

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

**RIZÓBIOS SIMBIONTES EM TREVO PERSA EFICIENTES NA PROMOÇÃO
DE CRESCIMENTO DE CEREAIS DE INVERNO**

**Bruno Treichel dos Santos
(Dissertação de Mestrado)**

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

**RIZÓBIOS SIMBIONTES EM TREVO PERSA EFICIENTES NA PROMOÇÃO
DE CRESCIMENTO DE CEREAIS DE INVERNO**

Bruno Treichel dos Santos
Engenheiro Agrônomo (Uergs)

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

Porto Alegre (RS) Brasil

Abril de 2022

CIP – Catalogação na Publicação

Treichel, Bruno

RIZÓBIOS SIMBIONTES EM TREVO PERSA EFICIENTES NA
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CEREAIS DE INVERNO / Bruno
Treichel. -- 2022.

54 f.

Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá.

Coorientadora: Anelise Beneduzi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, BR-RS,
2022.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Promoção de
crescimento de plantas. 3. Rizóbios. I. Saccol de Sá,
Enilson Luiz, orient. II. Beneduzi, Anelise,
coorient. III. Título.

BRUNO TREICHEL DOS SANTOS
Engenheiro Agrônomo (UERGS)

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM CIÊNCIA DO SOLO

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo

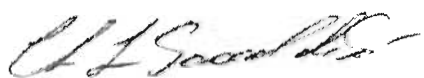
Faculdade de Agronomia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

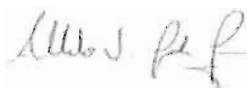
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 29/04/2022
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 08/02/2024
Por



ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ
Orientador-PPG Ciência do Solo



ALBERTO VASCONCELLOS INDA JUNIOR
Coordenador do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência do Solo

Documento assinado digitalmente
gov.br ALEKSANDER WESTPHAL MUNIZ
Data: 15/02/2024 18:52:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

ALEKSANDER WESTPHAL MUNIZ
EMBRAPA Amazônia Ocidental
(MConf UERGS)

Documento assinado digitalmente
gov.br BENJAMIN DIAS OSÓRIO FILHO
Data: 20/02/2024 08:36:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

BENJAMIN DIAS OSÓRIO FILHO
UERGS
(MConf UERGS)



FLÁVIO ANASTÁCIO DE OLIVEIRA CAMARGO
PPG Ciência do Solo/UERGS
(MConf UERGS)

Documento assinado digitalmente
gov.br CARLOS ALBERTO BISSANI
Data: 27/02/2024 17:30:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade
de Agronomia

*" ... mas sei, que plantado num sono de terra
Voltarei um dia destes
A nascer da morte,
Porque a terra,
A terra é o maior de todos os ventres desta vida
Sou semente que chegou no tempo!...
E sou antes mesmo de saber que era...
Hoje que sei, não me permito morrer nunca!..."*

Glênio Fagundes - Cismando

Dedico à minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Autor da Vida, por ter me possibilitado a consciência deste agradecimento.

À minha família, amigos e colegas, pelo amparo em todos os momentos.

Ao meu orientador, pelos ensinamentos e ajuda na evolução como cientista.

Aos professores, servidores e colegas do PPGCS da UFRGS, pelos ensinamentos e ajuda na condução dos experimentos.

Ao Departamento de Solos, pela disponibilização da infraestrutura e equipamentos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

RIZÓBIOS SIMBIONTES EM TREVO PERSA EFICIENTES NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CEREAIS DE INVERNO¹

Autor: Bruno Treichel dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

Co-orientadora: Dra. Anelise Beneduzi da Silveira

RESUMO

Rizóbios são bactérias fixadoras de nitrogênio, simbiontes de leguminosas, capazes de promover o crescimento de gramíneas. O objetivo deste estudo foi selecionar estirpes eficientes na fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas da cultivar BRS Resteveiro de trevo persa (*Trifolium resupinatum* L.) e avaliar seu efeito na promoção de crescimento em trigo duplo propósito, cultivar BRS Tarumã, e triticales, cultivar BRS Saturno. Foram isolados rizóbios de amostras de solo da cidade de Porto Alegre e testados, juntamente com estirpes SEMIA, em plantas de trevo persa cultivadas em casa de vegetação. Foram avaliadas massa seca de parte aérea e raízes, volume de raiz, e número e massa seca de nódulos. Plantas de trigo foram inoculadas com estirpes SEMIA, em casa de vegetação, e avaliadas quanto à altura, número de folhas e perfilhos, volume de raiz, massa seca de parte aérea a raiz. Plantas de triticales foram inoculadas com as bactérias mais promissoras dos experimentos anteriores, sendo avaliados massa seca de parte aérea e raiz e volume de raiz. Para todos, foi calculada a eficiência relativa dos rizóbios na promoção de crescimento. Os rizóbios foram testados quanto à produção de AIA, sideróforos, melanina e solubilização de fosfato tricálcico. No experimento com trevo persa, a estirpe SEMIA 2031 foi a mais eficiente, superando o controle com Nitrogênio em todos os parâmetros analisados. Em trigo, a estirpe 2030 se destacou, igualando-se ao controle N100 nos parâmetros massa seca de raiz e massa seca total. Em triticales, as estirpes 2030 e 2031 se destacaram, igualando-se ao controle N100 em todos os parâmetros. Na caracterização bioquímica, todos os isolados foram capazes de sintetizar AIA, variando entre 0,24 e 0,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sem triptofano, com destaque para Tr 36, 53, 163 e SEMIA 258, e entre 0,5 e 41,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com triptofano, com destaque para Tr 163, SEMIA 254 e 258. Foram capazes de produzir sideróforos as bactérias Tr 53, 163 e SEMIA 254; melanina, SEMIA 254, 2031, 2017, 2013 e 2020; e solubilizar fosfato, Tr 102. Estirpes SEMIA e isolados de rizóbios autóctones foram capazes de induzir nodulação em plantas de trevo persa, cultivar BRS Resteveiro. Apenas as estirpes SEMIA foram eficientes na FBN. Estirpes SEMIA, eficientes na FBN em trevo persa, foram capazes de promover o crescimento de plantas de trigo duplo propósito, cultivar BRS Tarumã, e de triticales, cultivar BRS Saturno.

Palavras-chave: Trigo, Triticales, AIA, sideróforos, solubilização de fosfato.

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, RS. (54p.) Abril, 2022.

PERSIAN CLOVER SYMBIONT RHIZOBIA EFFICIENT IN GROWTH PROMOTION OF WINTER CEREALS¹

Author: Bruno Treichel dos Santos

Adviser: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

Co-adviser: Dr. Anelise Beneduzi da Silveira

ABSTRACT

Rhizobia are nitrogen fixing bacteria, symbionts in legume plants, capable of grasses growth promotion. The aim of this study was to select efficient strains in BNF in plants of the cultivar BRS Resteiveiro of Persian clover (*Trifolium resupinatum* L.) and to evaluate its effect in growth promotion of dual-purpose wheat, cultivar BRS Tarumã, and triticale, cultivar BRS Saturno. Rhizobia were isolated from soil samples from the city of Porto Alegre and tested, altogether with SEMIA strains, in plants of Persian clover cultivated in greenhouse. It was analyzed shoot and root dry weight, root volume, and number and dry weight of nodules. Plants of wheat were inoculated with SEMIA strains, in greenhouse, and evaluated for height, number of leaves and tillers, root volume, shoot and root dry weight. Plants of triticale were inoculated with the best bacteria from prior experiments, being evaluated for shoot and root dry weight and root volume. For all of them, it was calculated the rhizobia relative efficiency, in BNF or growth promotion. The rhizobia were tested for IAA, siderophores, melanin production and phosphate solubilization. In the experiment with Persian clover, the strain SEMIA 2031 was the most effective, overcoming the control +N in all analyzed parameters. In wheat, the strain SEMIA 2030 stood out, matching up the control N100 in the parameters root dry weight and total dry weight. In triticale, the strains SEMIA 2030 and 2031 stood out, matching up the control N100 in all parameters. In the biochemical characterization, all bacteria were able to synthesize IAA, varying between 0,24 e 0,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$, without tryptophan, highlighting Tr 36, 53, 163 and SEMIA 258, and between 0,5 and 41,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with tryptophan, highlighting Tr 163, SEMIA 254 and 258. It was capable of producing siderophore the bacteria Tr 53, 163 e SEMIA 254; melanin, SEMIA 254, 2031, 2017, 2013 e 2020; and to solubilize phosphate, Tr 102. SEMIA strains and autochthone rhizobia isolates were capable to induce nodulation in Persian clover plants, cultivar BRS Resteiveiro. Only SEMIA strains were efficient in BNF. SEMIA strains, efficient in BNF in Persian clover, were capable of promoting the growth of dual-purpose wheat, cultivar BRS Tarumã, and of triticale, cultivar BRS Saturno.

Keywords: Wheat, Triticale, IAA, siderophore, phosphate solubilization.

¹Masters Dissertation in Soil Science. Graduate Program in Soil Science, Faculty of Agronomy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (54p.) April, 2022.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Rizóbios induzem a nodulação em leguminosas	14
2.2 Fixação biológica de nitrogênio	16
2.3 Promoção de crescimento de plantas	17
2.4 Trevo persa (<i>Trifolium resupinatum</i>)	20
2.5 Gramíneas hibernais de duplo propósito	21
3. HIPÓTESE	23
4. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo Geral	24
4.2 Objetivos Específicos	24
5. MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1 Coleta de amostras	25
5.2 Processamento das amostras de solo	25
5.3 Obtenção de nódulos em plântulas de trevo persa crescidas em tubos	26
5.4 Obtenção de nódulos em plântulas de trevo persa cultivadas em casa de vegetação	26
5.5 Obtenção dos isolados de rizóbios	26
5.6 Certificação da capacidade simbiótica das estirpes de rizóbios obtidas	27
5.7 Eficiência simbiótica de rizóbios inoculados em trevo persa	27
5.8 Promoção de crescimento em plantas de trigo duplo propósito inoculadas com rizóbios	29
5.9 Promoção de crescimento em plantas de tritcale inoculadas com rizóbios .	30
5.10 Produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético	31
5.11 Solubilização de fosfato tricálcico	31
5.12 Produção de sideróforos	32

5.13 Produção de melanina	32
5.14 Análise estatística	32
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1 Isolados de rizóbios obtidos de nódulos de trevo persa	34
6.2 Eficiência simbiótica de rizóbios em plantas de trevo persa	35
6.3 Promoção de crescimento em plantas de trigo duplo propósito inoculadas com rizóbios	39
6.4 Promoção de crescimento em triticales inoculadas com rizóbios	41
6.5 Caracterização bioquímica dos rizóbios estudados	43
7. CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48

RELAÇÃO DE TABELAS

- Tabela 1.** Isolados certificados, local de coleta, coordenadas geográficas, vegetação predominante e concentração de bactérias em meio de crescimento.34
- Tabela 2.** Médias da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), volume da raiz (VR), massa seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e índice de eficiência relativa (Efr) de plantas de trevo persa inoculadas com diferentes estirpes de rizóbios.....35
- Tabela 3.** Médias da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST), altura (ALT), número de perfilhos (NPer), folhas (FOL), volume de raiz (VR) e eficiência da promoção de crescimento (Efr) de plantas de trigo duplo propósito inoculadas com diferentes estirpes de rizóbios.40
- Tabela 4.** Médias de massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST), volume de raiz (VR) e eficiência da promoção de crescimento (EFR) de plantas de tritcale.41
- Tabela 5.** Médias da produção de ácido indol acético sem adição de triptofano ao meio de cultura (AIA – C), ácido indol acético com adição de triptofano ao meio de cultura (AIA – T) e análise qualitativa da produção de sideróforos (Sid), solubilização de fosfato (SP) e produção de melanina (Mel).43

RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1.** Eficiência relativa da produção de massa seca da parte aérea por rizóbios indutores de nodulação em trevo persa.....36
- Figura 2.** Eficiência relativa da produção de massa seca da parte aérea de trigo duplo propósito por rizóbios indutores de nodulação em trevo persa.40
- Figura 3.** Eficiência relativa da produção de massa seca da parte aérea de triticales por rizóbios indutores de nodulação em trevo persa.42

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

AIA - Ácido indol-acético
Alt - Altura
Efr - Eficiência relativa
FBN - Fixação biológica de nitrogênio
Fol - Folhas
Mel - Melanina
MSPA - Massa seca de parte aérea
MSR - Massa seca de raiz
MSN - Massa seca de nódulos
MST - Massa seca total
N - Nitrogênio
NN - Número de nódulos
Nod - Fator de nodulação
NPer - Número de perfilhos
P - Fósforo
SP - Solubilização de fosfato
Sid - Sideróforo
VR - Volume de raiz

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos fazem parte da nossa vida cotidiana, desde a microbiota intestinal até a utilização para a produção de alimentos, como bebidas fermentadas, pães, entre outros. Na agricultura não é diferente, sendo o microbioma importante para o solo e para as plantas, principalmente em processos como a síntese e degradação de moléculas e a ciclagem de nutrientes.

Dentre esses micro-organismos do solo, estão os rizóbios, que são bactérias de vida livre que podem se associar com diversas plantas, especialmente com as leguminosas, formando uma simbiose, caracterizada por beneficiar ambos os organismos. Os rizóbios são bactérias fixadoras de nitrogênio e ficam alojados em estruturas radiculares específicas, conhecidas como nódulos, captando o nitrogênio atmosférico e transformando-o em amônia e fornecendo para a planta.

Dentre as plantas leguminosas, está o trevo persa, uma forrageira anual de estação fria, adaptada a solos hidromórficos, como as várzeas do Rio Grande do Sul, onde tradicionalmente cultiva-se arroz no verão. No inverno, essas áreas são deixadas em pousio ou são utilizadas para a engorda de gado bovino, seja em campo de sucessão ou pastagens cultivadas, geralmente com azevém. O trevo persa tem como vantagem a sua adaptação a solos úmidos e a habilidade de associação com os rizóbios. Entretanto, ainda não existe um inoculante comercial com estirpes específicas e eficientes na fixação biológica de nitrogênio para essa espécie, o que limita a sua expansão como leguminosa

forrageira de inverno.

Além das leguminosas, os rizóbios podem se associar com plantas de outras famílias, como as gramíneas, amplamente utilizadas para a produção de grãos e forragem. Esta interação planta - microrganismo ocorre de outra maneira, que não a simbiose, através de uma associação menos específica, geralmente com a colonização endofítica de vasos e tecidos da raiz e da parte aérea. Como os rizóbios não são capazes de fixar o nitrogênio em plantas não-leguminosas, eles atuam promovendo o crescimento vegetal através da síntese de substâncias promotoras de crescimento, como fito hormônios, ou através da solubilização de nutrientes, como no caso do fosfato, entre outras maneiras.

Dentre as plantas pertencentes à família das gramíneas e que podem se beneficiar da associação com os rizóbios, estão o trigo (*Triticum aestivum*) e o triticale (*X. Triticosecale*), muito utilizados principalmente para a produção de grãos e forragem em cultivares de duplo propósito, desenvolvidas para esse fim. O trigo é um cereal amplamente cultivado e utilizado para a alimentação humana e animal. O triticale, por sua vez, é um híbrido do trigo e do centeio, sendo utilizado principalmente para a produção de ração para animais. A inoculação destas culturas com rizóbios pode aumentar a produção de grãos e forragem através de mecanismos que vêm sendo estudados há algumas décadas, com o intuito de aumentar a eficiência da utilização de insumos agrícolas, que estão se tornando escassos e caros, dificultando a produção de todo o tipo de cultivo.

Assim, a utilização de microrganismos que sejam promotores de crescimento e fixadores de nitrogênio, tais como os rizóbios, é de grande importância para viabilizar uma agricultura sustentável e eficiente, através do uso mais racional dos recursos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Rizóbios induzem a nodulação em leguminosas

Os rizóbios são bactérias Gram-negativas capazes de formar simbiose com leguminosas e realizar a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), sendo classificadas em α - e β -proteobactérias. Podem viver de forma livre, no solo; em associação com diversas plantas, de forma endofítica; ou em simbiose com leguminosas, na forma de bacteroides dentro dos nódulos (RAHIMLOU; BAHRAM; TEDERSOO, 2021).

Os rizóbios, quando em simbiose com leguminosas, ficam alojados em estruturas radiculares conhecidas como simbiossomas, no interior dos nódulos, formados pelas plantas em resposta à infecção bacteriana. O processo de nodulação começa com a liberação de flavonóides pelas leguminosas, que induzem a formação de fatores de nodulação (Nod) pelas bactérias (ANDREWS; ANDREWS, 2017; OLDROYD; DOWNIE, 2008). A percepção desses compostos pelos rizóbios se dá pela ligação em ativadores de transcrição (NodD), que provocam o início da síntese de fatores Nod (DOWNIE, 2014). Esses fatores Nod são moléculas de lipoquitooligossacarídeos, específicos de cada espécie de rizóbio, responsáveis pela ativação da resposta da planta à presença dos rizóbios (OLDROYD et al., 2011).

Quando a comunicação bioquímica é positiva, os rizóbios aderem à raiz, multiplicando-se e formando micro colônias sobre a parede celular do pelo radicular, controlado por um mecanismo conhecido como *quorum sensing*, que é uma forma de comunicação e ação conjuntas das bactérias (PÉREZ-

MONTAÑO et al., 2014). Ocorre, na sequência, o encurvamento do pelo radicular, aprisionando os rizóbios e formando um sítio de infecção, que dará origem ao cordão de infecção. Para tal, enzimas são liberadas, tanto por bactérias quanto pela planta, para degradar a parede celular vegetal e permitir a entrada dos rizóbios. A partir daí, o cordão de infecção é formado pela invaginação da parede celular vegetal, criando um tubo que separa os rizóbios da parte interna das células da planta. Ao chegar nas células do córtex, dá-se o início da organogênese do nódulo, quando as bactérias penetram as células vegetais, envoltas pela membrana celular vegetal, que dá origem ao simbiossoma (OLDROYD et al., 2011).

O simbiossoma é formado nas células diferenciadas a partir do córtex radicular, que formam o primórdio do nódulo, através da endocitose dos rizóbios provenientes do cordão de infecção. A partir desse momento, essa nova estrutura é considerada uma nova organela, contendo bactérias diferenciadas em bacteroides, com a função de fixar o nitrogênio atmosférico, em troca de fontes de carbono da planta (WANG et al., 2012).

O N presente no solo ou em solução nutritiva influencia diretamente no desenvolvimento de nódulos exercendo papel inibitório da simbiose, havendo uma correlação direta e inversamente proporcional entre a quantidade de nitrogênio e a quantidade de nódulos produzidos, bem como sua eficiência na FBN. Com a presença do N, há uma sinalização sistêmica para a supressão da nodulação (PERVENT et al., 2021).

Na simbiose entre plantas e micorrizas, compostos conhecidos como estrigolactonas (EL) são secretados pelas raízes, sendo responsáveis pela sinalização e indução da associação entre ambos (SHTARK et al., 2018). Em algumas espécies de leguminosas, esses compostos podem desempenhar a função de sinalizadores para os rizóbios durante o processo de nodulação, além de atuarem na regulação do número de nódulos, desde sua formação até senescência (MCADAM et al., 2017). Em soja, o gene *GmD53a* é responsável pela síntese de enzimas que degradam EL, atuando como um limitador do número de nódulos. Quando o mesmo é inativado, há um aumento considerável no número de nódulos, indicando que o referido gene atua como um antagonista na rota de sinalização para nodulação (REHMAN et al., 2022).

Os hormônios vegetais têm papel importante no processo de nodulação. No caso das citocininas, elas podem ser importantes nas etapas finais da nodulação, ativando fatores de transcrição responsáveis pelos últimos estágios da formação dos nódulos, como o NIN, envolvido na regulação da diferenciação do simbiossoma, e que também atua nos estágios iniciais de nodulação (RUDAYA et al., 2021). O etileno, por sua vez, tem sua via de sinalização ativada durante o processo de nodulação. Os fatores de nodulação, responsáveis pela indução da formação de nódulos, são capazes de reduzir a expressão de genes envolvidos na via de sinalização do etileno. Isso ocorre, pois, esse hormônio está ligado à diminuição de infecções e doenças, sendo necessária sua supressão para que ocorra a simbiose (MUÑOZ et al., 2021).

Todas as etapas da nodulação, desde a liberação de moléculas sinalizadoras até a fixação biológica de nitrogênio, envolvem a expressão gênica e comunicação entre plantas e bactérias. O reconhecimento dessas moléculas, a formação dos nódulos e a FBN dependem da especificidade entre ambos (ANDREWS; ANDREWS, 2017). No caso dos trevos, os rizóbios que induzem a nodulação e a FBN pertencem à espécie *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* (MAUHLIN et al., 2014). Entretanto, para que exista alta eficiência nesse processo, é preciso que haja a interação entre a cultivar da planta e a estirpe correta do rizóbio. Caso contrário, a interação pode ser ineficiente, prejudicando o processo de obtenção do nitrogênio atmosférico (RODRÍGUEZ-NAVARRO et al., 2022).

Além disso, os rizóbios, quando no solo, precisam competir com os demais micro-organismos pela própria sobrevivência, obtendo recursos para se multiplicar e colonizar as raízes das leguminosas, previamente ao processo de infecção e nodulação. Sem essa capacidade competitiva, o processo pode se tornar inviável, traduzindo-se em uma baixa nodulação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

2.2 Fixação biológica de nitrogênio

Durante o processo de FBN, ocorre a quebra da ligação tripla entre as duas moléculas de N, e sua transformação em amônia (NH₃), que é liberada para o citoplasma da célula vegetal, sendo assimilada e enviada para o restante da

planta. Em contrapartida, a planta fornece compostos de carbono e outras substâncias (COBA DE LA PEÑA et al., 2018).

A FBN é realizada por uma enzima conhecida por nitrogenase (GOPALAKRISHNAN et al., 2015), que quebra a ligação tripla do nitrogênio atmosférico, gerando duas moléculas de amônia. No espaço entre o bacteroide e a membrana do simbiossoma, existe uma abundância de íons H^+ , que se ligam à amônia, transformando-a em amônio (NH_4^+). Esse, por sua vez, é transportado para fora do simbiossoma, sendo utilizado pela célula vegetal para a síntese de aminoácidos. Em troca, a planta fornece compostos de carbono, como dicarboxilatos, principalmente malato, que servem como fontes de energia para os bacteroides (BANASIAK et al., 2021).

2.3 Promoção de crescimento de plantas

Em plantas de famílias diferentes das leguminosas, como as gramíneas, os micro-organismos em geral são capazes de colonizar as raízes e a parte aérea, de onde podem adentrar os tecidos vegetais (ALBERTON et al., 2020). Os rizóbios são capazes de infectar plantas por meio de fissuras radiculares, originadas a partir da emissão de pelos radiculares, sendo capazes de colonizar vasos, tecidos e espaços intercelulares, de onde atuam produzindo substâncias promotoras do crescimento vegetal (HAHN et al., 2016).

Com isso, a planta pode tornar-se mais resistente a doenças e ser mais eficiente na utilização dos recursos, como água e nutrientes. No caso das gramíneas, o nutriente mais estudado é o N, sendo que alguns micro-organismos, como *Azospirillum brasiliense*, são capazes de fixá-lo de forma associativa (AGUIRRE et al., 2020). No caso dos rizóbios, eles promovem o crescimento por outros mecanismos, direta ou indiretamente, por meio da produção de substâncias indutoras de crescimento e resistência a patógenos, por exemplo. São capazes de aumentar a eficiência na utilização de nutrientes, principalmente o N, chegando a substituir 50% da dose recomendada para a cultura (SANTOS et al., 2020).

Em leguminosas, a fixação de nitrogênio é, de modo geral, mais eficiente do que em gramíneas, devido à simbiose com os rizóbios, podendo suprir toda a demanda de nitrogênio da planta, além de liberar N na rizosfera, beneficiando

as plantas em consórcio. Em gramíneas, a FBN pode ocorrer de forma associativa, entretanto, é menos eficiente, exigindo que a planta absorva o nutriente do solo (GOYAL; SCHMIDT; HYNES, 2021).

Os rizóbios, quando inoculados em plantas de trigo, são capazes de colonizar a planta endofiticamente, infectando os tecidos principalmente através de fissuras radiculares, de onde se espalham pelo xilema, colonizando o interior da raiz e da parte aérea, produzindo substâncias promotoras de crescimento vegetal (LIU et al., 2017). De forma mais específica, as bactérias são capazes de colonizar o espaço intercelular da epiderme radicular, bem como o interior dessas células e os feixes vasculares da raiz, além da epiderme e feixes vasculares da haste (QIU et al., 2017). A colonização das plantas de trigo por rizóbios envolve diversos microRNA, com regulação positiva e negativa, tanto nas raízes quanto em parte aérea, sendo a expressão dependente do tempo após inoculação. Essa expressão genética é responsável pelo aumento de raízes laterais, perfilhos, germinação, desenvolvimento da plântula, absorção de N (QIU et al., 2017).

Quando analisada a colonização das raízes de plantas de trigo, em comparação com outros gêneros, foi verificada uma maior abundância do gênero *Pseudomonas*, sendo *Rhizobium* o segundo mais abundante. Nas folhas, o gênero mais abundante foi *Bacillus*, sendo *Rhizobium* pouco expressivo nesse caso. Além da interação genotípica, outros fatores envolvidos na abundância, diversidade e riqueza de micro-organismos colonizadores são o estágio fenológico de coleta e a fertilidade/adubação do solo (ROBINSON et al., 2016). No caso de *Rhizobium*, sua abundância nas raízes e nas folhas aumenta com o avanço dos estádios fenológicos. Quanto à fertilidade, o filo α -proteobacteria, do qual o gênero *Rhizobium* faz parte, tem maior abundância em solos com nenhuma adubação, sofrendo redução com a aplicação de adubação orgânica e mineral. Tal efeito pode ser explicado pelo baixo teor de nutrientes disponíveis, que incentiva a interação entre plantas e micro-organismos (ROBINSON et al., 2016).

Plantas de triticale, quando inoculadas com bactérias promotoras de crescimento, são capazes de aumentar a produção de enzimas como catalase, polifenol oxidase e peroxidase, inclusive em condições de estresse hídrico. Situações como essa aumentam a atividade oxidativa nas plantas, geralmente

pela produção de substâncias reativas como oxigênio singleto, entre outras, que são degradadas por enzimas antioxidantes como as citadas acima (KHEIRIZADEH AROUGH et al., 2016; KHEIRIZADEH AROUGH; SEYED SHARIFI; SEYED SHARIFI, 2016).

Dentre os mecanismos de promoção de crescimento, a síntese de AIA é um dos mais estudados, provavelmente o mais relevante, além de ser uma característica comum entre os rizóbios promotores de crescimento (MENÉNDEZ et al., 2020). Nas plantas, essa auxina exerce um papel muito importante, acelerando o crescimento de parte aérea e raízes, bem como a germinação e formação de nódulos em leguminosas (GOPALAKRISHNAN et al., 2015).

A produção de auxinas é maior em meio suplementado com triptofano, pois ele é utilizado como precursor dessa auxina, sendo convertido por diferentes enzimas e rotas, algumas delas já elucidadas. Dentre elas, a rota da indolacetamida envolve a transformação do precursor a indol-3-acetamida, por meio da enzima triptofano monooxigenase, e este a auxina, por meio da enzima indolacetamida hidrolase (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012). Outras rotas envolvem, no mínimo, duas ou mais substâncias intermediárias e, conseqüentemente, mais genes e enzimas mediadoras (TULLIO et al., 2019).

De forma semelhante ao AIA, a solubilização de fosfatos é amplamente estudada. Por sua elevada eletronegatividade, as moléculas de P se ligam aos colóides do solo por meio de complexos de esfera interna, ficando inacessíveis para as plantas. Uma das formas de disponibilizar esse elemento é através da solubilização, por meio da liberação de ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias promotoras de crescimento (MIR et al., 2021).

Os sideróforos, por sua vez, são compostos de baixo peso molecular produzidos por bactérias promotoras de crescimento vegetal, atuando como quelantes de ferro, tornando-os indisponíveis para micro-organismos patogênicos, sendo reabsorvidos pelas bactérias benéficas (DAS; PRASANNA; SAXENA, 2017). Dessa forma, bactérias que produzem sideróforos desempenham um papel fundamental no controle de doenças, principalmente as causadas por micro-organismos do solo (MIR et al., 2021), atuando, assim, como supressores indiretos de crescimento de fitopatógenos na rizosfera (RASOOL et al., 2021).

A melanina, por fim, é um pigmento escuro produzido por meio da enzima tirosinase, classificada como uma monofenol oxidase, tendo a função de proteger a célula de danos causados por luz ultravioleta, espécies reativas de oxigênio e substâncias tóxicas no ambiente, além de servir como uma possível proteção contra reações imunes da planta (PIÑERO et al., 2007).

2.4 Trevo persa (*Trifolium resupinatum*)

O trevo persa é uma leguminosa de estação fria adaptada a solos hidromórficos, mal drenados, conhecidos como terras baixas ou várzeas, comumente cultivados com arroz no verão e deixados em pousio no inverno ou com inserção de gado. Essa leguminosa é uma opção de cultivo em diversos tipos de sistemas agrícolas, pois pode servir como adubação verde, planta de cobertura, palhada para o cultivo do arroz e alimento para o gado (BORTOLINI et al., 2012).

É uma espécie anual, podendo ter porte ereto, caules ocos e grossos, com grandes folíolos (subespécie *majus*), ou porte prostrado, caule fino e pequenos folíolos (subespécie *resupinatum*). Por ser um cultivo de inverno, sua semeadura deve ser realizada entre março e maio, sendo que seu ciclo produtivo ocorre de junho a dezembro. As sementes produzidas são pequenas, apresentando uma média de 0,635 g para cada mil unidades. A cultivar Resteveiro apresenta grande incidência de sementes duras, facilitando a ressemeadura natural e manutenção da pastagem ao longo dos anos (BORTOLINI et al., 2012).

A produção de sementes, tanto em qualidade quanto em quantidade, é diretamente afetada pela disponibilidade hídrica. Sob irrigação, plantas de trevo persa produziram 472 kg ha⁻¹ de sementes, enquanto plantas submetidas a estresse hídrico, com redução da irrigação, produziram apenas 287 kg ha⁻¹ (HAMDOLLAH; ASHRAF, 2017). As áreas de várzea apresentam, geralmente, alta umidade durante o inverno, o que favorece a maior produção de sementes, importante para comercialização, ressemeadura natural e perenização da pastagem.

O trevo persa, assim como outras forrageiras, pode ser produzido em monocultivo ou em consórcio, seja com outras forrageiras, graníferas, frutíferas

ou hortaliças, entre outras. A diversificação tem como fim, entre outros pontos positivos, aumentar a eficiência do uso de nutrientes, principalmente do N, fixado por rizóbios simbiotes. Quando cultivado em consórcio com couve-flor, os rizóbios em simbiose com trevo persa foram capazes de fixar 16 kg ha^{-1} de N, representando 22% do N presente nas folhas do trevo, sendo o restante absorvido do solo, proveniente da matéria orgânica (TEMPESTA et al., 2019).

Em consórcio com trigo, observou-se um crescimento reduzido do trevo, devido ao efeito alelopático da gramínea, que se torna mais competitiva e desenvolve-se de forma mais rápida, garantindo vantagem no aproveitamento dos recursos como espaço, luz e nutrientes. Entretanto, o trigo teve a produtividade reduzida, apesar de ter desenvolvido a mesma quantidade de raízes que em monocultivo (WANIC et al., 2016; WANIC; MYSLIWIEC, 2014). Isso pode ter ocorrido pois o trevo persa também apresenta potencial alelopático, sendo capaz de reduzir o alongamento radicular de espécies como centeio, mostarda, amaranto e corriola (MAIGHANY et al., 2007).

O consórcio de trevo persa com azevém é comum para alimentação do gado, devido à qualidade forrageira de ambas as espécies e a boa adaptação em locais com alta umidade. A produção de matéria seca depende de vários fatores, incluindo altura e intervalo entre pastejos, competição entre espécies, condições climáticas etc. Em um ano agrícola, por exemplo, a produção de trevo persa pode ser de 244 kg ha^{-1} , com o azevém consorciado produzindo 1814 kg ha^{-1} , enquanto, no ano seguinte, o trevo produz 2150 kg ha^{-1} , com o azevém consorciado produzindo $260,7 \text{ kg ha}^{-1}$, indicando uma intercalação produtiva entre ambos (SGANZERLA et al., 2015). Entretanto, a produtividade de trevo persa em cultivo solteiro pode ser de até 12 t ha^{-1} , sendo, nesse caso, obtida a partir de três cortes (BORTOLINI et al., 2012). Quando submetido a pastejo, um corte a 5cm de altura promove uma maior produção de matéria seca em comparação com um corte de 10 cm, sendo o intervalo de desfolha de 38,5 dias o mais recomendando, quando comparado com intervalos menores, permitindo o surgimento de seis folhas (SGANZERLA et al., 2011).

2.5 Gramíneas hibernais de duplo propósito

As gramíneas de inverno são cultivadas para atender diversos

propósitos, principalmente produção de grãos e/ou forragem. Visando a integração dos sistemas de produção agropecuária, cultivares de duplo propósito foram desenvolvidas, capazes de produzir grãos e forragem, na mesma safra. Dentre essas espécies, o trigo e o triticales se destacam por suas características agronômicas/produativas.

O trigo (*Triticum aestivum*) é um dos cereais mais cultivados no mundo, sendo utilizado para alimentação humana e animal. Seu principal uso é o beneficiamento dos grãos para produção de farinha. Além disso, a planta pode ser usada como forrageira, com o cultivo de variedades de duplo propósito, com posterior colheita de grãos.

A variedade BRS Tarumã, utilizada no presente estudo, apresentou, em experimento realizado por Meinerz et al. (2012), produção média de massa de forragem inicial por corte de 3 toneladas, totalizando 9 toneladas em 3 cortes, com massa de forragem residual de 4,5 toneladas.

O triticales (*x Triticosecale*) é um híbrido de trigo com centeio, cultivado para produção de grãos, principalmente para ração, e forragem. No RS, apresentou uma média de produtividade de grãos de 4273 kg, entre os anos de 2003 e 2010 (NASCIMENTO JUNIOR et al., 2011). Quanto à produção de forragem, em estudo conduzido por Meinerz et al (2012), foi verificada uma média de 1856 kg em três cortes, totalizando 5568 kg, com massa de forragem residual de 2787 kg.

3. HIPÓTESE

Os rizóbios eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de trevo persa são capazes de promover o crescimento de gramíneas como o trigo duplo propósito, cultivar BRS Tarumã, e o triticales, cultivar BRS Saturno.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Selecionar estirpes de rizóbios eficientes na FBN em plantas da cultivar BRS Resteveiro de trevo persa (*Trifolium resupinatum* L.) e avaliar seu efeito na promoção de crescimento em trigo duplo propósito, cultivar BRS Tarumã, e triticales, cultivar BRS Saturno.

4.2 Objetivos Específicos

1 – Isolar estirpes de rizóbios a partir dos nódulos de trevo persa inoculados com amostras de solo de diferentes localidades do estado do Rio Grande do Sul;

2 – Avaliar a nodulação e a eficiência na FBN dos isolados de rizóbios em plantas de trevo persa;

3 – Avaliar, em casa de vegetação, as características dos isolados de rizóbios na promoção de crescimento em plantas de trigo duplo propósito, cultivar BRS Tarumã, e triticales, cultivar BRS Saturno;

4 – Caracterizar os isolados de rizóbios quanto à capacidade de produção de substâncias associadas à promoção de crescimento de plantas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta de amostras

As amostras de solo foram coletadas em nove pontos da Estação Experimental Agronômica (EAA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Eldorado do Sul, RS, coordenadas geográficas 30°06'19"S 51°41'26"W, bem como em 17 pontos na Faculdade de Agronomia da UFRGS, em Porto Alegre, RS, coordenadas geográficas 30°04'26"S 51°08'07"W. Deu-se preferência para pontos onde houvesse leguminosas desenvolvendo-se ou gramíneas com crescimento vigoroso. Foram utilizados anéis metálicos (7,5 cm de altura e diâmetro), que foram sendo enterrados completamente e removidos com solo contendo raízes e plantas (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994). As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Solos da UFRGS.

5.2 Processamento das amostras de solo

As amostras de solo coletadas foram destorroadas e a parte aérea e raízes das plantas foram removidas. Em seguida, foram pesados 10 g de solo de cada amostra. As subamostras de 10 g foram acondicionadas em frascos de vidro com 90 mL de água destilada esterilizada. Posteriormente, estas amostras

foram submetidas a agitação constante de 100 rpm durante 1 h com período de decantação de 10 minutos. A seguir, foram retiradas alíquotas de 1 mL do sobrenadante para diluição em frascos contendo 99 mL de água destilada esterilizada. Por último, foi realizada a cinco diluições seriadas.

5.3 Obtenção de nódulos em plântulas de trevo persa crescidas em tubos

As sementes de trevo persa foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado por 15 min e lavadas 7 vezes com água destilada esterilizada. Após, as sementes foram colocadas em folhas de papel toalha embebidas em água esterilizada, enroladas e recobertas com folha de papel alumínio, sendo colocadas em Becker com água destilada esterilizada para pré-germinar em estufa a 28 °C, por dois dias. Após, foram escolhidas as sementes que germinaram e transplantadas para tubos contendo gel semissólido (ágar 7,5 g L⁻¹) com solução nutritiva de Sarruge (1975) esterilizada e sem nitrogênio. Após três dias, as plantas foram inoculadas com alíquotas de 1 mL de cada diluição da suspensão das amostras de solo proveniente da EEA, com 2 repetições, sendo mantidas em lampadário por 30 dias.

5.4 Obtenção de nódulos em plântulas de trevo persa cultivadas em casa de vegetação

As sementes de trevo persa foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado por 15 min e lavadas 7 vezes com água destilada esterilizada. Dez sementes foram dispostas em vasos Leonard com substrato esterilizado, composto de areia e vermiculita (1:2). A base dos vasos foi preenchida com solução Sarruge 50%, sem N. As sementes foram inoculadas com 1 mL das diluições de solo. Durante 30 dias, mantiveram-se em casa de vegetação.

5.5 Obtenção dos isolados de rizóbios

Após 24 dias de cultivo, as plantas foram coletadas, sendo as raízes separadas e lavadas com água corrente para remoção de resíduos do substrato. Em condições assépticas, os nódulos coletados foram lavados com

álcool 70% e com água destilada esterilizada, sete vezes. Os nódulos maiores e mais próximos da coroa da raiz foram destacados com pinça estéril e esmagados em placa de Petri com meio Levedura-Manitol (LM) e corante vermelho-congo, onde se realizou o esgotamento do inóculo em estrias. As placas foram acondicionadas em estufa a 28 °C até o aparecimento de colônias visíveis, com morfologia análoga a de rizóbios (arredondadas, margens suaves, brancas/leitosas/translúcidas), que foram purificadas por repicagem em placas de Petri. As colônias puras foram transferidas para tubos com meio LM sólido, em triplicata, e armazenados sob refrigeração a 4 °C (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994).

5.6 Certificação da capacidade simbiótica das estirpes de rizóbios obtidas

Em casa de vegetação, copos plásticos de 200 mL foram preenchidos com substrato esterilizado de areia e vermiculita (1:2) e irrigados com água destilada esterilizada. As sementes de trevo foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado por 15 min e lavadas sete vezes com água destilada esterilizada, sendo dispostas nos copos com substrato. Cada isolado de rizóbio cresceu durante sete dias em tubo com meio LM, de onde uma alçada de bactérias foi retirada e suspensa em tubos com água, com concentração mínima de 10^7 UFC mL⁻¹. Cada copo foi inoculado com uma alíquota de 2 mL da suspensão bacteriana, contando com três repetições cada e controle com a aplicação apenas de água. As plantas foram irrigadas com solução Sarruge 50%, sem N, semanalmente. Após 30 dias, os trevos foram colhidos, tendo as raízes lavadas em água corrente e a nodulação avaliada através da presença de coloração interior avermelhada, indicando a fixação biológica de nitrogênio e certificando que a bactéria isolada era simbiote em trevo persa (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994).

5.7 Eficiência simbiótica de rizóbios inoculados em trevo persa

A eficiência da fixação biológica de nitrogênio de rizóbios em simbiose com trevo persa foi avaliada em experimento conduzido em casa de vegetação. Vasos Leonard foram preenchidos com areia e vermiculita esterilizadas, na

proporção de 1:2. O substrato foi irrigado com solução Sarruge 100%, sem N, sendo a mesma solução colocada na base do vaso, até completar o volume. Os vasos receberam as sementes de trevo persa escarificadas com ácido sulfúrico concentrado por 15 min e sete lavagens com água destilada esterilizada. As plantas foram inoculadas com 2 mL de suspensão de rizóbios contendo, no mínimo, 10^7 UFC mL⁻¹, sendo utilizados os isolados obtidos denominados Tr 36, 53, 63, 102, 112, 131, 151 e 163. Também foram utilizadas as estirpes SEMIA 239, 248, 258, 2012, 2013, 2017, 2020, 2030 e 2031, de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Agrícola da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande do Sul. Foram utilizados dois controles sem inoculação, sendo um sem aplicação de N (Controle-N) e outro com a aplicação de 24 mg de N por vaso (Controle+N), dividido em oito aplicações semanais de 3 mg, equivalente à dose de 100% de N (80 kg ha⁻¹) (CQFS-RS/SC, 2016)

Semanalmente, foram aplicadas alíquotas de 10 mL de solução nutritiva Sarruge concentrada e 5mL de solução de N no controle 100%, além de reposição da água evapotranspirada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, e cada unidade experimental foi constituída por um vaso contendo duas plantas de trevo persa. Aos 60 dias após a semeadura, as plantas foram coletadas, sendo a parte aérea destacada, as raízes lavadas e os nódulos avaliados quanto ao número (NN). Avaliou-se o volume de raízes frescas medindo-se em proveta de 100 mL com 70 mL de água, sendo o volume de raiz (VR) calculado pela anotação do volume total medido na proveta menos o volume de água inicial de 70 mL. Em seguida, a parte aérea, as raízes e os nódulos foram colocados em estufa, a 65 °C, durante 5 dias, para avaliação da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e massa seca de nódulos (MSN) (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994).

A eficiência simbiótica relativa foi calculada utilizando-se a MSPA aplicada na fórmula proposta por Brockwell et al. (1966):

$$Efr = \frac{Ti - N0}{N100 - N0}$$

Onde:

Efr = eficiência simbiótica;

Ti = Massa seca da parte aérea do tratamento inoculado;

N0 = Massa seca da parte aérea do controle sem N;

N100 = Massa seca da parte aérea do controle com N.

5.8 Promoção de crescimento em plantas de trigo duplo propósito inoculadas com rizóbios

O experimento foi conduzido em casa de vegetação utilizando-se vasos Leonard, contendo na parte superior a mistura de areia e vermiculita (1:2). Os vasos foram esterilizados em autoclave e após, na parte inferior preenchidos com solução Sarruge (1975). As sementes de trigo duplo propósito, cultivar BRS Tarumã, foram desinfestadas com álcool (70%) por 1min, hipoclorito de sódio (2%) por 2 min e lavagens sucessivas, por sete vezes, com água destilada esterilizada. Foram dispostas cinco sementes por vaso que, após a emergência, foram inoculadas com 2 mL do caldo de rizóbios com cerca de 10^7 UFC mL⁻¹. Neste estudo, foram utilizadas as estirpes SEMIA 239, 254, 258, 2012, 2013, 2017, 2020, 2030 e 2031, pois os isolados obtidos neste estudo (Tr) ainda não haviam sido testados em trevo persa. Os controles foram constituídos de plantas sem inoculação, com a adição de 50% (Controle N50) e 100% da dose de N Controle N100). O controle N50 recebeu a dose de 1,5 mg de N em 5 mL de alíquota, aplicada semanalmente durante oito semanas, totalizando 12 mg de N, equivalente a 40 kg ha⁻¹. O controle N100 recebeu a dose de 3 mg de N em 10 mL de alíquota, aplicada semanalmente durante oito semanas, totalizando 24 mg de N, equivalente a 80 kg ha⁻¹ (CQFS-RS/SC, 2016). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, e cada unidade experimental foi constituída por um vaso contendo duas plantas de trigo.

Após 60 dias da emergência, as plantas foram colhidas, sendo a raiz separada e lavada com água corrente para determinação do volume, conforme metodologia supracitada (item 5.7). Foram determinados a altura, número de folhas e perfilhos e massa seca de parte aérea e raízes. A eficiência da promoção de crescimento foi calculada pela fórmula adaptada de Brockwell et al. (1966):

$$Efr = \frac{Ti - N50}{N100 - N50}$$

Onde:

Efr = eficiência relativa;

Ti = tratamento inoculado;

N50 = controle com 50% de N;

N100 = controle com 100% de N.

5.9 Promoção de crescimento em plantas de triticales inoculadas com rizóbios

O experimento foi realizado em casa de vegetação utilizando-se vasos Leonard com substrato esterilizado de areia e vermiculita (1:2). Os vasos foram esterilizados em autoclave e após, na parte inferior preenchidos com solução Sarruge (1975). Sementes de triticales, cultivar BRS Saturno, foram desinfestadas com álcool (70%) por 1 min, hipoclorito de sódio (2%) por 2 min e água destilada esterilizada por sete vezes. Foram colocadas cinco sementes por vaso e, após a emergência, foram inoculadas com 2 mL de suspensão de rizóbios com, no mínimo, 10^7 UFC mL⁻¹. Foram utilizadas as estirpes SEMIA 2030 e SEMIA 2031 e os isolados Tr 112 e Tr 163, selecionados anteriormente devido à eficiência nos testes em trevo, trigo e bioquímicos. Os controles foram constituídos de plantas sem inoculação, com a adição de 50% (Controle N50) e 100% da dose de N (Controle N100). O controle N50 recebeu a dose de 1,5 mg de N em 5 mL de alíquota, aplicada semanalmente durante oito semanas, totalizando 12 mg de N, equivalente a 40 kg ha⁻¹. O controle N100 recebeu a dose de 3 mg de N em 10 mL de alíquota, aplicada semanalmente durante oito semanas, totalizando 24 mg de N, equivalente a 80 kg ha⁻¹ (CQFS-RS/SC, 2016). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, e cada unidade experimental foi constituída por um vaso contendo duas plantas de triticales.

Após 60 dias da emergência, as plantas foram colhidas, sendo a raiz separada e lavada com água corrente para determinação do volume, conforme

metodologia supracitada (item 5.7). Foram determinados massa seca de parte aérea e raízes. A eficiência da promoção de crescimento foi calculada pela fórmula adaptada de Brockwell et al. (1966), conforme citado no item 5.8.

5.10 Produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético

A capacidade dos rizóbios em produzir auxinas foi avaliada utilizando-se o método de Glickmann e Dessaux (1995). Frascos contendo 10 mL de meio LM, com (AIA-T) e sem adição (AIA-C) de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de triptofano, foram inoculados com 0,1 mL de suspensão de rizóbios com, no mínimo, 10^7 UFC mL⁻¹. Os frascos foram incubados em câmara de crescimento a 28 °C, por sete dias, em delineamento totalmente casualizado, com cinco repetições e controles sem inoculação.

Foram retiradas alíquotas de 2 mL do meio, centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min, de onde 1,5 mL do sobrenadante foi retirado e adicionado a 1 mL de reagente de Salkovski (FeCl e H_2SO_4) e deixado para reagir no escuro por 30 min. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 530 nm. A curva para determinação da concentração de auxina foi realizada com meio LM contendo ácido indol-acético sintético, em concentrações de 0, 0,3, 0,5, 1, 3, 9, 13, 17, 25, 50 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

5.11 Solubilização de fosfato tricálcico

Placas de Petri foram utilizadas contendo meio definido constituído por glicose, 10 g L^{-1} , NH_4Cl , 5 g L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g L^{-1} , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 1 g L^{-1} , e ágar, 15 g L^{-1} , com pH ajustado para 6,8. Os isolados de rizóbios foram inoculados com auxílio de alça de platina, em seis pontos equidistantes, sendo incubados em câmara de crescimento a 29 ± 1 °C até o crescimento das colônias e o surgimento de halo translúcido, indicador de solubilização do fosfato. A avaliação foi feita de forma qualitativa, indicando presença ou ausência de atividade solubilizadora (VERMA; JAGDISH; TRIPATHI, 2001).

5.12 Produção de sideróforos

Foram utilizadas placas de Petri contendo o meio King B (Glicerol, 3 g L⁻¹, peptona, 4 g L⁻¹, K₂HPO₄, 0,23 g L⁻¹, MgSO₄.7H₂O, 0,3 g L⁻¹, e ágar, 15 g L⁻¹) com adição do corante cromoazurol S, constituído pela solução 1 (CAS, 0,06 g, e água destilada, 50 mL), solução 2 (FeCl₃.6H₂O, 0,0027 g, e HCl 10 mM, 10 mL) e solução 3 (CTAB, 0,073 g, e água destilada, 40 mL), misturadas nessa ordem. Os isolados de rizóbios foram inoculados e incubados em câmara de crescimento a 29±1 °C até o crescimento e a formação de um halo amarelado, indicando a produção de sideróforos, de acordo com Schwyn e Neilands (1987).

5.13 Produção de melanina

Os isolados de rizóbios foram inoculados em placas de Petri contendo meio triptona-levedura (Triptona, 5 g L⁻¹; extrato de levedura, 3 g L⁻¹; CaCl₂.2H₂O, 1,14 g L⁻¹; ágar, 15 g L⁻¹), suplementado com L-tirosina (600 µg mL⁻¹) e sulfato de cobre (40 µg mL⁻¹), esterilizados com membrana filtrante estéril HV 0,45 µm e adicionados após autoclavagem do meio. Após incubação a 29±1 °C, as colônias foram tratadas com 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (peso/volume) em tampão TBE (tris, 107,81 g L⁻¹, ácido bórico, 55 g L⁻¹, e EDTA, 5,8 g L⁻¹), para a detecção da capacidade de produzir a pigmentação escura nas colônias (CUBO et al., 1988).

5.14 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise da variância (FISHER, 1935) e ao teste de separação de médias de Tukey (1994) (p<0,05). Para análise da variância, foram testadas as pressuposições de normalidade utilizando os testes de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), homoscedasticidade e independência dos resíduos (BROWN; FORSYTHE, 1974). Quando necessário, foi realizada a transformação dos dados (Trevo: MSN e NN – √x. Trigo: FOL e MST – 1/x²; VR e MSR – 1/x. Triticale: MSPA e MST – √x; MSR – 1/√x; VR – log(x)). Os resultados que não atenderam os pressupostos para análise de

variância foram submetidos à análise não paramétrica utilizando os testes de Kruskal-Wallis, Dunn, Wilcoxon-Mann-Whitney e Nemenyi.

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software R Studio®, versão 4.1.0, pacote agricolae (*Statistical Procedures for Agricultural Research*), versão 1.3-5 (DE MENDIBURU DELGADO, 2009).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Isolados de rizóbios obtidos de nódulos de trevo persa

Foram obtidos rizóbios apenas das amostras de solo de Porto Alegre, após certificação da capacidade de formar simbiose com plantas de trevo persa, sendo os isolados de rizóbios certificados, mostrados na Tabela 1, Tr 36, Tr 53, Tr 63, Tr 102, Tr 112, Tr 131, Tr 151 e Tr 163.

Tabela 1. Isolados certificados, local de coleta, coordenadas geográficas, vegetação predominante e concentração de bactérias em meio de crescimento.

Isolado	Vegetação predominante	Concentração (UFC mL ⁻¹)**	Local de coleta	Coordenadas
Tr 36	<i>Desmodium</i> sp.	6,6 x 10 ⁷		
Tr 53	<i>Trifolium repens</i>	4,9 x 10 ⁸		
Tr 63	<i>Arachis pintoii</i>	3,3 x 10 ⁸		
Tr 102	<i>Desmodium</i> sp.	9,9 x 10 ⁷	Fagro-UFRGS,	30°04'26.0"S
Tr 112	<i>T. repens</i>	9,9 x 10 ⁷	Porto Alegre*	51°08'06.7"W
Tr 131	<i>Lotus corniculatus</i>	2,0 x 10 ⁷		
Tr 151	<i>Desmodium</i> sp.	3,3 x 10 ⁷		
Tr 163	<i>Desmodium</i> sp.	1,2 x 10 ⁸		

*Fagro: Faculdade de Agronomia. **UFC: Unidades formadoras de colônia.

Os isolados Tr 53, 63 e 163 apresentaram a maior concentração de UFC mL⁻¹, indicando que crescem de forma mais acelerada que os demais, característica importante para diferenciar as espécies de bactérias.

6.2 Eficiência simbiótica de rizóbios em plantas de trevo persa

De acordo com a Tabela 2, no experimento de avaliação da eficiência simbiótica de rizóbios em plantas de trevo persa, observou-se variação na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), volume da raiz (VR), massa seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e eficiência relativa (Efr).

Tabela 2. Médias da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), volume da raiz (VR), massa seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e índice de eficiência relativa (Efr) de plantas de trevo persa inoculadas com diferentes estirpes de rizóbios.

Tratamentos	MSPA	MSR	VR	MSN	NN
	-----g-----		mL	mg	
Controle+N	1,16 bc ¹	0,57 bc ¹	9,0 bc ¹	0,0 c ²	0 c ²
SEMIA 2031	2,69 a	0,99 a	20,0 a	98,7 a	219 a
SEMIA 2020	2,14 b	0,64 b	13,0 b	66,7 ab	148 ab
SEMIA 2030	1,98 bc	0,56 bc	10,0 bc	77,2 ab	172 ab
SEMIA 239	1,84 bc	0,55 bc	10,4 b	65,7 ab	146 ab
SEMIA 2017	1,47 bc	0,59 b	9,8 bc	81,1 ab	180 ab
Tr 112	0,75 c	0,29 c	5,4 c	57,4 ab	128 ab
SEMIA 2013	0,53 c	0,21 c	3,6 c	38,5 ab	86 ab
Tr 131	0,49 c	0,26 c	5,2 c	55,8 ab	124 ab
Tr 36	0,43 cd	0,18 c	3,0 cd	34,9 ab	78 ab
Tr 53	0,38 cd	0,18 c	3,4 cd	42,8 ab	95 ab
Tr 63	0,22 d	0,10 e	1,4 d	15,3 b	34 b
Tr 163	0,13 e	0,07 e	1,2 d	19,2 b	43 b
SEMIA 258	0,07 ef	0,03 fg	0,5 de	0,0 c	0 c
SEMIA 2012	0,05 f	0,04 f	0,4 e	17,0 b	38 b
SEMIA 254	0,03 fg	0,01 g	0,1 e	0,0 c	0 c
Tr 102	0,03 fg	0,04 f	0,2 e	0,0 c	0 c
Tr 151	0,01 g	0,01 g	0,1 e	0,0 c	0 c
Controle-N	0,03 fg	0,13 d	0,2 e	0,0 c	0 c
CV (%)	131	109	119	93	127

¹médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Wilcoxon (p<0,05). ²médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05).

A estirpe SEMIA 2031 destacou-se das demais em todos os parâmetros analisados, inclusive do controle +N, obtendo um valor médio de eficiência relativa de 235,8% (Figura 1). Foi maior que o segundo tratamento mais eficiente, a estirpe SEMIA 2020, e, conseqüentemente, do controle +N, nos parâmetros MSPA, MSR e VR, indicando ser esse um rizóbio destacadamente eficiente na FBN.

Dos tratamentos utilizados, cinco foram capazes de superar o controle +N na Efr, todos sendo estirpes SEMIA, previamente selecionados como indutores de nodulação em trevo persa. Os demais tratamentos, totalizando 12 estirpes e isolados, tiveram eficiência menor que o controle +N, abaixo de 64%, incluindo o restante das quatro estirpes SEMIA e todos os oito isolados Tr.

Nas condições do presente experimento, as estirpes SEMIA 2031, 2020, 2030, 239 e 2017 foram consideradas eficientes, por apresentarem Efr superior a 100%. O restante dos tratamentos foi considerado ineficiente, pois apresentaram Efr inferior a 70%. Os tratamentos SEMIA 258 e 254, Tr 102 e 151 não foram capazes de induzir nodulação nas plantas de trevo persa. Os tratamentos Tr 112, 131, 36, 53, 63, 163, SEMIA 2013 e 2012, apesar de apresentarem nodulação e fixação em diferentes graus, não foram capazes de atingir valores significativos de Efr para serem considerados eficientes na FBN.

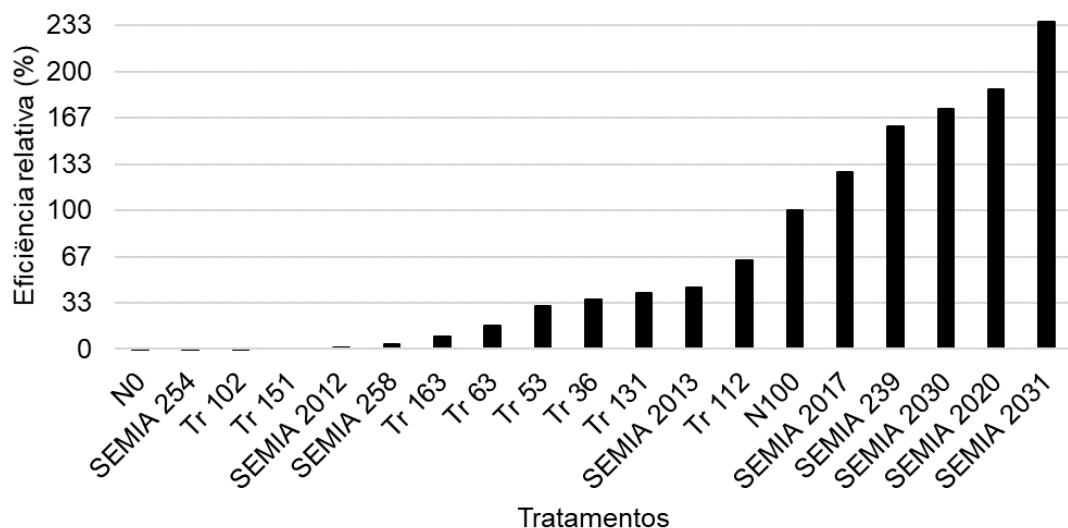


Figura 1. Eficiência relativa da produção de massa seca da parte aérea por rizóbios indutores de nodulação em trevo persa.

Como não foi verificada a presença de nódulos nos controles (-N e +N) não inoculados, atribui-se as diferenças entre os tratamentos às diferentes estirpes SEMIA e isolados (Tr), bem como sua interação com as plantas.

Sendo o trevo persa uma leguminosa forrageira em plena expansão de uso, experimentos de seleção de estirpes de rizóbios eficientes para inoculação em trevo persa são muito relevantes para a agricultura. Vários trabalhos já foram desenvolvidos para outras leguminosas forrageiras, tais como o trevo branco, com eficiência relativa na fixação biológica de nitrogênio de 123%, pelo isolado EA 20, equivalente ao controle +N (110 kg ha⁻¹) (ALVES; SÁ; MUNIZ, 2011). Outros estudos foram realizados com cornichão, com 102,6% de Efr, pelo isolado Lc 5, semelhante ao controle +N (100 mg vaso⁻¹) (MARTINS et al., 2011), e 113,9%, pela estirpe SEMIA 816, não diferindo do controle +N (25 mg vaso⁻¹) (GRANADA et al., 2014); adesmia, 154%, pelo isolado EEL46210 (N, 100 kg ha⁻¹) (MACHADO et al., 2015) e 406%, pelo isolado EEI2399 (N, 63 mg vaso⁻¹) (MUNIZ et al., 2012); e pega-pega, 160%, pelo isolado EEL698, equivalente ao controle +N (25 mg vaso⁻¹) (GRANADA et al., 2014).

No presente estudo, foram utilizadas doses de N de 24 mg vaso⁻¹, equivalente à aplicação de 80 kg ha⁻¹ (CQFS-RS/SC, 2016). Em comparação com as doses utilizadas por Alves et al. (2011), Martins et al. (2011) e Machado et al. (2015), a dose utilizada nesse experimento foi inferior, sendo que doses maiores poderiam induzir maiores produtividades. Entretanto, as doses utilizadas nos experimentos seguiram as recomendações do Manual de Calagem e Adubação (CQFS-RS/SC, 2016), sendo suficientes para expressar seu potencial produtivo.

Estudos de seleção de estirpes para trevo persa foram, de acordo com a literatura consultada, conduzidos somente a campo, com o intuito de selecionar rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio (DENTON et al., 2011; NANGUL et al., 2013; SULAS et al., 2015; TEMPESTA et al., 2019). Avaliando-se a eficiência da FBN por rizóbios, os valores de N proveniente da fixação biológica podem ser menores, como por volta de 20%, devido a fatores como utilização de N presente no solo, que inibe a nodulação, competição com micro-organismos e rizóbios nativos e ineficiência simbiótica (TEMPESTA et al., 2019). Entretanto, é possível que se obtenham valores maiores de eficiência relativa da

FBN, como por volta de 85% em plantas inoculadas, indicando uma maior eficiência simbiótica, suprindo quase toda a necessidade de N da planta. No estudo citado, plantas não inoculadas apresentaram nodulação e fixação de N média de 69%, indicando que os rizóbios nativos não foram tão eficientes quanto as bactérias do inoculante, contribuindo com apenas parte do nutriente necessitado pela planta, proveniente da atmosfera (DENTON et al., 2011).

Em caso semelhante, sementes de trevo persa foram inoculadas com a estirpe WSM 1325 (*Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*), que induziram a nodulação na planta. Entretanto, a análise genética revelou que os nódulos não continham a estirpe de rizóbio do inoculante, indicando que a nodulação ocorreu por bactérias nativas do solo, provavelmente mais competitivas e/ou específicas (NANGUL et al., 2013). A mesma estirpe, testada em local diferente, mostrou variação entre as plantas com e sem inoculação. Para os valores de matéria seca de parte aérea, foram observados aumentos na ordem de mais de duas vezes no tratamento inoculado em relação ao não inoculado. O mesmo ocorreu para os valores de N contido na parte aérea das plantas, indicando que, possivelmente, as bactérias do inoculante foram mais eficientes que as nativas na fixação biológica de nitrogênio, devido a um maior poder competitivo e/ou maior especificidade inoculante/hospedeiro (SULAS et al., 2015).

Alguns fatores estão envolvidos na maior ou menor eficiência simbiótica, como a especificidade entre planta e bactéria, definida por fatores genéticos, além de competição com micro-organismos do solo e rizóbios nativos, viabilidade e dose do inoculante (ANDREWS; ANDREWS, 2017). No presente estudo, o único fator que influenciou os resultados foi a especificidade planta-bactéria, pois o experimento foi conduzido em condições axênicas. Como alguns tratamentos mostraram eficiência superior ao controle +N, considerou-se que esses rizóbios (SEMIA 2031, 2020, 2030, 239 e 2017) apresentaram compatibilidade com essa cultivar de trevo persa com uma alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio.

Dentre os rizóbios testados, apenas as plantas inoculadas com as estirpes SEMIA apresentaram valores de Eficiência relativa acima de 100%. Entre os isolados de rizóbios autóctones, o mais eficiente apresentou valor de apenas 63,7%. Isso indica a existência de população de rizóbios autóctones simbiotes

em treva persa, porém de baixa eficiência na FBN e que a leguminosa não é promíscua na sua relação com as bactérias fixadoras de nitrogênio, uma vez que a eficiência relativa está diretamente ligada com genótipos específicos (ANDREWS; ANDREWS, 2017; WANG et al., 2012).

Essa especificidade, somada à falta de inoculantes comerciais para trevo persa, ressalta a importância da realização de trabalhos de seleção de estirpes de rizóbios eficientes na FBN. Frente à escassez e o alto custo de fertilizantes nitrogenados, faz-se necessária a utilização de tecnologias sustentáveis, capazes de substituir as fontes industriais desses recursos. As leguminosas, como a soja, já contam com inoculantes eficientes, que suprem 100% do N da cultura, devido a décadas de pesquisa e melhoramento, o que deve ser estendido a outras leguminosas, como as forrageiras de verão e inverno.

6.3 Promoção de crescimento em plantas de trigo duplo propósito inoculadas com rizóbios

No experimento de promoção de crescimento de trigo duplo propósito, observou-se variação na MSPA, MSR e massa seca total (MST). De acordo com a tabela 3, a SEMIA 2030 foi capaz de produzir mais MSPA, quando comparada com o controle N50 diferindo estatisticamente com uma eficiência na promoção de crescimento (Efr) de 15,1% (Figura 2).

Quanto aos valores de MSR e MST, a estirpe foi capaz de se igualar ao controle N100, apesar de não diferir do controle N50. A SEMIA 2013 e 2017 também obtiveram valores superiores de MSR quando comparadas ao controle N50 e igualaram-se ao controle N100. Para o parâmetro VR as estirpes SEMIA 239, 2017 e 258 igualaram-se aos controles utilizados.

Resultados semelhantes foram encontrados, em condições axênicas, testando-se *R. leguminosarum* bv. *trifolii* em plantas de trigo, sendo capaz de aumentar a altura das plantas em 17%, volume de raiz em 133% e massa seca de planta em 22%. A campo, a produtividade de grãos é incrementada em torno de 7%, resultado abaixo do encontrado em condições de casa de vegetação (YANNI et al., 2016).

Tabela 3. Médias da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST), altura (ALT), número de perfilhos (NPer), folhas (FOL), volume de raiz (VR) e eficiência da promoção de crescimento (Efr) de plantas de trigo duplo propósito inoculadas com diferentes estirpes de rizóbios.

Tratamentos	MSPA	MSR	MST	ALT	NPer	FOL	VR
	-----g-----			cm			mL
Contr. N100	1,56 a ¹	2,73 a ²	4,28 a ²	32,4 a ³	3,7 a ⁴	21,4 a ⁵	23,7 a ²
SEMIA 2030	0,83 b	1,88 ab	2,71 ab	28,4 b	2,6 b	14,5 b	15,4 b
SEMIA 254	0,80 c	1,55 bc	2,35 b	29,5 b	2,1 b	13,4 b	15,2 b
SEMIA 2020	0,78 c	1,41 bc	2,19 b	27,6 b	2,4 b	14,4 b	14,8 b
SEMIA 2013	0,78 c	1,80 ab	2,58 b	28,2 b	2,1 b	13,9 b	15,4 b
SEMIA 2031	0,78 c	1,29 c	2,07 b	28,0 b	2,3 b	13,6 b	15,4 b
SEMIA 2012	0,77 c	1,69 bc	2,46 b	27,4 b	2,1 b	13,9 b	15,2 b
SEMIA 239	0,76 c	1,69 bc	2,45 b	28,2 b	2,3 b	14,3 b	16,8 ab
SEMIA 2017	0,76 c	1,80 ab	2,56 b	28,0 b	2,2 b	12,9 b	16,6 ab
SEMIA 258	0,74 c	1,66 bc	2,40 b	27,8 b	2,1 b	13,2 b	16,8 ab
Contr. N50	0,70 c	1,76 bc	2,43 b	27,9 b	2,4 b	14,1 b	14,3 b
CV (%)	33,9	23,8	36,3	6,3	26,6	30,7	18,5

¹médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Mann ($p < 0,01$). ²médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,01$). ³médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Dunn ($p < 0,01$). ⁴médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). ⁵médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

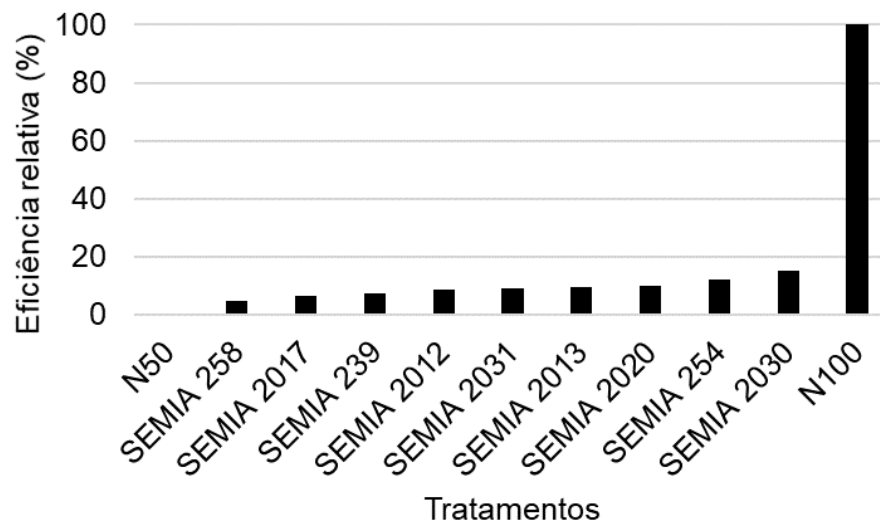


Figura 2. Eficiência relativa da produção de massa seca da parte aérea de trigo duplo propósito por rizóbios indutores de nodulação em trevo persa.

Em experimentos similares, resultados promissores com a utilização de rizóbios como inoculantes para gramíneas vêm sendo observados, como, por exemplo, igualar a produção de grãos de trigo entre tratamentos inoculados com 50% da dose de N e controle com 100% de N (SANTOS et al., 2020). Em teste com *Azorhizobium caulinodans*, a bactéria foi capaz de promover o crescimento de folhas e raízes, aumentando seu comprimento e massa fresca, sendo sua presença endofítica confirmada por meio de proteínas fluorescentes (LIU et al., 2017).

6.4 Promoção de crescimento em triticales inoculadas com rizóbios

No experimento de promoção de crescimento em triticales, foram verificadas diferenças entre os tratamentos nas variáveis MSPA, MSR, MST e VR (Tabela 4). As estirpes mais eficientes, SEMIA 2030 e 2031, foram capazes de promover o crescimento das plantas, com produção semelhante entre si e ao controle N100, com eficiências na promoção de crescimento de 19,6 e 18,9%, respectivamente (Figura 3). O controle N100, por sua vez, diferiu estatisticamente do controle N50 em todos os parâmetros analisados.

Tabela 4. Médias de massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST), volume de raiz (VR) e eficiência da promoção de crescimento (EFR) de plantas de triticales.

Tratamentos	MSPA	MSR	MST	VR
	-----g-----			mL
Controle N100	1,121 a ²	0,504 a ²	1,625 a ¹	5,3 a ¹
SEMIA 2030	0,708 ab	0,336 ab	1,044 ab	3,8 ab
SEMIA 2031	0,704 ab	0,318 ab	1,022 ab	4,0 ab
Tr 163	0,592 b	0,28 ab	0,872 b	3,2 ab
Tr 112	0,444 b	0,228 ab	0,672 b	3,0 ab
Controle N50	0,607 b	0,219 b	0,826 b	2,8 b
CV (%)	22,3	28,0	23,5	36,9

¹médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey ($p < 0,05$). ²médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey ($p < 0,01$).

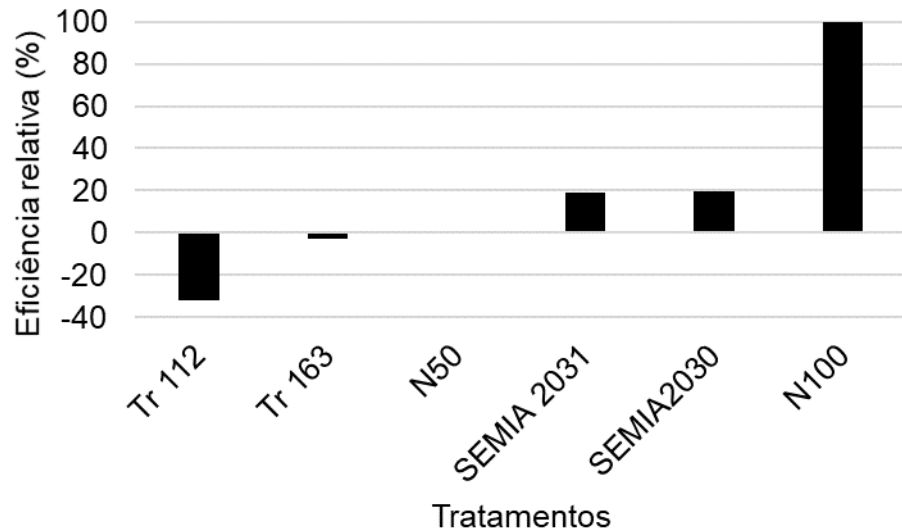


Figura 3. Eficiência relativa da produção de massa seca da parte aérea de tritcale por rizóbios indutores de nodulação em trevo persa.

Em experimento similar, plantas de tritcale, quando inoculadas com rizóbios do gênero *Bradyrhizobium*, apresentaram aumento na MSR, altura de planta, rendimento de grãos, peso de mil sementes e número de grãos por espigas, quando comparado ao controle sem adubação. Quando comparado ao controle adubado, verificou-se aumento no rendimento de grãos (BÉCQUER-GRANADOS et al., 2016).

Em plantas de tritcale inoculadas com a bactéria *Azotobacter chroococcum*, conhecida por promover o crescimento e fixar N em gramíneas, foi verificada promoção de crescimento, igualando o controle N100 nos parâmetros produtividade (N25), MSPA (N50) e altura (N75) (SALAMA; BADRY, 2021). Segundo os autores, esse efeito é causado, além da FBN, pela produção de AIA, hormônio vegetal responsável pelo aumento de raízes; giberelina, que causa o aumento na altura e comprimento de folhas; sideróforos, substâncias quelantes de ferro, indisponibilizando-o para organismos patogênicos, provocando um efeito protetor contra doenças (JNAWALI; OJHA; MARAHATTA, 2015).

6.5 Caracterização bioquímica dos rizóbios estudados

As estirpes de rizóbios foram testadas quanto à produção de AIA, de caráter quantitativo, com e sem a adição de triptofano ao meio de cultura. No tratamento sem a adição de triptofano, destacou-se os isolados Tr 53 (0,98 ug AIA mL⁻¹), Tr 163 (0,89 ug AIA mL⁻¹), Tr 36 (0,80 ug AIA mL⁻¹), e a estirpe SEMIA 258 (0,79 AIA ug mL⁻¹). Com a adição de triptofano ao meio, destacou-se as estirpes SEMIA 254 (41,14 ug mL⁻¹), SEMIA 258 (24,11 ug mL⁻¹), e o isolado Tr163 (10,48 ug mL⁻¹) (Tabela 5).

Tabela 5. Médias da produção de ácido indol acético sem adição de triptofano ao meio de cultura (AIA), ácido indol acético com adição de triptofano ao meio de cultura (AIA – T) e análise qualitativa da produção de sideróforos (Sid), solubilização de fosfato (SP) e produção de melanina (Mel).

Tratamentos	AIA AIA - T		Sid	SP	Mel
	µg mL ⁻¹				
Tr 53	0,98 a ¹	5,89 ab	+	-	-
Tr 163	0,89 a	10,48 a	+	-	-
Tr 36	0,80 a	7,21 ab	-	-	-
SEMIA 258	0,79 a	24,11 a	-	-	-
Tr 112	0,57 ab	3,50 b	-	-	-
SEMIA 254	0,57 ab	41,14 a	+	-	+
SEMIA 2031	0,50 ab	4,67 ab	-	-	+
SEMIA 2017	0,46 ab	8,62 ab	-	-	+
Tr 63	0,45 ab	9,19 ab	-	-	-
SEMIA 2013	0,44 ab	9,98 ab	-	-	+
Tr 131	0,42 ab	2,42 b	-	-	-
Tr 102	0,41 ab	8,55 ab	-	+	-
SEMIA 239	0,38 ab	9,73 ab	-	-	-
SEMIA 2012	0,35 ab	0,50 b	-	-	-
SEMIA 2020	0,31 ab	2,60 b	-	-	+
SEMIA 2030	0,31 b	2,62 b	-	-	-
Tr 151	0,24 b	2,52 b	-	-	-
CV (%)	71,5	90,6	-	-	-

¹médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Nemenyi (p<0,05).

De acordo com a tabela 5, apenas os isolados Tr 53 e Tr 163, e a estirpe SEMIA 254 apresentaram produção de sideróforos. Quanto à solubilização de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), apenas o isolado Tr 102 foi capaz de solubilizar. As estirpes SEMIA 254, SEMIA 2031, SEMIA 2017, SEMIA 2013 e SEMIA 2020 demonstraram atividade de tirosinase, com a respectiva produção do pigmento escuro melanina.

Dentre os rizóbios estudados, a estirpe SEMIA 254 foi a única capaz de, ao mesmo tempo, produzir melanina, sideróforos e AIA, sendo a maior produtora em meio de cultura suplementado com triptofano. Além disso, apresentou promoção de crescimento em trigo duplo propósito muito similar ao tratamento mais eficiente, a estirpe SEMIA 2030, apesar de não ter diferido estatisticamente do controle N50.

Resultados semelhantes foram observados em estudo com rizóbios isolados de *Desmodium incanum*. Quando testados para produção de AIA, seguiram o mesmo padrão apresentado, aumentando a síntese com a presença de triptofano. Na ausência de triptofano, a maior produção foi de 7,67 mg L⁻¹ de AIA. Com a adição de triptofano, a maior produção foi de 62,3 mg L⁻¹ de AIA (SILVA et al., 2020), resultados mais altos do que os obtidos com os isolados de rizóbios testados no presente estudo. Resultado semelhante foi encontrado ao se testar *Rhizobium oryzihabitans* sp.nov., isolado de raiz de arroz, sendo capaz de produzir 85,32 mg L⁻¹ de AIA em meio suplementado com triptofano (ZHAO et al., 2020). *Mesorhizobium* sp., isolado de *Polhillia pallens*, foi capaz de produzir 51,23 mg L⁻¹ de AIA (MPAI et al., 2021).

Em estudo com rizóbios isolados de alfafa, pertencentes à Coleção de Culturas da UFRGS, foi verificada produção de AIA por todas as bactérias, em meio suplementado com triptofano, variando entre 43 e 101,3 mg L⁻¹ (STROSCHEIN et al., 2011), valores que superam em mais de duas vezes os encontrados no presente estudo. Em comparação com esses dados, verifica-se que os isolados de trevo persa, mesmo com a adição de triptofano, produzem quantidades menos expressivas de AIA.

As estirpes de rizóbios mais eficientes na promoção de crescimento de trigo e triticale, SEMIA 2030 e SEMIA 2031, produziram pouca quantidade de

AIA. Mesmo assim, essas quantidades podem ter sido suficientes para promover o crescimento dessas plantas, pois quantidades elevadas podem exercer um papel deletério, causando o efeito contrário. Em plantas de capim sudão, o rizóbio VP16, suplementado com triptofano, foi capaz de aumentar a massa seca de parte aérea, indicando que o AIA foi um dos responsáveis pela promoção de crescimento vegetal (GOULART-MACHADO et al., 2018).

Diversos rizóbios simbiontes em leguminosas de inverno são capazes de produzir sideróforos. Em teste de laboratório, constatou-se, de forma qualitativa, que aproximadamente 39% dos isolados foram capazes de produzir sideróforos (GRANADA et al., 2014), em comparação com apenas 18% dos isolados testados no presente estudo. Seis rizóbios isolados de diversas plantas leguminosas, quando testados quanto à produção de sideróforos, foram, todos eles, capazes de sintetizá-lo (MIR et al., 2021).

A solubilização de fosfato, por sua vez, é um mecanismo estudado há um século, sendo de grande importância para a agricultura, por ser capaz de aumentar a disponibilidade do P complexado nos colóides do solo. Diversos micro-organismos são capazes de realizar tal função, estando os rizóbios nesse grupo. Mir et al. (2021), investigando a capacidade de rizóbios em solubilizar fosfato em meio líquido, encontrou uma variação entre 173 e 552 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P, sendo todos os isolados capazes de realizar a solubilização. Em estudo semelhante ao presente, testando rizóbios de pega-pega em placas de Petri com meio sólido, quatro de nove isolados testados foram capazes de solubilizar fosfato tricálcico, com índices de solubilização variando entre 1,21 e 2,33 (SILVA et al., 2020).

A produção de melanina, por fim, já foi descrita em *R. leguminosarum* bv *trifolii*, bem como em outras espécies de rizóbios (PIÑERO et al., 2007). Em solos cultivados com soja, estirpes de rizóbios foram testadas quanto à produção de melanina, sendo que 57,6% dos isolados foram capazes de produzir o pigmento (THOMAS-OATES et al., 2003).

Tendo em vista a situação atual da agricultura e da oferta de insumos, faz-se necessário o desenvolvimento e uso de tecnologias sustentáveis. Os rizóbios têm papel importante nesse cenário, desempenhando serviços fundamentais

para a sustentabilidade dos sistemas produtivos, como a fixação biológica de nitrogênio e a promoção de crescimento vegetal por diversos mecanismos.

Com os resultados obtidos no presente trabalho, demonstra-se o potencial das bactérias testadas, sendo necessários futuros testes a campo e em laboratório para o desenvolvimento de produtos inoculantes com as estirpes de rizóbios mais eficientes.

7. CONCLUSÕES

As estirpes SEMIA e isolados Tr obtidos de amostras de solo de Porto Alegre foram capazes de induzir nodulação em plantas de trevo persa, cultivar BRS Resteveiro, sendo as estirpes SEMIA as mais eficientes na FBN, com destaque para a SEMIA 2031.

No trigo duplo-propósito, cultivar BRS Tarumã, a SEMIA 2030 foi a mais eficiente, aumentando a massa seca de raiz e a massa seca total.

No triticale, cultivar BRS Saturno, as SEMIA 2030 e 2031 foram as mais eficientes, aumentando a massa seca de parte aérea, massa seca de raiz, massa seca total e volume de raiz

Estas estirpes, SEMIA 2030 e SEMIA 2031, produziram baixas quantidades de AIA, não produziram sideróforos e nem solubilizaram fosfato. Entende-se, com isso, que outras características, além da FBN, não avaliadas neste estudo, podem estar promovendo o crescimento vegetal.

As estirpes de rizóbios que mais produziram AIA com adição de triptofano ao meio foram os isolados SEMIA 258, Tr163 e SEMIA 254, sendo os dois últimos também produtores de sideróforos, além do isolado Tr53. O isolado de rizóbio Tr102 foi o único a solubilizar fosfato, enquanto os produtores de melanina foram a SEMIA, 2031, 2017, 254, 2013 e 2020. A estirpe SEMIA 254 foi a única a ter a característica de produzir AIA, sideróforos e melanina, entre todas as estirpes estudadas.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, P. F. *et al.* Biological nitrogen fixation and urea-N recovery in “coastcross-1” pasture treated with *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, DF, v. 55, [art.] e01242, 2020.
- ALBERTON, D. *et al.* What did we learn from plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)-grass associations studies through proteomic and metabolomic approaches? **Frontiers in Sustainable Food Systems**, Lausanne, v. 4, [art.] 607343, 2020.
- ALVES, J. B.; SÁ, E. L. S.; MUNIZ, A. W. Seleção de rizóbios para o *Trifolium repens* em condições de solo alagado. **Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n. 1, p. 39-45, 2011.
- ANDREWS, M.; ANDREWS, M. E. Specificity in legume-rhizobia symbioses. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 4, [art.] 705, 2017.
- BANASIAK, J. *et al.* A roadmap of plant membrane transporters in arbuscular mycorrhizal and legume–*Rhizobium* symbioses. **Plant Physiology**, Oxford, v. 187, n. 4, p. 2071–2091, 2021.
- BÉCQUER-GRANADOS, C. J. *et al.* Efecto de la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum* en triticale (*X. Triticosecale* Wittmack), en condiciones de estrés por sequía. **Pastos y Forrajes**, Matanzas, v. 39, n. 1, p. 19–26, 2016.
- BIANCO, L. *et al.* Diversity and symbiotic effectiveness of indigenous rhizobia-nodulating *Adesmia bicolor* in soils of central Argentina. **Current Microbiology**, Heidelberg, v. 66, n. 2, p. 174–184, 2013.
- BORTOLINI, F. *et al.* **BRS Resteveiro**: nova cultivar de inverno para solos hidromórficos. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012. 8 p. (Embrapa Clima Temperado, Comunicado Técnico, 291).
- 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**, Melbourne, v. 6, n. 23, p. 365–370, 1966.
- BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. The small sample behavior of some statistics which test the equality of several means. **Technometrics**, Alexandria, VA, v. 16, n. 1, p. 129–132, 1974.
- COBA DE LA PEÑA, T. *et al.* The symbiosome: legume and rhizobia co-evolution toward a nitrogen-fixing organelle? **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, [art.] 2229, 2018.
- CQFS-RS/SC - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO RS/SC. **Manual de calagem e adubação para os estados do Rio Grande do Sul e**

Santa Catarina. 11. ed. Santa Maria: Núcleo Regional Sul da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016.

CUBO, M. T. *et al.* Melanin production by *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 54, p. 1812–1817, 1988.

DAS, K.; PRASANNA, R.; SAXENA, A. K. Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 62, n. 5, p. 425–435, 2017.

DE MENDIBURU DELGADO, F. **Una herramienta de análisis estadístico para la investigación agrícola**. 2009. 303 f. Tesis (Maestría en Ciencias con mención en Ingeniería de Sistemas) - Sección de Posgrado, Facultad de Ingeniería Industrial y de Sistemas, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 2009.

DENTON, M. D. *et al.* Nitrogen fixation in annual *Trifolium* species in alkaline soils as assessed by the ¹⁵N natural abundance method. **Crop & Pasture Science**, Collingwood, v. 62, n. 8, p. 712–720, 2011.

DOWNIE, J. A. Legume nodulation. **Current Biology**, Cambridge, v. 24, n. 5, p. 184–190, 2014.

FISHER, K. A. Statistical tests. **Nature**, London, v. 136, n. 3438, p. 474–474, 1935.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 61, n. 2, p. 793–796, 1995.

GOPALAKRISHNAN, S. *et al.* Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. **3 Biotech**, Berlin, v. 5, n. 4, p. 355–377, 2015.

GOULART-MACHADO, R. *et al.* Inoculation of plant growth promoting rhizobia in Sudan grass (*Sorghum x sudanense* (Piper) Stapf cv. Sudanense) and millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R.Br. cv. BRS1501). **Acta Agronómica**, Palmira, v. 67, n. 1, p. 135–141, 2018.

GOYAL, R. K.; SCHMIDT, M. A.; HYNES, M. F. Molecular biology in the improvement of biological nitrogen fixation by rhizobia and extending the scope to cereals. **Microorganisms**, Basel, v. 9, n. 1, [art.] 125, 2021.

GRANADA, C. E. *et al.* Genetic diversity and symbiotic compatibility among rhizobial strains and *Desmodium incanum* and *Lotus* spp. plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 2, p. 396–405, 2014.

HAHN, L. *et al.* Rhizobial inoculation, alone or coinoculated with *Azospirillum brasilense*, promotes growth of wetland rice. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 40, [art.] e0160006, 2016.

- HAMDOLLAH, E.; ASHRAF, A. A. Effect of partial root-zone irrigation system on seed quality changes of Persian clover (*Trifolium resupinatum* L.) during seed development and maturation. **Acta Agriculturae Slovenica**, Ljubljana, v. 109, n. 2, p. 417–423, 2017.
- JNAWALI, A. J.; OJHA, R. B.; MARAHATTA, S. Evaluation of maize nutrient contents in a maize/cowpea intercropping systems in South Africa. **Advances in Plants & Agriculture Research**, Bartlesville, v. 2, n. 6, p. 250–253, 2015.
- KHEIRIZADEH AROUGH, Y. *et al.* Effect of zinc and bio fertilizers on antioxidant enzymes activity, chlorophyll content, soluble sugars and proline in triticale under salinity condition. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, Cluj-Napoca, v. 44, n. 1, p. 116–124, 2016.
- KHEIRIZADEH AROUGH, Y.; SEYED SHARIFI, Raouf; SEYED SHARIFI, Reza. Bio fertilizers and zinc effects on some physiological parameters of triticale under water-limitation condition. **Journal of Plant Interactions**, London, v. 11, n. 1, p. 167–177, 2016.
- LIU, H. *et al.* The infection and impact of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 on wheat (*Triticum aestivum* L.). **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 11, [art.] e0187947, 2017.
- MACHADO, R. G. *et al.* Isolamento, autenticação e seleção de rizóbios isolados de adesmia. **Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 20, n. 1, p. 14–19, 2015.
- MAIGHANY, F. *et al.* Allelopathic potential of *Trifolium resupinatum* L. (Persian clover) and *Trifolium alexandrinum* L. (Berseem clover). **Weed Biology and Management**, Kyoto, v. 7, n. 3, p. 178–183, 2007.
- MARTINS, A. F. *et al.* Diversidade genética, tolerância aos fatores de acidez e eficiência simbiótica de rizóbios para cornichão de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, n. 6, p. 1855–1864, 2011.
- MAUCHLINE, T. H. *et al.* Assessment of core and accessory genetic variation in *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *trifolii* strains from diverse locations and host plants using PCR-based methods. **Letters in Applied Microbiology**, Cambridge, v. 59, n. 2, p. 238–246, 2014.
- MCADAM, E. L. *et al.* Determining the site of action of strigolactones during nodulation. **Plant Physiology**, Oxford, v. 175, n. 1, p. 529–542, 2017.
- MEINERZ, G. *et al.* Produtividade de cereais de inverno de duplo propósito na depressão central do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 41, n. 4, p. 873–882, 2012.
- MENÉNDEZ, E. *et al.* Plant growth promotion abilities of phylogenetically diverse *Mesorhizobium* strains: effect in the root colonization and development of tomato seedlings. **Microorganisms**, Basel, v. 8, n. 3, [art.] 412, 2020.

MIR, M. I. *et al.* Characterization of rhizobia isolated from leguminous plants and their impact on the growth of ICCV 2 variety of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Heliyon**, London, v. 7, n. 11, [art.] e08321, 2021.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras, MG: Editora UFLA, 2006.

MPAI, T. *et al.* Ecological adaptation and phylogenetic analysis of microsymbionts nodulating *Polhillia*, *Wiborgia* and *Wiborgiella* species in the Cape fynbos, South Africa. **Scientific Reports**, London, v. 11, n. 1, [art.] 23614, 2021.

MUNIZ, A. W. *et al.* Seleção de estirpes de rizóbio para *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vogel. **Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n. 1, p. 177–180, 2012.

MUÑOZ, V. L. *et al.* Role of ethylene in effective establishment of the peanut–bradyrhizobia symbiotic interaction. **Plant Biology**, Berlin, v. 23, n. 6, p. 1141–1148, 2021.

NANGUL, A. *et al.* Nodule occupancy by *Rhizobium leguminosarum* strain WSM1325 following inoculation of four annual *Trifolium* species in Canterbury, New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 56, n. 3, p. 215–223, 2013.

NASCIMENTO JUNIOR, A. *et al.* BRS Saturno – triticales cultivar. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 11, p. 286–288, 2011.

OLDROYD, G. E. D. *et al.* The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 45, n. 1, p. 119–144, 2011.

OLDROYD, G. E. D.; DOWNIE, J. A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, n. 1, p. 519–546, 2008.

ORMEÑO-ORRILLO, E. *et al.* Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, London, v. 13, n. 1, [art.] 735, 2012.

PÉREZ-MONTAÑO, F. *et al.* The symbiotic biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12, necessary for successful colonization and symbiosis of *Glycine max* cv Osumi, is regulated by quorum sensing systems and inducing flavonoids via NodD1. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 8, [art.] e105901, 2014.

PERVENT, M. *et al.* Systemic control of nodule formation by plant nitrogen demand requires autoregulation-dependent and independent mechanisms. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 72, n. 22, p. 7942–7956, 2021.

PIÑERO, S. *et al.* Tyrosinase from *Rhizobium etli* is involved in nodulation efficiency and symbiosis-associated stress resistance. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Basel, v. 13, n. 1/3, p. 35–44, 2007.

QIU, L. *et al.* Migration of endophytic diazotroph *Azorhizobium caulinodans* ORS571 inside wheat (*Triticum aestivum* L.) and its effect on microRNAs. **Functional and Integrative Genomics**, Heidelberg, v. 17, n. 2/3, p. 311–319, 2017.

RAHIMLOU, S.; BAHRAM, M.; TEDERSOO, L. Phylogenomics reveals the evolution of root nodulating alpha- and beta-Proteobacteria (rhizobia). **Microbiological Research**, Munich, v. 250, [art.] 126788, 2021.

RASOOL, A. *et al.* Plant growth promoting and antifungal asset of indigenous rhizobacteria secluded from saffron (*Crocus sativus* L.) rhizosphere. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 150, [art.] 104734, 2021.

REHMAN, N. *et al.* Knockdown of GmD53a confers strigolactones mediated rhizobia interaction and promotes nodulation in soybean. **PeerJ**, London, v. 10, [art.] e12815, 2022.

ROBINSON, R. J. *et al.* Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. **Plant and Soil**, The Hague, v. 405, n. 1/2, p. 381–396, 2016.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. *et al.* Selection and characterization of Spanish *Trifolium*-nodulating rhizobia for pasture inoculation. **Systematic and Applied Microbiology**, Munich, v. 45, n. 2, [art.] 126290, 2022.

RUDAYA, E. S. *et al.* Regulation of the later stages of nodulation stimulated by IPD3/CYCLOPS transcription factor and cytokinin in pea *Pisum sativum* L. **Plants**, Basel, v. 11, n. 1, [art.] 56, 2021.

SALAMA, H. S. A.; BADRY, H. H. Forage and grain yields of dual-purpose triticale as influenced by the integrated use of *Azotobacter chroococcum* and mineral nitrogen fertilizer. **Italian Journal of Agronomy**, Pavia, v. 16, n. 2, [art.] 1719, 2021.

SANTOS, F. L. *et al.* Reduction in nitrogen fertilization in *Triticum* sp. inoculated and co-inoculated. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 15, n. 2, [art.] e7273, 2020.

SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 1, p. 231–233, 1975.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 160, p. 47–56, 1987.

- SGANZERLA, D. C. *et al.* Características produtivas da consorciação de trevo-persa e azevém submetidos a pastejo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 1, p. 173–180, 2015.
- SGANZERLA, D. C. *et al.* Manejo da desfolha de duas variedades de trevo-persa cultivadas em solo hidromórfico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, n. 12, p. 2699–2705, 2011.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Oxford, v. 52, n. 3/4, p. 591–611, 1965.
- SHTARK, O. Y. *et al.* Strigolactones as regulators of symbiotrophy of plants and microorganisms. **Russian Journal of Plant Physiology**, Heidelberg, v. 65, n. 2, p. 151–167, 2018.
- SILVA, F. B. *et al.* Native rhizobia from southern Brazilian grassland promote the growth of grasses. **Rhizosphere**, Amsterdam, v. 16, [art.] 100240, 2020.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology**. New York: Springer-Verlag, 1994.
- STROSCHEIN, M. R. D. *et al.* Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1738–1743, 2011a.
- STROSCHEIN, M. R. D. *et al.* Seleção a campo de rizóbios nativos para cornichão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1769–1772, 2011b.
- SULAS, L. *et al.* The effect of inoculation on growth, nodulation and nitrogen in annual clover cultivars grown at two mediterranean locations of Sardinia, Italy. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, Cluj-Napoca, v. 43, n. 1, p. 165–172, 2015.
- TEMPESTA, M. *et al.* Potential nitrogen contribution from symbiotic fixation of dwarf pea (*Pisum sativum*) and clover (*Trifolium resupinatum*) in crop rotation and intercropping systems. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1242, p. 261–266, 2019.
- THOMAS-OATES, J. *et al.* A catalogue of molecular, physiological and symbiotic properties of soybean-nodulating rhizobial strains from different soybean cropping areas of China. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 26, p. 453–465, 2003.
- TUKEY, J. W. The problem of multiple comparisons. *In*: BRAUN, H. L. (org.). **The collected works of John W. Tukey: multiple comparisons, 1948-1983**. New York: Chapman & Hall/CRC, 1994. v. 8, p. 1-300.
- TULLIO, L. D. *et al.* Revealing the roles of y4wF and tidC genes in *Rhizobium tropici* CIAT 899: biosynthesis of indolic compounds and impact on symbiotic properties. **Archives of Microbiology**, New York, v. 201, n. 2, p. 171–183, 2019.

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.

WANG, D. *et al.* Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. **Cellular Microbiology**, Hoboken, v. 14, n. 3, p. 334–342, 2012.

WANIC, M. *et al.* Interactions between spring wheat (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare* L.) and undersown Persian clover (*Trifolium resupinatum* L.) depending on growth stage and plant density. **Acta Agrobotanica**, Varsóvia, v. 69, n. 1, [art.] 1655, 2016.

WANIC, M.; MYSLIWIEC, M. Changes in spring wheat (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare* L.) and persian clover (*Trifolium resupinatum* L.) biomass under the influence of plant competition and density. **Acta Agrobotanica**, Varsóvia, v. 67, n. 4, p. 125–134, 2014.

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, n. 1/2, p. 367–383, 2016.

ZHAO, J. *et al.* Isolation, identification and characterization of endophytic bacterium *Rhizobium oryzihabitans* sp. Nov., from rice root with biotechnological potential in agriculture. **Microorganisms**, Basel, v. 8, n. 4, [art.] 608, 2020.