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. Efeito de metal de crescimento tolerantes planta promoção *Bradyrhizobium sp.* (*Vigna*) sobre o crescimento, simbiose,

produção de sementes e absorção do metal por greengram plantas. **Chemosphere**, Oxford, v. 70, p. 36-45, 2007.

WEBER, M. A.; MIELNICZUK, J. Estoque e disponibilidade de nitrogênio no solo em experimento de longa duração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 429-437, 2009.

WEIR, B. S. The current taxonomy of rhizobia. **NZ Rhizobia** website. Jan. 2011. Disponível em: <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>. Acesso em: 5 out. 2016.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, The Hague, v. 287, p. 3–14, 2006.

XIE, G. T. *et al.* Cultivable heterotrophic N₂-fixing bacterial diversity in rice field in the Yangtze River Plain. **Biology and Fertility Soils**, Berlin, v. 37, p. 29-38, 2003.

YANNI, Y. G. *et al.* Assessment of the natural endophytic association between *Rhizobium* and wheat and its ability to increase wheat production in the Nile delta. **Plant and Soil**, The Hague, v. 407, p. 367-383, 2016. DOI: 10.1007/s11104-016-2895-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-016-2895-0>. Acesso em: 7 jul. 2016.

YANNI, Y. G. *et al.* The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *Trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 28, n. 9, p. 845-870, 2001.

YOUNG, J. M. *et al.* A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all. *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Ames, v. 51, p. 89–103, 2001.

9.APÊNDICES

Apêndice I: **Solução Nutritiva de Sarruge (1975), adaptada***

Composição	Para 1L (sol. estoque)	Para 1L	
Macronutrientes	KH ₂ PO ₄	1M (136,1g)	1mL
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	1M (246,4g)	2mL
	CaCl ₂	1M (111,1g)	5mL
	KCl	1M (74,6g)	5mL
	NH ₄ NO ₃	1M (80g)	1mL
	Fe EDTA	1M	10mL
Micronutriente	H ₃ BO ₃	2,86g	1mL
	ZnCl ₂	0,1g	1mL
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,04g	1mL
	Na ₂ MoO ₄ . 4H ₂ O	0,02g	1mL

(*) retirou-se o MnCl₂.4H₂O, pois o solo do RS possui muito manganês;

- Preparar as soluções estoque de macro e micronutrientes;
- Pipetar os respectivos valores de cada nutriente das soluções estoques em um recipiente com aproximadamente 200 mL de água destilada, exceto NH₄NO₃ (pois é adicionado nitrogênio separadamente da solução nutritiva via aplicações distribuídas ao longo do experimento), completar o volume para 1 litro.
- Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 min;
- Ajustar pH para 6.

Apêndice II: **Meio Levedura Manitol Sólido (LM) (Vincent, 1970)**

Composição	Concentração (g.L ⁻¹)
Manitol	10
K ₂ HPO ₄ (*)	0,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O (*)	0,2
NaCl (*)	0,1
Extrato de levedura	0,5
Ágar	15

Modo de preparo:

- Dissolver o manitol e o extrato de levedura em água destilada;
- Adicionar os sais (*) preparados previamente em solução estoque;
- Ajustar o volume para 1000 mL;
- Para preparar o meio levedura-manitol-vermelho congo (LMV), adicionar 10 mL de vermelho congo (solução de 2,5 g.L⁻¹) em 1 L de meio LM;
- Ajustar o pH em 6,8.
- Para meio de cultura líquido, apenas não adicionar o Ágar.

Apêndice III: **Contagem de unidades formadoras de colônia em placas.**

- Preparar o inóculo em meio de cultura LM, incubar a 28°C sob agitação constante a 120 rpm por seis dias.
- Preparar meio de cultura LMA com adição de vermelho congo e verter em placas previamente esterilizadas.
- Preparar tubos com 9 mL de solução salina 0,85%.
- Inocular 1 mL da cultura bacteriana crescida em um tubo de 9 mL, homogenizar a mistura e retirar um alíquota de 1 mL desse tubo e inocular no próximo tubo com 9 mL de solução salina.
- Realizar essas diluições por 9 vezes.
- O primeiro tubo terá a proporção de 1/10 (1ml de inóculo e 9 mL de solução salina), o segundo de 1/100, o terceiro 1/1000 e assim, sucessivamente.

- Retirar uma alíquota de 1 mL de cada tubo com as misturas homogenizadas e inocular nas placas.
- Incubar a 28°C por seis dias.
- Fazer a contagem de colônias em placas que contém de 15 a 150 colônias.
- O cálculo é realizado com o número de colônias contabilizados na placa x o fator de diluição utilizado na inoculação da placa.