

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

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS POR  
RIZÓBIOS ISOLADOS DE *Lotus corniculatus***

Rafael Goulart Machado  
Dissertação

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

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS POR  
RIZÓBIOS ISOLADOS DE *Lotus corniculatus***

Rafael Goulart Machado  
Engenheiro-Agrônomo (UFSM)

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

Porto Alegre (RS) Brasil  
Março de 2011

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO  
Biblioteca Setorial da Faculdade de Agronomia da UFRGS

RAFAEL GOULART MACHADO  
Engenheiro Agrônomo (UFSM)

## **DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos  
para a 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

Aprovada em:  
Pela Banca Examinadora

Homologado em:  
Por

ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ  
Professor Orientador  
PPG-Ciência do Solo/UFRGS

FLÁVIO OLIVEIRA CAMARGO  
Coordenador do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência do Solo

ADRIANA GIONGO  
University of Florida

BENJAMIN DIAS OSÓRIO FILHO  
UERGS

PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de Agronomia

FLÁVIO OLIVEIRA CAMARGO  
PPG-Ciência do Solo/UFRGS

*Aos meus pais Jorge Rigoberto e Fátima, dedico.*

“Aprender sem pensar é esforço vão; pensar sem nada aprender é nocivo.”

*Confúcio*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pela força que me concede todos os dias, essencial na luta por meus objetivos.

Agradeço a meus pais Jorge Rigoberto Aguiar Machado e Teresinha de Fátima Goulart Machado, por serem modelos nos quais me baseei para ser quem sou hoje. Pelo apoio incondicional em todas minhas decisões e pelo amor que sempre me dedicaram. À minha irmã Raquel de Cássia Goulart Machado, pela amizade, carinho, amor e momentos de descontração.

À minha noiva Rosinara da Silva Costa por ser tão amável, e por ter abraçado sem restrições nosso projeto de vida. Agradeço pela confiança, paciência e compreensão em todos os momentos em que não pude estar presente.

Especialmente ao meu orientador, professor Enilson L. Saccol de Sá, por ser um professor exemplar, pela oportunidade que me concedeu de realizar este trabalho, pelos valiosos ensinamentos relacionados ou não aos estudos, e pela amizade.

À tia Heloísa G. de Andrade e minhas avós Noemy Aguiar Machado e Áurea da Silva Goulart, pelas suas orações e pensamentos positivos.

Ao colega Renan Costa Beber Vieira pela amizade e conversas técnicas sempre proveitosas e algumas vezes descontraídas, momentos que vêm desde o tempo de faculdade.

Aos pesquisadores Benjamin Osório Filho pelo apoio no início deste trabalho e Adriana Giongo pela valiosa colaboração na análise genética dos rizóbios estudados.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo: Leandro Hahn, Marcos Stroschein, Gleidson Rieff, Manuela Bruxel, Raquel Damasceno, Neemias Santos, André Nunes, Andréia Binz, Daniele Rodrigues, Rafael Lima, Thaís Cabral e Abel da Silva pela amizade e momentos de estudo e descontração. Ao Químico e laboratorista Márcio Silveira pelos ensinamentos e amizade.

Ao CNPq pela bolsa de Mestrado.

A todos meus professores e colegas, os quais cada um com sua parcela contribuíram para minha formação profissional e cívica. A todos meus outros amigos e familiares, muito obrigado.

# PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS POR RIZÓBIOS ISOLADOS DE *Lotus corniculatus*<sup>1/</sup>

Autor: Rafael Goulart Machado

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

## RESUMO

Recentes estudos têm mostrado que os rizóbios podem colonizar raízes, caules e folhas de gramíneas, promovendo o crescimento da planta. A produção de fito-hormônios, principalmente ácido indol acético (AIA) é, possivelmente, o principal mecanismo de promoção de crescimento de gramíneas por rizóbios. O objetivo do trabalho foi quantificar a produção de AIA por rizóbios e avaliar o efeito da inoculação destes rizóbios na germinação e no crescimento vegetal de azevém, braquiária, capim Tanzânia e pensacola. Foram estudados sete rizóbios nativos de solos do Rio Grande do Sul, isolados de nódulos de *Lotus corniculatus* e a estirpe SEMIA816, recomendada para *L. corniculatus*. Para quantificação da produção de AIA, os rizóbios foram cultivados em meio levedura-manitol (LM), com e sem adição de triptofano. Foram conduzidos experimentos em laboratório e em casa de vegetação, para se avaliar a capacidade das bactérias em promover crescimento vegetal. Todos os rizóbios testados foram capazes de produzir AIA. Todos os rizóbios foram capazes de promover crescimento vegetal em ao menos uma das gramíneas estudadas. Em laboratório, a germinação do azevém foi antecipada em todos os tratamentos inoculados. O capim Tanzânia e pensacola foram as espécies mais responsivas à inoculação com os rizóbios estudados nos experimentos em casa de vegetação, parecendo haver certa compatibilidade na interação gramínea/rizóbio. Há baixa similaridade genética entre os rizóbios estudados, os quais pertencem aos gêneros *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium*.

<sup>1/</sup> 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. (58p.). Março, 2011. Trabalho realizado com apoio financeiro do CNPq e Projeto LOTASSA.

# GROWTH PROMOTING IN FORAGE GRASSES BY RHIZOBIA ISOLATED FROM *Lotus corniculatus*<sup>1/</sup>

Author: Rafael Goulart Machado

Adviser: Enilson Luiz Saccol de Sá

## ABSTRACT

Recent studies have shown that rhizobia can colonize roots, stems and leaves of grasses, promoting plant growth. The production of phyto-hormones, mainly indole acetic acid (IAA) is possibly the main mechanism of growth promotion of grasses by rhizobia. The objective of this work was to quantify the production of IAA by rhizobia, and evaluate the effect of rhizobia inoculation on germination and plant growth of ryegrass, *Brachiaria*, Tanzânia grass and Pensacola. In this work were studied seven rhizobia native from Rio Grande do Sul soils, isolated from nodules of *Lotus corniculatus* and the strain SEMIA816 recommended for *L. corniculatus*. To quantify the production of IAA, the strains were cultured in yeast-mannitol (LM) medium, with and without tryptophan addition. Experiments were carried out in laboratory and under greenhouse conditions to evaluate the capacity of these bacteria to promote plant growth promotion. All rhizobia tested were able to produce IAA. All strains were able to promote plant growth in at least one of the grasses studied. In laboratory conditions, the ryegrass seed germination was anticipated in all inoculated treatments. Tanzania and pensacola grasses were the most responsive to rhizobial inoculation in greenhouse experiments, there appears to be certain specificity in interaction graminea / rhizobia. There is low genetic similarity between the rhizobia studied, which belong to the genera *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium*.

<sup>1/</sup> M. Sc. dissertation in Soil Science. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (58 p.). March 2011. Financial support by CNPq and LOTASSA Project.



## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. ....</b>	<b>3</b>
2.1 Mecanismos de promoção de crescimento de plantas .....	3
2.1.1. Produção de substâncias fitoestimuladoras por rizóbios .....	4
2.2. Colonização de gramíneas por rizóbios .....	9
2.3. Os rizóbios em sistemas de rotação/consorciação de pastagens ...	11
2.4. Azevém .....	13
2.5. Braquiária .....	13
2.6. Capim Tanzânia .....	14
2.7. Pensacola .....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1. Caracterização fenotípica dos rizóbios estudados .....	16
3.2. Quantificação da produção de Ácido Indol-acético (AIA) .....	18
3.3. Teste de germinação .....	19
3.4. Promoção de crescimento vegetal .....	20
3.5. Caracterização do DNA genômico dos rizóbios .....	23
3.6. Sequenciamento da região 16S rRNA .....	24
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
4.1. Caracterização genética dos rizóbios .....	27
4.2. Promoção de germinação em sementes de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> Lam.).....	30
4.3. Promoção de crescimento das gramíneas estudadas por inoculação com rizóbios.....	33
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>
<b>7. APÊNDICES .....</b>	<b>55</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Origem, características fenotípicas, tempo de crescimento em meio de cultura e gênero provável dos rizóbios estudados. ....	17
Tabela 2. Produção de ácido indol acético (AIA) por rizóbios crescidos por seis dias, em meio de cultura levedura manitol (LM), enriquecido ou não com triptofano. ....	26
Tabela 3. Identificação dos rizóbios estudados pela sequência parcial dos genes 16S rRNA obtida com o programa BLASTn. ....	29
Tabela 4. Produção de massa seca da parte aérea (incluindo folhas e rizomas), massa seca de raízes, volume radicular, número de perfilhos e Nitrogênio total da parte aérea de plantas de pensacola ( <i>Paspalum sauræ</i> (Parodi) Parodi) inoculadas com rizóbios e avaliadas 60 dias após germinação. Médias de quatro repetições, com duas plantas por repetição.....	34
Tabela 5. Produção de massa seca da parte aérea, massa seca de raízes, volume radicular, e Nitrogênio total da parte aérea de capim Tanzânia ( <i>Panicum maximum</i> ) inoculado com rizóbios e avaliado 60 dias após germinação. Média de quatro repetições, incluindo duas plantas por repetição. ..	36
Tabela 6. Produção de massa seca da parte aérea, massa seca de raízes, volume radicular, Nitrogênio (N) total da parte aérea, número de folhas (Fl.), número de perfilhos (Perf.) e número de panículas (Pan.) por planta de braquiária ( <i>Brachiaria decumbens</i> ) inoculada com rizóbios e avaliada 60 dias após germinação. Média de quatro repetições, com uma planta por repetição. ....	39
Tabela 7. Produção de massa seca da parte aérea, massa seca de raízes, volume radicular, número de perfilhos (Perf.) e Nitrogênio total da parte aérea de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> Lam.) inoculado com rizóbios e avaliado 60 dias após germinação. Média de quatro repetições, incluindo duas plantas por repetição. ....	41

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Curva com diferentes concentrações ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de ácido indol-acético (AIA), quantificadas em espectrofotômetro a 530 nm. ....	19
Figura 2. Dendrograma de similaridade de isolados e estirpe de rizóbios. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da PCR com o oligonucleotídeo iniciadore BOX A1. ....	27
Figura 3. Árvore filogenética com base na análise da região 16S rRNA da estirpe SEMIA816 e dos isolados sequenciados, obtida por meio do método <i>Neighbor-joining</i> . Os números nas ramificações representam os valores de <i>bootstreep</i> . ....	30
Figura 4. Germinação acumulada de sementes de azevém. Cada valor representa a média de quatro repetições, com 50 sementes por repetição. ....	31
Figura 5. Porcentagem de germinação acumulada obtida ao longo de sete dias após inoculação dos rizóbios às sementes de azevém. Cada valor representa a média de quatro repetições, com 50 sementes por repetição. Meio a 28 °C: tratamento controle, meio de cultura conduzido em câmara de crescimento a 28 °C. ....	32
Figura 6. Índice de eficiência relativa (IER %) dos rizóbios quanto ao aumento de massa seca de pensacola. ....	35
Figura 7. Índice de eficiência relativa (IER %) dos rizóbios quanto ao aumento de massa seca em capim Tanzânia. ....	37
Figura 8. Índice de eficiência relativa (IER %) dos rizóbios quanto ao aumento de massa seca em braquiária. ....	40
Figura 9. Índice de eficiência relativa (IER %) dos rizóbios quanto ao aumento de massa seca em azevém. ....	42

## RELAÇÃO DE APÊNDICES

	<b>Página</b>
Apêndice 1. Meio Levedura-Manitol-Ágar – LMA (Vincent, 1970) ..	56
Apêndice 2. Corante Vermelho Congo .....	57
Apêndice 3. Solução Sarruge (Sarruge, 1975) .....	58

## 1. INTRODUÇÃO

A exploração pecuária no Sul do Brasil fundamenta-se no uso de espécies nativas como principais fontes de alimento volumoso para o rebanho de bovinos e ovinos, porém no decorrer das estações mais frias do ano, as pastagens naturais encontram sérias dificuldades de estabelecimento. A oferta de forragem durante este período é insuficiente para suprir a demanda de alimentos volumosos pelos animais, tanto em termos qualitativos quanto quantitativos. Assim sendo, pastagens cultivadas com gramíneas são amplamente usadas no Sul do país, sobretudo para suprir o déficit alimentar dos rebanhos durante o outono e o inverno, porém com rendimentos muito abaixo do seu potencial, devido à deficiência de manejo adequado e adubação.

Alternativas de manejo comprovadamente eficientes na melhora de sistemas de cultivo de pastagens são a sucessão e a consorciação de gramíneas com leguminosas. Nestes sistemas, as leguminosas podem contribuir para aumentar a qualidade da forragem ingerida pelos animais de forma direta, quando consumidas, e indireta pelo nitrogênio fornecido às gramíneas associadas e pela melhoria da fertilidade do solo, promovendo eficiência na ciclagem de nutrientes (Pengelly & Conway, 2000; Lascano, 2002).

Dentre as leguminosas forrageiras cultivadas, o cornichão (*Lotus corniculatus* L.) apresenta características de adaptação interessantes para as condições edafoclimáticas predominantes no Rio Grande do Sul. Algumas destas características são a tolerância à acidez e à baixa fertilidade do solo (Paim, 1988), as quais associadas com o excelente valor nutritivo dessa espécie (López et al., 1965) e à característica de não provocar timpanismo (Paim, 1988), tornam o cornichão uma espécie forrageira potencialmente explorável em solo gaúcho.

Estudos recentes (Frizzo, 2007) comprovaram que o cornichão efetua associações simbióticas com rizóbios nativos de solos gaúchos, capazes de fixar nitrogênio atmosférico. Este nitrogênio fixado nos nódulos, além de beneficiar a leguminosa, pode ser disponibilizado no solo, por meio da decomposição dos nódulos e dos restos culturais da leguminosa, ou por exudação das raízes ainda durante o cultivo. De qualquer forma, a contribuição é feita indiretamente pela transferência do nitrogênio fixado para a gramínea, o que aumenta a capacidade de suporte da pastagem e prolonga a sua capacidade produtiva (Cantarutti & Boddey, 1997). Deste modo, o cornichão quando inoculado com rizóbios eficientes, também pode ser uma boa alternativa para sistemas de consorciação ou sucessão com gramíneas forrageiras, e promove a sustentabilidade econômica e ambiental dos sistemas de pastejo nos quais esteja inserido.

Nos últimos anos, pesquisadores têm constatado que os rizóbios também são capazes de promover o crescimento de plantas não-leguminosas por meio de outros mecanismos, entre os quais a produção de hormônios (Yanii et al., 2001; Chen et al., 2005; Schlindwein et al., 2008). A síntese de auxinas, particularmente o ácido indol-acético (AIA), promove o crescimento das raízes e a proliferação de pêlos radiculares, melhorando a absorção de água e nutrientes do solo, e conseqüentemente, melhorando o desenvolvimento da planta infectada (Caballero-Mellado et al., 2006). Neste sentido, em cultivos em sucessão ou em consorciação, a gramínea pode também ter o crescimento favorecido pela produção de hormônios, entre eles o AIA, pelas bactérias simbiotes de leguminosas.

O presente trabalho teve por objetivos agrupar por método de seqüenciamento genético os rizóbios estudados e classificá-los; quantificar a produção AIA pelos isolados; e identificar entre os rizóbios estudados, aqueles isolados capazes de promover a germinação e o crescimento de azevém (*Lolium multiflorum* Lam), braquiária (*Brachiaria decumbens*), capim Tanzânia (*Panicum maximum*), e pensacola (*Paspalum sauræ* (Parodi), sob condições controladas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Os rizóbios são bactérias edáficas, que sobrevivem no solo saprofiticamente, competindo com outras bactérias por espaço e nutrientes. Sabe-se que quando em contato com raízes de algumas espécies não leguminosas, os rizóbios são capazes de colonizar o tecido destas plantas. Isto foi comprovado em trabalhos conduzidos com alface (Noel et al., 1996), canola (Noel et al., 1996), trigo (Webster et al., 1997), rabanete (Antoun et al., 1998), milho (Chabot, 1996; Gutierrez-Zamora, 2001) e arroz (Webster et al. 1997; Osório Filho, 2009).

Há algum tempo, verifica-se que gramíneas cultivadas depois de leguminosas têm incremento em sua produção, e isto não se deve apenas ao nitrogênio residual. Diversos trabalhos relacionam este aumento na produção com a presença de rizóbios (Yanii et al., 2001; Chi et al., 2005. Mishra et al., 2006), os quais são capazes de promover o crescimento de não leguminosas por meio de diferentes mecanismos.

### **2.1. Mecanismos de promoção de crescimento de plantas**

Os rizóbios são classificados como organismos promotores de crescimento vegetal, devido à sua capacidade de exercer algum efeito benéfico no crescimento e/ou desenvolvimento das plantas, por meio de mecanismos diretos e indiretos (Santillana et al., 2005).

Entende-se por mecanismos indiretos a capacidade de beneficiar as plantas sem agir diretamente sobre elas, como no caso da supressão de patógenos. Esta supressão é decorrente da competição por nutrientes ou produção de antibióticos, quitinases e glucanases (Somers & Vanderleyden, 2004). Outro mecanismo indireto, é a produção de sideróforos, moléculas de baixo peso molecular, quelantes específicos do íon  $Fe^{3+}$ , sintetizados por

determinadas bactérias e fungos, sob condições de baixa disponibilidade de ferro (Neilands, 1995). Arora et al. (2001) identificaram rizóbios capazes de inibir a ocorrência de *Macrophomina phaseolina*, fungo causador da podridão cinzenta do caule e/ou das raízes.

Por meio dos mecanismos diretos os rizóbios favorecem o crescimento e/ou desenvolvimento vegetal melhorando as condições nutricionais ou sintetizando substâncias estimuladoras às plantas. São exemplos de mecanismos diretos a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfato e a produção de hormônios, a qual será revisada em um item à parte, devido sua importância no presente trabalho.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o mais bem estudado dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal pelo qual os rizóbios beneficiam as plantas. Este processo é mediado pela enzima nitrogenase, e consiste na redução do gás atmosférico  $N_2$  para  $NH_3$ . A FBN é conhecidamente realizada pelos rizóbios quando em simbiose com leguminosas e com a espécie de não leguminosas *Parasponia andersonii* (Trinick, 1979).

Os rizóbios também são capazes de liberar ácidos orgânicos, como o ácido carboxílico (Deubel & Merbach, 2005), cítrico, láctico, glucônico, oxálico, tartárico, acético, entre outros (Vazquez et al., 2000), os quais diminuem o pH na rizosfera e conseqüentemente dissociam fosfatos de formas inorgânicas, como o fosfato tricálcico,  $Ca_3(PO_4)_2$ . Hara & Oliveira (2004), Sridevi (2007) e Lemos (2009) selecionaram rizóbios capazes de solubilizar fosfato tricálcico in vitro.

### **2.1.1. Produção de substâncias fitoestimuladoras por rizóbios**

Os rizóbios são reconhecidamente capazes de produzir substâncias fitoestimuladoras influenciando o crescimento e o desenvolvimento vegetal de não leguminosas (Biswas et al., 2000; Belimov et al., 2001; Yanni et al., 2001; Kravchenko et al., 2004). Outros microorganismos, tais como *Azospirillum* spp. (Van der Broek & Vanderleyden, 1995; El-Khawas & Adachi, 1999), *Acetobacter diazotrophicus* (Bastián et al., 1998), *Herbaspirillum seropedicae* (Bastián et al., 1998), *Klebsiella pneumoniae* (El-Khawas & Adachi, 1999), *Pseudomonas syringae* (Weingart & Völksch, 1997), *Pseudomonas* sp. (Santos Junior et al.,



2008) e *Paenibacillus polymyxa* (Lebuhn et al., 1997) também produzem substâncias fitoestimuladoras.

As principais substâncias fitoestimuladoras produzidas por rizóbios são os hormônios pertencentes ao grupo das auxinas (Biswas et al., 2000; Erum & Bano, 2008), citocininas (Persello-Cartieaux et al., 2003) e giberelinas (Yanni et al., 2001; Erum & Bano, 2008). Também há relatos de produção de ácido abscísico (Dangar & Basu, 1991), lipo-quitoligosacarídeos (LCOs) (Prithviraj et al., 2003; Miransari & Smith, 2009), lumicromo (Volpin & Phillips, 1998), ácido carboxílico aminociclopropano deaminase (ACAD) (Ma, 2003), riboflavonas e vitaminas (Dakora, 2003) produzidos por rizóbios.

Entre as auxinas o ácido indol-acético (AIA) é o mais estudado e o mais produzido por bactérias (Radwan, et al. 2005). O AIA atua principalmente na formação de raízes laterais e de pêlos radiculares que aumentam a absorção de nutrientes pela planta (Biswas et al., 2000). Diferentes rotas metabólicas de biossíntese de AIA já foram identificadas em bactérias (Spaepen et al., 2007), sendo que duas das principais rotas metabólicas já descritas para a produção de AIA dependem de triptofano. São elas a rota da indole-3-acetamida (IAM) e indole-3-piruvato (IpyA) (Lambrecht et al., 2000). Osorio Filho (2009) inferiu que provavelmente a rota de biossíntese de AIA em rizóbios seja a rota do indole-3-acetonitrilo (IAN). No mesmo estudo, o autor inseriu o gene Gus nos rizóbios, e com a utilização destas bactérias marcadas, observou a sua capacidade de colonização de plantas de arroz, tanto no tecido radicular quanto nas folhas.

Teores de triptofano têm sido encontrados em exudados radiculares. Kravchenko et al. (2004) quantificaram a exudação de triptofano por raízes assépticas de tomate e rabanete. Plântulas de tomate liberaram diariamente de 2,8 a 5,3 ng de triptofano por planta, enquanto que em rabanete a liberação diária de triptofano variou de 190 a 390 ng por planta. No mesmo estudo, os autores conduziram experimentos em vasos com solo, onde inocularam ambas as culturas com uma rizobactéria promotora de crescimento de plantas do gênero *Pseudomonas*, e observaram que a massa radicular de rabanete foi incrementada em 36% nas plantas inoculadas, enquanto que a inoculação da mesma bactéria em tomate foi ineficiente. Os autores afirmam que o efeito benéfico da inoculação em plantas de rabanete pode ser explicado pelo fato de

que a rizobactéria introduzida produziu o hormônio estimulador de crescimento vegetal AIA.

Em experimento conduzido em câmara de crescimento, Silveira (2008) estudou o efeito da inoculação de cinco estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* quanto à capacidade de promover o crescimento de arroz, cultivar IAC103, em solução nutritiva. Quanto ao acúmulo de massa seca, as plantas inoculadas com as estirpes SEMIA235 e SEMIA250 foram superiores ao tratamento controle em mais de 100%. A produção de AIA por estas estirpes foi menor em relação às demais estirpes, e isto pode ter sido a chave para o maior estímulo às plantas. Barazani & Friedman (1999) também relatam que rizobactérias deletérias produziram altos níveis de AIA, por outro lado, com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas obteve-se menor produção durante o mesmo período de incubação.

Biswas et al. (2000) conduziram estudos em laboratório e em casa de vegetação para testar a capacidade de rizóbios em promover crescimento vegetal em duas cultivares de arroz. Os rizóbios estudados foram avaliados quanto à produção de AIA através de teste colorimétrico, o qual foi positivo para as culturas sobrenadantes de todos os rizóbios testados, variando de 1,6 a 2,8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As melhores respostas às inoculações foram obtidas com *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* estirpe E11 e *Rhizobium* sp. estirpe IRBG74, os quais estimularam precocemente o crescimento vegetal, resultando em incremento no rendimento de grãos e palhada, durante a maturidade das plantas.

Os rizóbios da espécie *Bradyrhizobium japonicum* isolados de raízes de soja, *Azorhizobium caulinodans*, isolados de *Sesbania rostrata*, *Rhizobium* NGR234 de *Lablab purpureus*, *Sinorhizobium meliloti* de *Medicago sativa*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* Cn6, e *R. leguminosarum* bv. *viceae* estirpe 30 de *Vicia faba* foram capazes de infectar e colonizar raízes de sorgo e/ou setária (Matiru & Dakora, 2004). Baseados no fato deste diverso grupo de rizóbios isolados de diferentes gêneros de leguminosas serem capazes de colonizar estas duas gramíneas, os autores sugerem que a infecção de não leguminosas por rizóbios é provavelmente mais ocorrente na natureza do que se imagina. Houve incremento no crescimento das plantas de sorgo e setária inoculadas, bem como aumento na obtenção de fósforo (P) pelo sorgo.

Segundo os autores, isto pode ter ocorrido devido à indução pelas bactérias de mudanças na atividade de transportadores de fosfato da membrana plasmática das células radiculares do sorgo.

Outros fitohormônios produzidos por rizóbios são as giberelinas (GAs) (Yanni et al., 2001; Erum & Bano, 2008), as quais são conhecidas por produzir estímulos no crescimento do caule, sendo que este efeito foi mais observado em gramíneas, hortaliças e plantas ornamentais (Weaver, 1972). Para Metievers (1986), os efeitos mais notáveis das GAs aparecem no crescimento, especialmente no alongamento do caule, podendo o crescimento foliar ser aumentado em muitas espécies e também haver indução da diferenciação da zona cambial e do xilema. Segundo Anderson (1967), a um determinado teor de GA na planta, um nível mais alto ou mais baixo de AIA em relação ao nível ótimo, reduz o crescimento foliar, sendo essencial certo equilíbrio entre GA e AIA para uma taxa máxima de crescimento.

A produção de AIA e GA por rizóbios foi quantificada por Erum & Bano (2008) com o uso de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Os rizóbios, isolados de solos do norte do Paquistão, localizados em altitudes de 940 a 3090 metros acima do nível do mar, produziram os fitohormônios e a produção de GA foi por volta de 10 a 30 vezes maior do que a produção de AIA. Houve correlação positiva e crescente entre a relação GA/AIA produzida e a altitude dos locais de coleta dos rizóbios. Segundo os autores, o gradiente na concentração de AIA e GA provavelmente representa um declínio nos recursos naturais como a intensidade da radiação, umidade do solo e nutrientes do solo.

Apesar de reconhecidas e produzidas por rizóbios (Persello-Cartieaux et al., 2003), a produção de citocininas tem sido pouco estudada devido à difícil detecção e quantificação. As citocininas estimulam a divisão celular (citocinese) e são produzidas nas raízes e transportadas através do xilema para todas as partes da planta. Os níveis de auxina e de citocinina são correlacionados inversamente na planta (Eklöf et al., 2000). Outros fitoestimuladores produzidos por rizóbios são os lipo-quitooligosacarídeos (LCOs), também conhecidos como fatores Nod. Os LCOs são moléculas responsáveis por mudanças morfológicas nas raízes de leguminosas durante o processo de nodulação (Khan et al., 2008), porém também

estimularam a germinação de milho, arroz, beterraba e algodão, sob condições de laboratório, casa de vegetação e à campo (Prithiviraj et al., 2003).

Apesar do papel chave dos LCOs produzidos por rizóbios na formação de nódulos ser bem esclarecido, foram observadas outras atividades morfogênicas nas plantas atribuídas aos LCOs, incluindo estímulo de genes envolvidos no ciclo celular de culturas celulares em suspensão e estímulo de divisões mitóticas em culturas de protoplasma de leguminosas e não leguminosas (Souleimanov et al., 2002).

Miransari & Smith (2009) testaram o efeito de LCOs extraídos de cultura de *Bradyrhizobium japonicum* e giberelina na germinação de sementes de cevada. No tratamento com  $10^{-5}$  M de giberelina houve 18% de incremento na germinação das sementes testadas comparativamente com o tratamento controle, enquanto no tratamento com  $10^{-6}$  M de LCOs o incremento na germinação foi de 44%.

Alguns rizóbios têm a capacidade de diminuir o nível de etileno excretado pelas plantas, por formar o ácido carboxílico aminociclopropano deaminase (ACAD), uma enzima que quebra o ácido carboxílico aminociclopropano (ACA), precursor do etileno (Penrose & Glick, 2001). Esta enzima foi encontrada em bactérias rizosféricas dos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, e *Rhizobium* (Belimov et al., 2001; Ma, 2003). Além disso, certas bactérias da espécie *Rhizobium japonicum* (*Bradyrhizobium japonicum*) sintetizam antibióticos fitotóxicos que inibem a formação do etileno em plantas (aminoetoxivinilglicina e rizobitoxina) (Zakharychev, (1999, apud Tsavkelova et al., 2006)). O benefício ao crescimento vegetal prestado pelas bactérias produtoras de inibidores da formação do etileno, deve-se ao fato de o etileno ser um inibidor do crescimento vegetal, por prejudicar o desenvolvimento e a extensão celular, interromper o geotropismo, promover a filoptose (queda espontânea das folhas) e acelerar a maturação de frutos (Zakharychev, (1999, apud Tsavkelova et al., 2006)).

O lumicromo é um produto da degradação fotoquímica da riboflavina sob condições de pH neutro e ácido (Yagi, 1956), porém Volpin & Phillips (1998) comprovaram a produção deste composto por *Sinorhizobium meliloti*. Matiru e Dakora (2005) mostraram que a aplicação de lumicromo em concentrações nanomoleculares promoveu o crescimento de leguminosas e

gramíneas, e Khan et al. (2008) verificaram que o lumicromo estimulou o índice fotossintético de milho no primeiro e no segundo dia após a aplicação. Gouws (2009) relatou incrementos na biomassa radicular de *Lotus japonicus* e tomate quando tratadas com lumicromo. Segundo o autor, o tratamento com lumicromo causou mudanças complexas na expressão genética de *L. japonicus* e tomate. As categorias predominantemente afetadas pelo lumicromo tanto em *L. japonicus* quanto em tomate foram os genes associados à regulação da transcrição e sinalização do RNA, à síntese/degradação/modificação de proteínas e à reação da planta a estresses. Segundo Gouws (2009), o mecanismo pelo qual o lumicromo promove o crescimento de plantas ainda precisa ser esclarecido.

## **2.2. Colonização de gramíneas por rizóbios**

Os rizóbios, bactérias edáficas, capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio atmosférico em benefício da planta hospedeira, especialmente em espécies da família Fabaceae, bem como na não leguminosa *Parasponia*, recentemente têm sido estudados quanto a um terceiro nicho, as raízes de gramíneas (Chaintreuil et al., 2000). Em 1989, Al Mallah e colaboradores estudaram a interação de rizóbios com raízes de arroz. Posteriormente, vários estudos foram feitos, demonstrando a colonização de rizóbios em raízes de gramíneas e seu efeito na promoção de crescimento destas plantas (Chabot et al., 1996; Chaintreuil et al., 2000; Yanni et al., 2001; Chi et al., 2005; Osorio Filho, 2009).

Em estudos de colonização de rizóbios em raízes de arroz, existem evidências que a penetração destas bactérias nas raízes ocorre através de rupturas na epiderme e das fissuras criadas durante a emergência de raízes laterais (Reddy et al., 1997; Webster et al., 1997; Yanni et al., 1997). Em trabalho conduzido por Schloter et al. (1997), células de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii colonizaram plântulas de milho e trigo. Os autores relatam que durante o processo de colonização, as bactérias liberaram lipopolissacarídeos (LPS). De acordo com Schloter et al. (1997) os LPS parecem ter um papel importante na colonização inicial das raízes por *R. leguminosarum* bv. trifolii, visto que os LPS foram supra-expressados

principalmente na rizosfera no início do processo infectivo, e não internamente nos tecidos radiculares. Chabot et al. (1996) também relataram a colonização de milho por rizóbios.

Perrine-Walker et al. (2007) fotografaram o encurvamento de pêlos radiculares de plântulas de arroz colonizadas por rizóbios marcados. Os autores comparam o fenômeno à formação do cordão de infecção observado com a inoculação de rizóbios em trevo alexandrino (*Trifolium alexandrinum*). Segundo Perrine-Walker et al. (2007), a presença de pêlos radiculares encurvados em plântulas de arroz inoculadas com rizóbios indica que alguns dos sinais quimiostáticos, como os flavonóides, envolvidos na formação de nódulos em leguminosas podem ser presente na colonização de plântulas de arroz por rizóbios.

Os flavonóides são substâncias excretadas pelas plantas, que têm grande importância na comunicação e no estabelecimento da simbiose entre rizóbios e leguminosas (Redmond et al., 1986). Sabe-se que os flavonóides também são produzidos por não leguminosas, sendo o trigo uma das plantas em que traços de flavonóides foram primeiramente encontrados nos exudatos radiculares (Lundegardh & Stenlid, 1944).

O efeito dos flavonóides na colonização de raízes de gramíneas por rizóbios foi estudado por Webster et al. (1997). Os autores verificaram que a estirpe ORS571, da espécie *Azorhizobium caulinodans* colonizou raízes de trigo (*Triticum aestivum* cv. Canon) e arroz (*Oryza sativa* cv. Lemont). Na presença de naringenina, flavonóide da família das flavononas, houve incremento na colonização das raízes de ambas as espécies. Os mesmos autores estudaram a inoculação em trigo de um mutante de *Azorhizobium caulinodans*, o qual se caracteriza por não produzir fatores Nod. Não se encontrou diferença entre os níveis de colonização do mutante em comparação com a respectiva estirpe selvagem. A colonização das raízes pelo mutante também foi estimulada pela naringenina, o que sugere que o estímulo que o flavonóide induziu na colonização da gramínea não foi mediado por fatores Nod.

Estudando a interação entre rizóbios e uma variedade de arroz nativo da África (*Oryza breviligulata*), Chaintreuil et al. (2000) observaram que após infecção da superfície dos ápices radiculares, a penetração dos rizóbios

no tecido da planta se deu através de fissuras originárias do surgimento de raízes secundárias. Outros autores também descreveram o início do processo de infecção de raízes de gramíneas, e relataram a entrada dos rizóbios no tecido vegetal através de inserções de raízes secundárias.

Em estudo com rizóbios marcados, através da inserção do gene Gus por conjugação de plasmídeo, Osório Filho (2009) estudou a infecção de rizóbios em plântulas de cornichão (*Lotus corniculatus*), trevo vesiculoso (*Trifolium vesiculosum*) e arroz (*Oryza sativa*). Os rizóbios penetraram nas raízes das leguminosas, concentrando-se apenas nos nódulos e primórdios nodulares. Nas plantas de arroz, as bactérias colonizaram tecido radicular e parte aérea, concentrando-se principalmente nas raízes secundárias, no córtex radicular e no tecido vascular das folhas. Webster et al. (1997) também verificaram penetração dos rizóbios em raízes de arroz. Segundo os autores, esta resultou na presença de grandes bolsas de bactérias entre as células da região emergencial das raízes laterais e no córtex radicular.

### **2.3. Os rizóbios em sistemas de rotação/consorciação de pastagens**

As leguminosas forrageiras podem contribuir para aumentar a qualidade da forragem ingerida pelos animais de forma direta, quando consumidas, e indireta através do nitrogênio disponibilizado às gramíneas associadas e da melhoria da fertilidade do solo, que promove eficiência na ciclagem de nutrientes, já que a decomposição de resíduos de plantas é controlada principalmente pela disponibilidade de N (Pengelly & Conway, 2000; Lascano, 2002). Segundo Carvalho (1985), em pastagens consorciadas geralmente uma proporção do N fixado simbioticamente torna-se disponível para utilização pela gramínea associada, ou por outras plantas não leguminosas, componentes da pastagem.

Outro importante benefício da inserção de leguminosas em sistemas de consorciação ou rotação de culturas é que juntamente com as leguminosas, os rizóbios são inseridos na rizosfera. Devido aos benefícios empregados no crescimento e desenvolvimento de gramíneas e leguminosas por meio de diversos mecanismos (Antoun et al, 1998; Prithiviraj et al., 2003; Perrine-

Walker, 2007), os rizóbios têm sido estudados como potencial alternativa para o manejo de leguminosas e gramíneas cultivadas em sucessão e/ou consorciação (Yanni et al., 1997; Biswas et al., 2000; Yanni et al., 2001; Osorio Filho, 2009). Porém, sabe-se muito pouco sobre as possíveis interações entre rizóbios e gramíneas forrageiras, de modo que o que se supõem deve-se aos resultados obtidos com gramíneas produtoras de grãos.

Yanni et al. (2001) publicaram resultados de diversos estudos onde demonstraram o efeito de rizóbios sobre o rendimento da cultura do arroz, quando inserido em um bem implementado sistema de rotação de culturas com leguminosa forrageira. A área utilizada neste estudo está localizada no delta do rio Nilo, região conhecida por ser a maior produtora de arroz do norte da África, e desde a antiguidade ser cultivada sob sistema de rotação de culturas entre arroz e trevo alexandrino. Plantas de arroz foram amostradas em cinco diferentes localidades durante dois diferentes ciclos de rotação das culturas. Após desinfestação e maceração das raízes das plantas amostradas, estas foram inoculadas a sementes de trevo alexandrino, sob condições axênicas. Avaliando-se os resultados, verificou-se que todos os inóculos provenientes das cinco diferentes áreas de cultivo rotacionado continham rizóbios viáveis, os quais originaram nódulos em plântulas de trevo alexandrino sob condições axênicas. Isto confirmou a hipótese dos autores de que os rizóbios noduladores das raízes de trevo colonizavam raízes de arroz nestas áreas do delta do Nilo. Adicionalmente, com resultados de experimentos conduzidos em laboratório, casa de vegetação e à campo, os autores demonstraram que alguns destes rizóbios endofíticos promoveram crescimento de plantas de arroz, possibilitando incrementos no rendimento de grãos na maturidade da cultura.

Em outro estudo, Rosenblueth & Martinez-Romero (2004) avaliaram perfis de plasmídeos de estirpes de *Rhizobium etli*, isoladas de raízes e do caule de milho, bem como da rizosfera. Quando reinoculadas em plântulas de milho, algumas das estirpes provenientes dos tecidos da planta foram mais infectivas que as isoladas da rizosfera ou de nódulos de feijão. Os autores sugerem que em áreas onde o milho é consorciado com feijão, parece haver uma seleção do milho a rizóbios endofíticos, semelhantemente ao visto com o arroz associado ao trevo alexandrino no trabalho de Yanni et al. (2001).



A seguir são apresentadas algumas das principais características das gramíneas estudadas. Todas são exploradas devido ao potencial forrageiro, e são representantes de gêneros disseminados em território brasileiro (Kissmann, 1997).

#### **2.4. Azevém**

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma planta anual ou bianual, ereta, reproduzida por sementes (Lorenzi, 2000). Tem sido cultivada com maior intensidade nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste em programas de rotação de culturas, substituindo o trigo no inverno (Kissmann, 1997).

O desenvolvimento mais vigoroso do azevém ocorre nos climas temperados e temperados frios, quando o seu maior desenvolvimento é no final do inverno e início da primavera, podendo ser cultivado em todo o RS (Fontineli, 1984). Para Moraes et al. (1995), o azevém consagrou-se como grande opção pela sua facilidade de ressemeadura natural, resistência a doenças, bom potencial de produção de sementes e versatilidade de uso em associações, na região Sul do Brasil.

Segundo Araújo (1965), o azevém vegeta bem em todos os tipos de solos, mas proporciona maiores rendimentos em terras médias, úmidas e férteis, bem como nas argilosas. É menos produtivo nas áreas arenosas secas, sendo as várzeas e banhados drenados favoráveis.

Quanto ao rendimento, é uma excelente forrageira, produzindo até 25 toneladas de massa verde por hectare, de boa palatabilidade e bom valor nutritivo (Kissmann, 1997). É bastante responsivo à adubação nitrogenada, Alvim et al. (1989) usando 50, 125 e 200 kg.ha<sup>-1</sup> de N, sobre azevém irrigado sob pastejo, obtiveram resposta positiva na percentagem de proteína bruta e produção de forragem até a maior dose de N utilizada.

#### **2.5. Braquiária**

Planta perene ereta ou decumbente, propagada reprodutivamente por sementes e vegetativamente por rizomas (Lorenzi, 2000), amplamente disseminada em território brasileiro (Kissmann, 1997). A braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf) é conhecida como excelente forrageira, com grande

produção de massa foliar, também é resistente ao pastejo intensivo e ao pisoteio, sendo considerada boa para a proteção do solo contra a erosão (Kissmann, 1997).

Há relatos de problemas de fotossensibilização de animais que pastejaram áreas cultivadas com *B. decumbens*. O problema é ocasionado por uma toxina produzida pelo fungo *Phytophthora chartarum*, que é saprófita e se desenvolve sobre o material orgânico na superfície do solo (Lemos et al., 1998; Saturnino et al., 2010). Outro aspecto negativo relacionado ao cultivo de *B. decumbens* é que toda vez que uma área de pastagem com esta espécie é transformada em lavoura cultivada, a *B. decumbens* torna-se uma séria planta daninha (Lorenzi, 2000).

## **2.6. Capim Tanzânia**

O capim Tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia), é uma gramínea cespitosa perene, que se reproduz tanto por sementes quanto vegetativamente (rizomas). Segundo Kissmann (1997), estima-se que exista no Brasil de 100 a 200 espécies do gênero *Panicum*, e muitas delas podem ocorrer como infestantes. Porém, de acordo com o mesmo autor a espécie *Panicum maximum* é considerada uma das melhores espécies forrageiras para regiões quentes e com boa distribuição de chuvas. A partir da década de 80, iniciaram-se os trabalhos de melhoramento com *Panicum maximum* no Brasil, e obteve-se bons resultados com o capim Tanzânia quanto à produção de matéria seca total e foliar, ganho de peso diário por bovinos, e taxa de lotação por área (Jank, 1994).

## **2.7. Pensacola**

A pensacola (*Paspalum saurae* (Parodi) Parodi cv. Pensacola) é uma gramínea perene de estação quente, pertencente ao gênero *Paspalum*, o qual é o gênero da família Poaceae com o maior número de espécies no território brasileiro (Kissmann, 1997). A pensacola tem hábito de crescimento rasteiro, com rizomas curtos e firmemente presos à superfície do solo, formando uma cobertura densa (Mislevy, 1985).

Originária da América do Sul, é muito utilizada e difundida no sul dos Estados Unidos, principalmente no Estado da Flórida, onde foi inicialmente estudada e é utilizada na criação de bovinos de corte e equinos (Burton & Mullinix, 1998). Apresenta elevado potencial forrageiro também para a Região Sudeste do Brasil (Batista et al., 1995).

É consenso que parte importante da gestão da fertilidade dos solos, reside na utilização de inoculantes microbianos. Tais inoculantes possuem potencial para reduzir a necessidade dos cultivos em certos nutrientes como o nitrogênio, em gramíneas e leguminosas, e também, promover o crescimento das plantas, aumentando a exploração de maior volume de solo e melhorando o aproveitamento dos nutrientes e a eficiência no uso de fertilizantes. Deste modo, faz-se necessário a prospecção de rizóbios noduladores de leguminosas cultiváveis e o estudo de seus mecanismos de promoção de crescimento de gramíneas, bem como se avaliar a biodiversidade destas rizobactérias nativas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados os isolados de rizóbios para *Lotus corniculatus*, UFRGS Lc134, UFRGS Lc323, UFRGS Lc394, UFRGS Lc443, UFRGS Lc510, UFRGS Lc522, UFRGS Lc524, UFRGS Lc336 e UFRGS Lc348 (Frizzo, 2007), obtidos da Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS. Além destes isolados, testou-se a estirpe SEMIA816, liberada para produção de inoculantes para *L. corniculatus*, obtida da Coleção de Culturas do Rizóbios da Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO).

#### 3.1. Caracterização fenotípica dos rizóbios estudados

Os rizóbios estudados foram selecionados em placas de petri, com meio de cultura Levedura Manitol Agar (LMA) (Vincent, 1970) com vermelho congo, com base em características morfológicas típicas de rizóbios. Também se teve como critério de escolha a diversidade entre os rizóbios em suas características quanto ao local de coleta, fenótipo e tempo de crescimento em meio de cultura LMA (Vincent, 1970). De acordo com as características fenotípicas (Tabela 1), os isolados UFRGS Lc134, Lc348, Lc510, Lc522, Lc524 e a estirpe SEMIA816 possivelmente enquadram-se no gênero *Mesorhizobium*, enquanto os isolados UFRGS Lc323, Lc336, Lc394 e Lc443 tiveram características compatíveis com rizóbios do gênero *Bradyrhizobium*.

Após a caracterização fenotípica e seleção, cada um dos rizóbios foi inoculado em três tubos de ensaio contendo meio LMA (Vincent, 1970). Estes tubos inoculados foram destinados às seguintes finalidades: trabalho, reserva e estoque. No decorrer dos estudos, o inóculo presente no tubo de trabalho foi utilizado para a produção dos inoculantes empregados nos experimentos; no

momento em que a cultura do tubo de trabalho foi esgotada, este tubo foi descartado, sendo substituído pelo tubo de reserva, o qual foi reproduzido novamente em triplicata; o tubo de estoque foi armazenado na Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS.

**Tabela 1.** Origem, características fenotípicas, tempo de crescimento em meio de cultura e gênero provável dos rizóbios estudados.

<b>Rizóbios</b>	<b>Origem</b>	<b>Consistência</b>	<b>Tamanho (mm)</b>	<b>Tempo de Crescimento (dias)</b>
Lc134	Eldorado do Sul	Viscosa	3	4
Lc323	Hulha Negra	Gomosa	1 a 2	7
Lc336	Hulha Negra	Butirosa	1 a 2	7
Lc348	Hulha Negra	Butirosa	4	4
Lc394	Arroio dos Ratos	Butirosa	1	7
Lc443	Arroio dos Ratos	Butirosa	1	7
Lc510	Passo Fundo	Gomosa	4	4
Lc522	Bagé	Gomosa	3	4
Lc524	Bagé	Gomosa	3	4
SEMIA816		Viscosa	3	4

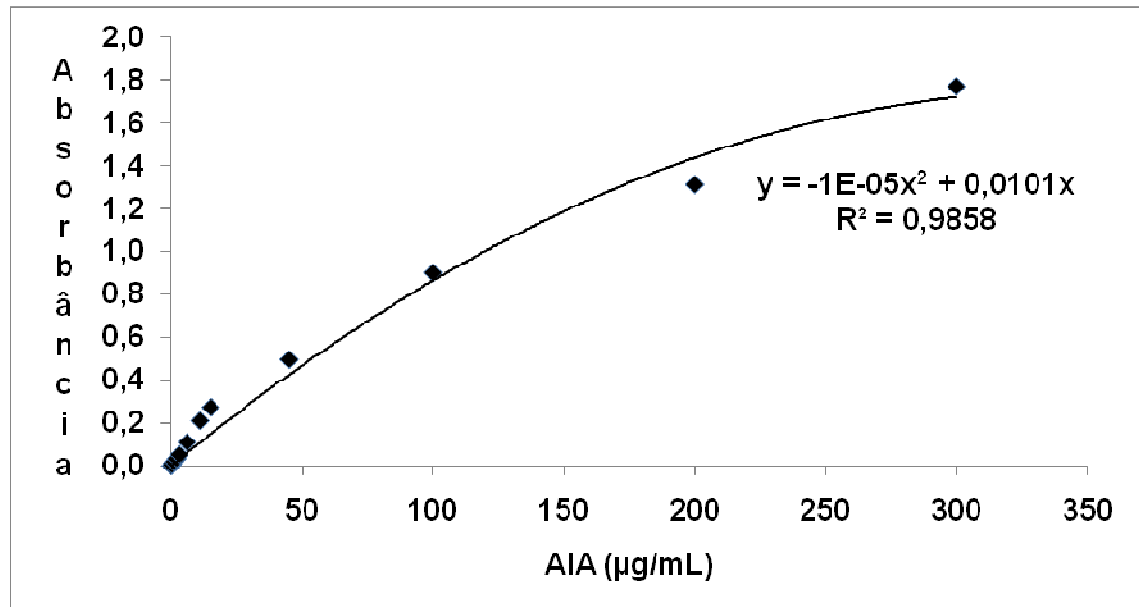
### 3.2. Quantificação da produção de Ácido Indol-acético (AIA)

As bactérias estudadas também foram caracterizadas quanto à capacidade de produzir ácido indol-acético (AIA) em meio LM (Vincent, 1970) enriquecido e meio não enriquecido com triptofano (precursor do AIA), utilizando-se o método descrito por Asghar et al. (2002).

Para a produção do inóculo, os rizóbios foram inoculados em tubos com meio Levedura-Manitol (LM) (Vincent, 1970), a pH 6,8 e incubados a 28 °C por 15 dias. Posteriormente cada isolado foi inoculado em dois erlenmeyers, um contendo 80 mL de meio de cultura LM líquido (Vincent, 1970) e outro com 80 mL de meio de cultura LM líquido (Vincent, 1970) enriquecido com 50 mg de triptofano . L<sup>-1</sup>. As culturas foram incubadas a 28 °C, com agitação de 120 rpm por 48 horas. Após este período de crescimento, o número de células foi quantificado em câmara de Neubauer (Moura et al., 1987), situando-se em cerca de 10<sup>8</sup> células . mL<sup>-1</sup> de caldo de cultura.

Em seguida, em triplicatas, 10 mL do caldo das culturas foram transferidos para tubos de centrífuga de 50 mL estéreis. As culturas foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 min, em centrífuga refrigerada a 4 °C. Coletou-se 1,5 mL do sobrenadante, o qual foi adicionado a 1 mL da solução de Salkowski (2mL de FeCl<sub>3</sub> + 98mL de HClO<sub>4</sub> 35%). O HClO<sub>4</sub> tem a função de oxidar o AIA e, na presença de FeCl<sub>3</sub>, produz uma cor rosada, cuja intensidade é proporcional à quantidade de AIA na amostra. Após a mistura do sobrenadante à Solução de Salkowski, as amostras foram armazenadas por 30 min em local escuro, tempo adequado para a reação de oxidação.

Posteriormente quantificou-se em triplicatas a produção de AIA pelos rizóbios, utilizando-se espectrofotômetro a um comprimento de onda de 530 nm (Gordon & Weber, 1951). A concentração de AIA nas amostras foi calculada comparando-se as leituras das amostras inoculadas com uma curva padrão, com zero, 0,2, 1, 2, 3, 6, 11, 20, 45, 100, 200 e 300 µg de AIA sintético mL<sup>-1</sup> (Figura 1). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de médias (Scott Knott, 5%), utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).



**Figura 1.** Curva com diferentes concentrações ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de ácido indol-acético (AIA), quantificadas em espectrofotômetro a 530 nm.

### 3.3. Teste de germinação

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação de isolados de rizóbios sobre a germinação de sementes de azevém (*Lolium multiflorum* Lam). O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS. Os tratamentos foram compostos pela inoculação das sementes de azevém com a estirpe SEMIA816 e os isolados UFRGS Lg111 UFRGS Lc323, UFRGS Lc336, UFRGS Lc348, UFRGS Lc443, UFRGS Lc510, UFRGS Lc522 e UFRGS Lc524, e conduzidos em câmara de crescimento a 28 °C. Também foram conduzidos os seguintes tratamentos controle sem inoculação: sementes com adição de meio de cultura e mantidas a 28 °C, sementes com adição de água destilada estéril e mantidas a 28 °C, sementes com adição de meio de cultura e mantidas a temperatura ambiente e sementes com adição de água destilada estéril e mantidas a temperatura ambiente. O delineamento foi o inteiramente casualizado com 4 repetições.

As sementes foram desinfestadas e colocadas em placas de petri com papel toalha previamente esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 min. Para cada repetição foram colocadas 50 sementes por placa, e inoculados 2 mL do caldo de cultura das bactérias crescidas em meio de cultura LM líquido por 48 horas em incubador orbital a 28 °C. A cada 24 horas as sementes

germinadas eram contadas e retiradas das placas. A germinação das sementes foi avaliada por um período de sete dias.

### **3.4. Promoção de crescimento vegetal**

Para testar a capacidade dos rizóbios em promover crescimento vegetal em gramíneas, foram conduzidos quatro experimentos com duração de 60 dias, na casa de vegetação do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Neste estudo, foram avaliados os isolados de rizóbios para *Lotus corniculatus*, UFRGS Lc134, UFRGS Lc323, UFRGS Lc336, UFRGS Lc348, UFRGS Lc394, UFRGS Lc510 e UFRGS Lc524 (Frizzo,2007), obtidos da Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS. Além destes sete isolados, testou-se a estirpe SEMIA816, liberada para produção de inoculantes para *L. corniculatus*, obtida da Coleção de Culturas de Rizóbios da Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO).

Os rizóbios foram inoculados em plantas de quatro espécies de gramíneas forrageiras: o capim Tanzânia (*Panicum maximum*), a pensacola (*Paspalum sauræ* (Parodi) Parodi), a braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), e o azevém (*Lolium multiflorum* Lam). Para cada gramínea em estudo, foi conduzido um experimento com 8 tratamentos compostos pela inoculação dos 8 rizóbios supracitados e dois tratamentos controle, o controle NI 50, com dose de N equivalente a 50 Kg.ha<sup>-1</sup> e o controle N1 100, com dose de N equivalente a 100 Kg.ha<sup>-1</sup>.

Em casa de vegetação, as gramíneas foram semeadas em vasos plásticos de diferentes volumes. Os experimentos com capim Tanzânia e braquiária, plantas que podem atingir 1 metro de altura (Kissmann, 1997), foram conduzidos em vasos de 4 e 8 litros respectivamente. O azevém e a pensacola, plantas de menor porte, foram cultivados em vasos de 2 litros. Os vasos foram previamente flambados com álcool etílico 99%. Como substrato usou-se uma mistura de vermiculita e areia (2:1), previamente esterilizada em autoclave por 90 min a 120°C e 1atm. Após autoclavagem o substrato foi distribuído nos vasos plásticos, previamente desinfestados.



O N foi adicionado semanalmente, por meio de alíquotas de solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  com concentração de  $7,14 \text{ g.L}^{-1}$ . Nos experimentos conduzidos em vasos de 2 L (azevém e pensacola), semanalmente aplicou-se 2,5 mL da solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  por vaso nos tratamentos inoculados e no controle NI 50, enquanto no controle NI 100 aplicou-se 5 mL da solução, totalizando doses equivalentes a 50 e 100 Kg de  $\text{N.ha}^{-1}$ , respectivamente. Nos experimentos conduzidos em vasos de 4 e 8 L, as alíquotas de N foram ajustadas de acordo com o volume dos vasos. Os experimentos foram dispostos em delineamentos inteiramente casualizados, constituídos por com quatro repetições cada.

Para a produção do inóculo, os rizóbios foram inoculados em tubos com meio Levedura-Manitol (LM) a pH 6,8 (Vincent, 1970) e incubados a  $28^\circ\text{C}$  por 15 dias. Posteriormente, as culturas foram crescidas em erlenmeyers de 250 mL com 80 mL de meio de cultura LM líquido (Vincent, 1970) e colocadas em incubador orbital a  $28^\circ\text{C}$ , com agitação de 120 rpm por seis dias.

Para quebra da dormência as sementes de pensacola foram levemente escarificadas com lixa para madeira. Após, as sementes das quatro espécies estudadas foram desinfestadas por imersões sucessivas em álcool (70%) por 30 s, seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 s e sete lavagens consecutivas com água destilada esterilizada em autoclave a  $120^\circ\text{C}$  por 15 min. Em seguida, para pré-germinação, as sementes foram colocadas entre folhas de papel toalha estéril, umedecido com água destilada esterilizada, as quais foram recobertas por papel alumínio, enroladas, e colocadas na vertical dentro de um frasco de vidro contendo  $1/3$  do volume de água destilada esterilizada, de forma que as sementes foram mantidas úmidas por capilaridade. As sementes foram pré-germinadas em estufa a  $28^\circ\text{C}$  por 48 horas.

A semeadura foi realizada colocando-se 6 sementes pré-germinadas por vaso. Realizou-se o desbaste 15 dias após a emergência das plantas, deixando-se 2 plantas por vaso, exceto no experimento conduzido com braquiária, que devido à baixa germinação das sementes foi conduzido com apenas uma planta por vaso.

No dia seguinte à semeadura, foram inoculados 2 mL do caldo das culturas de rizóbios por vaso, com cerca de  $10^8$  unidades formadoras de colônia (ufc)  $\text{mL}^{-1}$ .

Nos experimentos com azevém e pensacola adicionou-se semanalmente 250 mL.vaso<sup>-1</sup> de solução nutritiva (Sarruge, 1975) isenta de N, no experimento com capim Tanzânia a adição semanal foi de 500 mL.vaso<sup>-1</sup> e no experimento com braquiária 1000 mL.vaso<sup>-1</sup>. As plantas foram colhidas 60 dias após a semeadura. Foram quantificados o número de perfilhos de cada uma das espécies e, após, separou-se a parte aérea das raízes das plantas. As raízes foram lavadas e, logo após, foi medido o volume radicular, submergindo-as completamente em proveta graduada (500 mL), com volume conhecido de água destilada. O volume das raízes foi quantificado medindo-se o volume de água deslocado na proveta após a imersão das raízes. As raízes e a parte aérea das plantas foram armazenadas separadamente em sacos de papel e colocadas para secar em estufa à 65°C até peso constante. Avaliou-se a massa seca das plantas, e posteriormente a parte aérea foi moída para quantificação do teor de nitrogênio total (Tedesco et al., 1995). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott Knott (5%), utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

Para cada tratamento inoculado foi determinado o Índice de Eficiência Relativa, adaptado de Brockwell et al. (1966), por meio do qual se expressou a capacidade dos rizóbios em promover acúmulo de massa seca total, comparativamente aos tratamentos controle. Tal índice foi calculado segundo a fórmula a seguir:

$$\text{IER (\%)} = \frac{(\text{MS Inoculado} - \text{MS Controle NI 50})}{(\text{MS Controle NI 100} - \text{MS Controle NI 50})} \cdot 100$$

onde:

IER (%) = Índice de Eficiência Relativa;

MS Inoculado = massa seca total do tratamento inoculado, com dose equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>;

MS Controle NI 50 = massa seca total do tratamento Controle NI 50 não inoculado, com adição de nitrogênio equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>;

MS Controle 2 = massa seca total do tratamento Controle NI 100 não inoculado, com adição de nitrogênio equivalente a 100 Kg de N ha<sup>-1</sup>.

### **3.5. Caracterização do DNA genômico dos rizóbios**

O DNA foi extraído de culturas crescidas em tubos com meio LM (Vincent, 1970) e incubadas a 28 °C durante 48 horas em agitação constante de 120 rpm. Utilizou-se o kit de extração Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corp., Madison, USA), seguindo-se as especificações do fabricante. A concentração de DNA foi verificada em gel de agarose 1%, com o padrão de peso molecular de 400pb (Ludwig Biotecnologia, Porto Alegre, BR), em eletroforese durante 40 min a 60V. Para visualização das bandas de DNA, a coloração das mesmas foi feita utilizando-se Blue Green (LGC Biotecnologia, São Paulo, BR). Foi registrado com aparelho fotodocumentador uma imagem das bandas, utilizando-se o programa de fotografia digital KODAK G2200.

Os rizóbios foram caracterizados utilizando-se a técnica de rep-PCR. Para isso, a reação de amplificação do DNA genômico foi realizada usando-se o nucleotídeo iniciador BOX A1 - (5' –CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'), conforme Versalovic et al. (1994), com modificações feitas por Giongo (2007). As condições empregadas no termociclador (TECHNE, modelo ENDURANCE TC-512) foram as seguintes: um ciclo inicial a 95°C por 7 min, 30 ciclos de desnaturação em 94°C por 1 min, anelamento em 53°C por 1 min e extensão em 65°C por 8 min, e um ciclo final de extensão em 65 °C por 16 min.

As amplificações foram visualizadas em gel de agarose 1,5%, submetidos à eletroforese em gel horizontal com tampão TBE 1x (Sambrook et al., 2001) por 2,5 horas a 60V, coradas com Blue Green (LGC Biotecnologia, São Paulo, BR). Foi utilizado padrão de peso de 400pb (Ludwig Biotecnologia, Porto Alegre, BR) e o gel foi visualizado em fotodocumentador e documentado com o equipamento de fotografia digital KODAK G2200.

Os tamanhos dos fragmentos foram transformados em uma matriz binária de base de dados, de maneira que 0 (zero) indica a ausência de banda e 1 (um) a presença da mesma. A similaridade genética foi calculada usando-se o coeficiente de Jaccard (i, j) e o dendrograma foi construído com base no agrupamento pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) pelo programa NTSYS 2.0.

### **3.6. Sequenciamento da região 16S rRNA.**

A extração do DNA genômico dos rizóbios foi realizada a partir de uma cultura de células multiplicadas em tubos contendo meio LM (Vincent, 1970) e incubadas a 28 °C durante 48 horas em agitação constante de 120 rpm. Seguiram-se as especificações do fabricante do kit de extração Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corp., Madison, USA).

A região 16S rRNA foi amplificada com os oligonucleotídeos 8F (AGAGTTTGATCCTTGGCTCAG) e 1492R (GCYTACCTTGTTACGACTT) (Edwards et al., 1989). Os ciclos foram: um ciclo inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos de desnaturação em 94°C por 1 min, anelamento em 55°C por 1 min, e extensão em 72°C para 2 min, e um ciclo final de extensão em 72°C por 3 min. Os fragmentos foram sequenciados, as sequências dos nucleotídeos homólogos foram pesquisadas no banco de dados mundial GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) através do programa BLASTn (Altschul, 1997) e os fragmentos analisados pelo algoritmo Megablast. As seqüências selecionadas foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW e as relações filogenéticas foram alcançadas usando o método *Neighbor-joining* realizado pelo programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sete das oito bactérias avaliadas foram capazes de produzir ácido indol-acético (AIA) quando cultivadas no meio de cultura indefinido Levedura-Manitol (LM) (Vincent, 1970), mesmo sem adição de triptofano (Tabela 2). Isto evidencia que mesmo em ambiente com pequena concentração de triptofano, naturalmente presente no meio de cultura utilizado, a maioria dos rizóbios foi capaz de produzir AIA. Em meio de cultura sem enriquecimento com triptofano, os valores médios de AIA produzido pelas bactérias variaram entre 0,2 e 4,0 $\mu\text{g}$  de AIA  $\text{mL}^{-1}$  de caldo de cultura. A estirpe SEMIA816 foi a bactéria mais produtiva (4 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), seguida pelo isolado UFRGS Lc394, com 3,2 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . Em meio de cultura LM enriquecido com 50  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$  do precursor triptofano, os rizóbios foram estimulados a produzir ácido indol-acético. A exceção foi o isolado UFRGS Lc394, o qual no meio enriquecido com triptofano não foi estimulado (Tabela 2).

A produção de AIA por rizóbios também foi observada por Osório Filho (2009) que utilizou técnicas de cromatografia líquida. Segundo o autor, as rotas de produção de AIA nas três bactérias estudadas são dependentes de triptofano, pois na ausência deste aminoácido não se observou produção de AIA. Em trabalho semelhante, Santos Júnior et al. (2008) quantificaram a produção de AIA por 24 isolados de *Pseudomonas*, obtidos de raízes de arroz e identificados como bactérias promotoras do crescimento de plantas, os quais não foram capazes de produzir AIA em meio de cultura sem triptofano e em meio enriquecido com triptofano, apenas dois isolados não produziram AIA, sendo a produção média dos demais em torno de 3,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Tabela 2.** Produção de ácido indol acético (AIA) por rizóbios crescidos por seis dias, em meio de cultura levedura manitol (LM), enriquecido ou não com triptofano.

Tratamento	AIA sem	AIA com
	Triptofano ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Triptofano ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
UFRGS Lc323	0,2d	4,2c
SEMIA816	4,0a	50,1b
UFRGS Lc336	0,5d	2,9c
UFRGS Lc348	1,1c	60,7a
UFRGS Lc524	0,4d	2,8c
UFRGS Lc134	0,0d	3,3c
UFRGS Lc510	0,8c	9,5c
UFRGS Lc394	3,2b	2,5c
UFRGS Lc522	0,9c	8,3c
UFRGS Lc443	0,3d	2,8c
CV (%)	30,8	35,7

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Cada valor representa a média de três repetições.

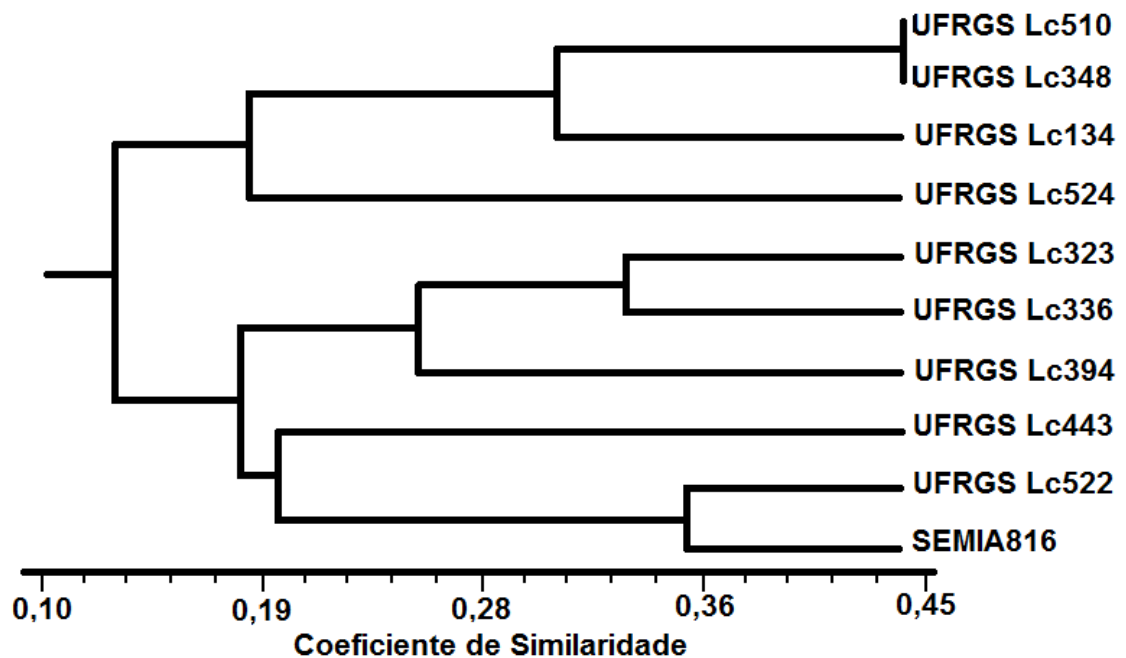
Observaram-se variações na quantidade de AIA produzido pelos diferentes isolados de rizóbios estudados (Tabela 2), principalmente em meio com adição de triptofano, sendo o isolado UFRGS Lc348 o mais produtivo ( $60,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), seguido pela estirpe SEMIA816, com  $50,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Maior produção de AIA ( $171,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), foi observada no isolado TV-13 de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* (Schlindwein et al., 2008) sendo prejudicial para o desenvolvimento de plântulas de alface. Por outro lado, os autores observaram que os isolados de *Bradyrhizobium* sp. que produziram entre  $1,2$  e  $3,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA aumentaram o vigor das plântulas em comparação com o tratamento sem inoculação. Segundo os autores, estes resultados são um efeito da influência do AIA sobre a germinação. Barazani & Friedman (1999) também relatam que rizobactérias deletérias produziram altos níveis de AIA, enquanto rizobactérias promotoras de crescimento de plantas produziram menos.

Em nosso estudo, as plantas inoculadas com os rizóbios, em experimentos em laboratório e em casa de vegetação, mostraram diferenças

quanto aos parâmetros de crescimento avaliados.

#### 4.1. Caracterização genética dos rizóbios

Com base nas amplificações do DNA genômico com o oligonucleotídeo iniciador BOX A1, foi possível a obtenção de perfis característicos para os rizóbios estudados. No perfil de bandas obtido com a amplificação do DNA genômico dos rizóbios, foram verificadas 28 unidades taxonômicas operacionais. Os resultados foram transformados em uma matriz binária de presença e ausência, e por meio do coeficiente de Jaccard foi calculada a similaridade genética entre os isolados estudados. Com base nestes resultados, montou-se o dendrograma de similaridade, o qual é apresentado na figura 2.



**Figura 2.** Dendrograma de similaridade de isolados e estirpe de rizóbios. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da PCR com o oligonucleotídeo iniciador BOX A1.

A similaridade obtida a partir da reação de PCR com o oligonucleotídeo iniciador BOX situou-se entre 12 e 35%. Observa-se que apesar de o grupo ser composto por isolados com algumas características morfológicas semelhantes, houve baixa similaridade entre os organismos avaliados em relação ao perfil de bandas obtidos com o oligonucleotídeo iniciador BOX A1. Com base nos presentes resultados, infere-se que mesmo

os isolados provenientes de mesma localidade e com características fenotípicas parecidas foram diferentes genotipicamente. Ressalta-se a existência de um novo banco de rizóbios isolados de *Lotus corniculatus*, diferentes genotipicamente da estirpe atualmente recomendada para a cultura (SEMIA816), e potencialmente exploráveis na seleção de estirpes eficientes quanto à promoção de crescimento de gramíneas.

Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos de caracterização genética de rizóbios isolados de *Lotus* spp. com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R e ERIC (ERIC1-R e ERIC-2) para amplificação do DNA genômico das bactérias (Fontoura, 2007; Frizzo, 2007; Tonon, 2008).

Ao caracterizar genotipicamente rizóbios isolados de *Lotus corniculatus*, Frizzo (2007) agrupou as bactérias de seu estudo em dois grandes grupos, com similaridade de 40%. Tonon (2008), em estudo conduzido com rizóbios isolados de *Lotus* spp., também calculou a similaridade genética entre as bactérias, valendo-se do coeficiente de Jaccard. A autora demonstrou com o uso de um dendograma o agrupamento dos perfis de bandas dos isolados e estirpes de rizóbios analisados com o algoritmo UPGMA. Observou-se a formação de dois grandes grupos que apresentaram similaridade em torno de 15% entre si.

Fontoura (2007) também observou baixa similaridade entre rizóbios eficientes quanto à fixação biológica de nitrogênio em *Lotus subbiflorus*. Na análise de agrupamento conjunto do perfil de bandas obtido com os oligonucleotídeos iniciadores BOXA1 e ERIC, os sete isolados mais eficientes apresentaram similaridade inferior a 40%. A exceção foi a similaridade entre os isolados UFRGS Ls1 e Ls14, ambos provenientes de Mostardas, os quais apresentaram similaridade de 85%.

Com o sequenciamento do produto das amplificações da região 16S DNAr com os oligonucleotídeos 8F e 1492R (Edwards et al., 1989), foram obtidas sequências de 893 a 1169 pares de bases. Comparando-se os resultados obtidos com as sequências de nucleotídeos derivadas dos genes 16S rRNA depositadas no GenBank, foi possível a identificação das bactérias em nível de gênero. A identificação mais provável dos rizóbios é mostrada na tabela 3.



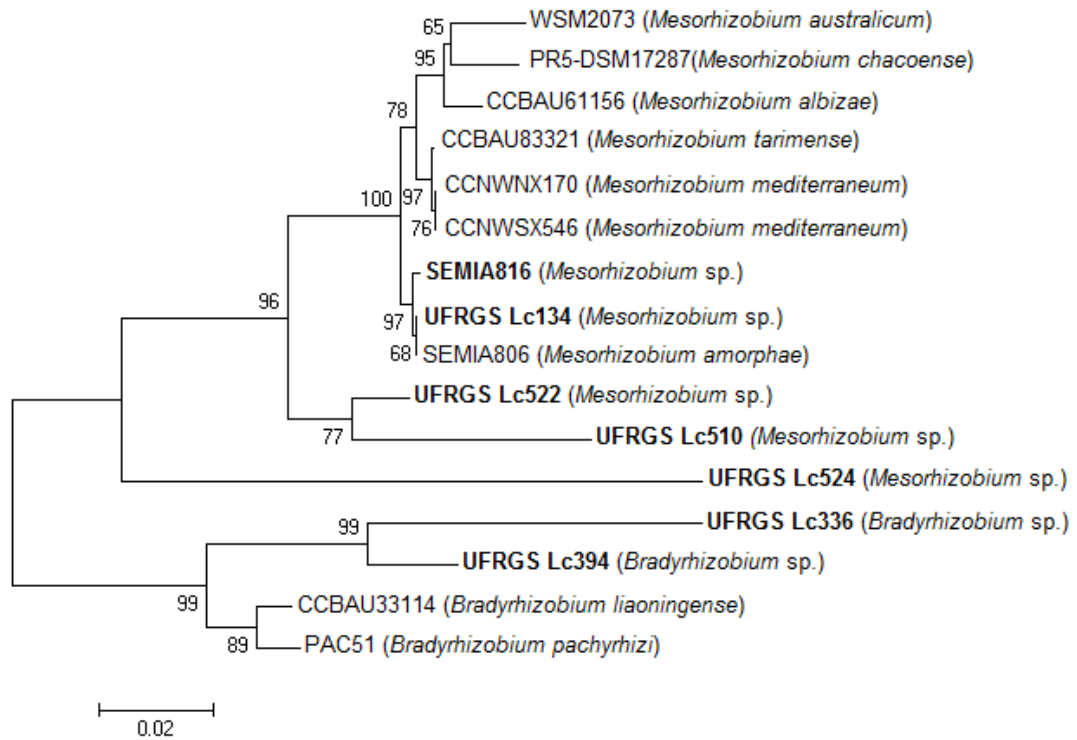
**Tabela 3.** Identificação dos rizóbios estudados pela sequência parcial dos genes 16S rRNA obtida com o programa BLASTn.

<b>Isolado</b>	<b>Verossimilhança<sup>(1)</sup></b>	<b>S<sup>(2)</sup></b>	<b>Id. (%)<sup>(3)</sup></b>	<b>Frag.<sup>(4)</sup></b>	<b>GenBank<sup>(5)</sup></b>
UFRGS Lc134	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1866	100	1399 pb	EU130444
UFRGS Lc336	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1299	99	1087 pb	HQ698304
UFRGS Lc394	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1688	95	1411 pb	AB542400
UFRGS Lc510	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1376	95	1190 pb	HQ698284
UFRGS Lc522	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1626	97	1434 pb	HQ013313
UFRGS Lc524	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1182	95	1487 pb	DQ859036
SEMIA816	<i>Mesorhizobium</i> sp.	2678	100	1450 pb	AY904737

(<sup>1</sup>)Verossimilhança, gênero do organismo que possui a sequência com a qual a sequência parcial do gene 16S rRNA do isolado em estudo apresentou maior homologia. (<sup>2</sup>)S: score, pontuação do alinhamento. (<sup>3</sup>)Id.(%): identidade, percentagem de identidade entre a sequência das estirpes estudadas e o organismo relacionado. (<sup>4</sup>)Frag.: tamanho do fragmento, tamanho da sequência consenso. (<sup>5</sup>)GenBank, número de acesso da sequência do organismo relacionado.

Os rizóbios estudados neste trabalho foram identificados como pertencentes a dois gêneros: *Mesorhizobium* sp. ao qual pertencem os isolados UFRGS Lc134, Lc510, Lc522 e Lc524 e a estirpe SEMIA816; e *Bradyrhizobium*, isolados UFRGS Lc336 e Lc394. Estes resultados foram condizentes com a caracterização morfológica dos rizóbios estudados (Tabela 1). A classificação obtida para a estirpe SEMIA816 neste trabalho, como pertencente ao gênero *Mesorhizobium*, também foi obtida nos trabalhos de Menna et al. (2006) e Toledo (2008).

Na figura 3 é apresentada a árvore filogenética obtida após o alinhamento das sequências pelo algoritmo ClustalW. As relações filogenéticas foram obtidas por meio do método *Neighbor-joining*, realizado no programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007).



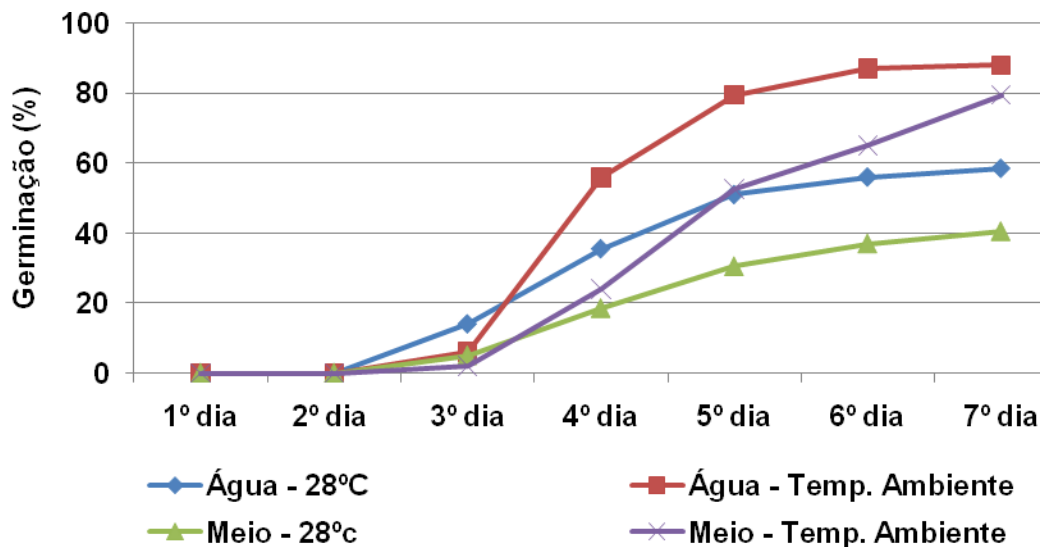
**Figura 3.** Árvore filogenética com base na análise da região 16S rRNA da estirpe SEMIA816 e dos isolados sequenciados, obtida por meio do método *Neighbor-joining*. Os números nas ramificações representam os valores de *bootstrep*.

Verifica-se na árvore filogenética a separação das bactérias estudadas em dois grupos. Em um dos grupos, as sequências da estirpe SEMIA816 e dos isolados UFRGS Lc134, Lc510 e Lc522 foram agrupadas juntamente com sequências de outras bactérias do gênero *Mesorhizobium* sp, enquanto no outro, foram agrupadas as sequências dos isolados UFRGS Lc336 e Lc394, juntamente com sequências pertencentes a bactérias do gênero *Bradyrhizobium*.

#### **4.2. Promoção de germinação em sementes de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.)**

Alguns testes de germinação de sementes de não leguminosas inoculadas com rizóbios foram conduzidos em placas de petri ou *gerbox*, onde o veículo de inoculação das bactérias foi o próprio meio de cultura levedura-manitol (LM) no qual os rizóbios foram multiplicados (Schlindwein, 2008; Osório Filho, 2009). No presente estudo, avaliou-se o efeito do meio levedura-manitol

(LM), bem como da temperatura ideal para crescimento dos rizóbios (28 °C) sobre a germinação de sementes de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.). Os resultados de germinação obtidos nos quatro tratamentos sem inoculação são apresentados na figura 4.



**Figura 4.** Germinação acumulada de sementes de azevém. Cada valor representa a média de quatro repetições, com 50 sementes por repetição.

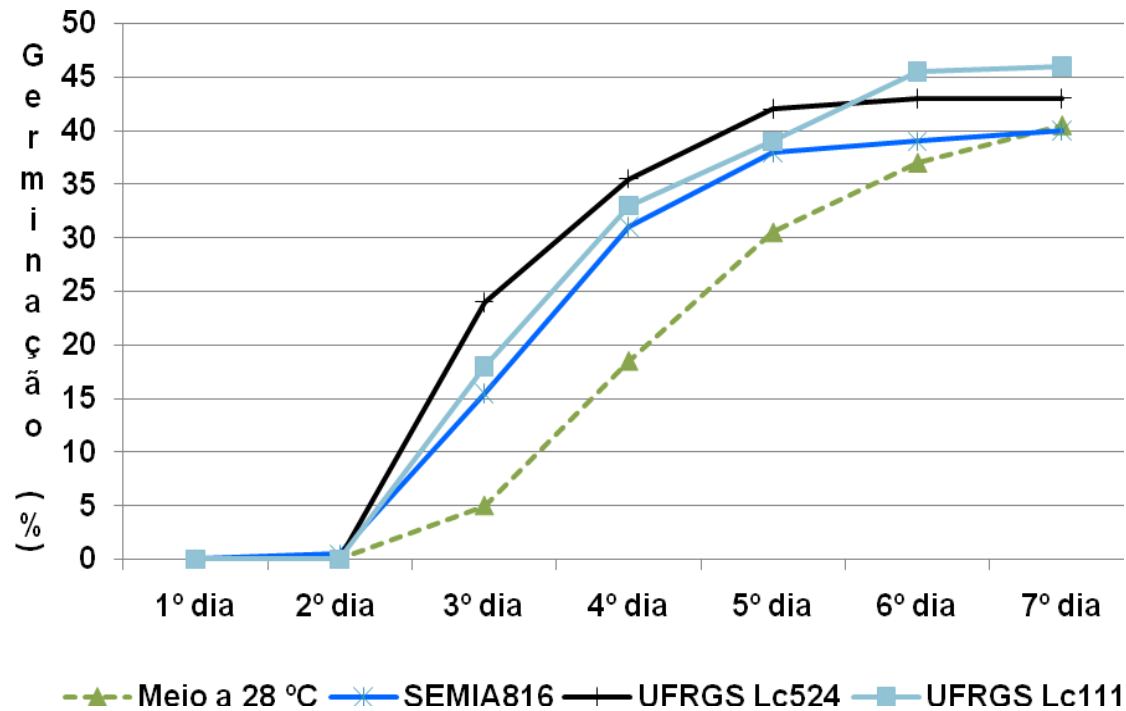
Nos dois tratamentos conduzidos a 28 °C, temperatura ideal para o crescimento dos rizóbios em laboratório, houve retardo na germinação do azevém, e a germinação acumulada foi inferior à obtida nos tratamentos conduzidos à temperatura ambiente (Figura 4).

Os melhores resultados foram obtidos no tratamento onde as sementes foram umedecidas com água e mantidas à temperatura ambiente. Sob estas condições, houve antecipação de germinação à partir do 4º dia após instalação do experimento. Provavelmente o retardamento na germinação das sementes conduzidas em meio LM possa ter sido motivado por desidratação, devido aos sais constituintes do meio.

Para os próximos testes de germinação, sugere-se que após o período de incubação em meio de cultura LM, o inóculo seja diluído em água destilada esterilizada, para posterior inoculação às sementes, bem como a condução dos experimentos em temperaturas ideais à germinação das culturas estudadas, e não aos rizóbios.

Na figura 5 é comparada a germinação acumulada de três tratamentos inoculados com o tratamento controle, umedecido com meio de

cultura LM e conduzido em câmara de crescimento a 28 °C.



**Figura 5.** Porcentagem de germinação acumulada obtida ao longo de sete dias após inoculação dos rizóbios nas sementes de azevém. Cada valor representa a média de quatro repetições, com 50 sementes por repetição. Meio a 28 °C: tratamento controle, meio de cultura conduzido em câmara de crescimento a 28 °C.

Em todos os tratamentos inoculados os rizóbios promoveram antecipação de germinação comparativamente ao tratamento não inoculado. Este fenômeno foi mais evidente no terceiro dia após a instalação do experimento, quando a germinação acumulada das sementes dos tratamentos inoculados foi superior à germinação das sementes não inoculadas em três vezes ou mais. Do quarto ao sexto dia de avaliação as sementes inoculadas mantiveram-se com maior porcentagem de germinação, porém com menor diferença para as sementes do tratamento controle. No sétimo dia a porcentagem de germinação foi praticamente a mesma em todos os tratamentos (Figura 5).

A constatação da antecipação de germinação de gramíneas devido à presença de fitohormônios não é uma descoberta recente. Um dos primeiros estudos de estímulo de germinação de gramíneas com fitohormônios foi realizado em 1940, no qual Hayashi verificou que em arroz e cevada, a

aplicação de giberelina promoveu antecipação na germinação e aumento na taxa de crescimento. Esta maior precocidade das sementes induzida pelos rizóbios pode estar associada a vantagens na competição por nutrientes e água, sendo que nos estágios iniciais de crescimento das plântulas e estabelecimento das pastagens, estas vantagens podem significar importante favorecimento das plântulas de azevém quando em competição com outras espécies que não sejam estimuladas pelos rizóbios.

#### **4.3. Promoção de crescimento das gramíneas estudadas por inoculação com rizóbios**

As plantas de pensacola (*Paspalum saurae* (Parodi) Parodi) inoculadas com a estirpe SEMIA816 e com os rizóbios UFRGS Lc134, Lc336 e Lc394, produziram massa seca de folhas e rizomas e massa seca de raízes superiores às do Controle NI 50 e equivalentes às plantas do Controle NI 100. A massa seca radicular dos tratamentos UFRGS Lc323 e Lc348 também foi superior à obtida no Controle NI 50 e equivalentes ao NI Controle 100 (Tabela 4).

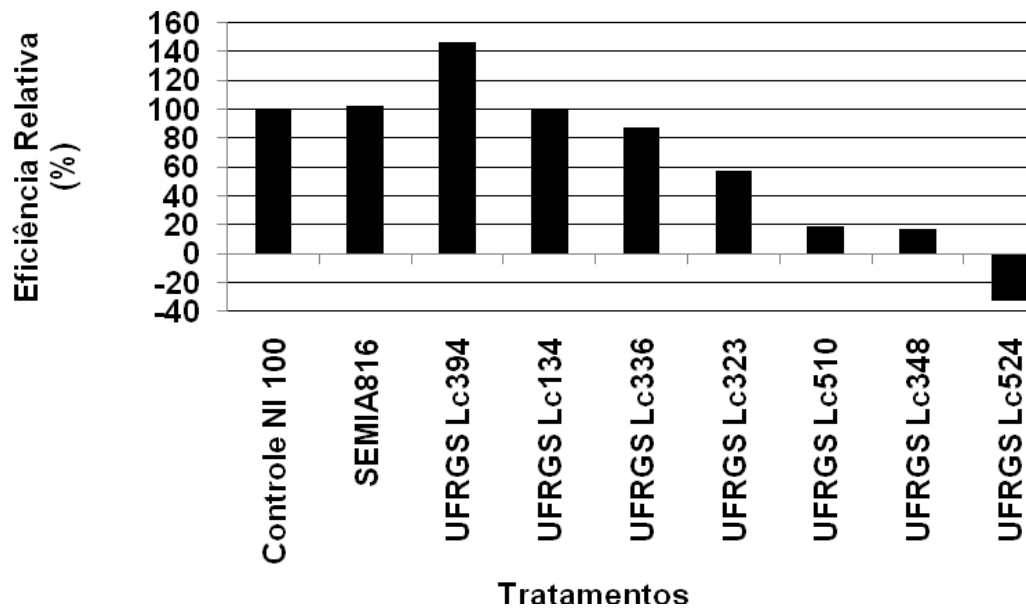
Sabe-se que os rizomas são órgãos importantes para a reprodução vegetativa ou assexuada de diversas espécies vegetais, entre elas a pensacola. Deste modo, particularmente, o incremento na massa de rizomas e folhas, obtido nas plantas inoculadas com os rizóbios SEMIA816, UFRGS Lc134, UFRGS Lc336 e UFRGS Lc394 (Tabela 4) poderia significar um benefício importante, devido ao fato de rizomas mais vigorosos e bem nutridos serem capazes de produzir brotações com as mesmas características em um menor período.

Na figura 6 é apresentado o índice de eficiência relativa dos rizóbios quanto à promoção de acúmulo de massa seca total em pensacola.

**Tabela 4.** Produção de massa seca da parte aérea (incluindo folhas e rizomas), massa seca de raízes, volume radicular, número de perfilhos e Nitrogênio total da parte aérea de plantas de pensacola (*Paspalum saurae* (Parodi) Parodi) inoculadas com rizóbios e avaliadas 60 dias após germinação. Médias de quatro repetições, com duas plantas por repetição.

<b>Tratamentos</b>	<b>Massa seca da parte aérea</b> ----- <b>(g)</b> -----	<b>Massa seca de raízes</b>	<b>Volume radicular</b>  <b>(cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Número de perfilhos</b>	<b>Nitrogênio total na parte aérea</b>  <b>(mg)</b>
Controle NI 50	3,4 b	2,5 c	33 b	12,0 c	67,6 b
Controle NI 100	4,2 a	3,1 b	41 b	16,0 a	110,1 a
SEMIA816	3,9 a	3,5 a	54 a	10,3 c	71,1 b
UFRGS Lc134	4,1 a	3,2 b	38 b	13,5 b	69,0 b
UFRGS Lc323	3,5 b	3,2 b	35 b	10,3 c	65,9 b
UFRGS Lc336	4,0 a	3,1 b	40 b	11,0 c	76,0 b
UFRGS Lc348	3,1 b	3,0 b	31 b	9,3 c	65,8 b
UFRGS Lc394	4,4 a	3,6 a	53 a	10,0 c	74,4 b
UFRGS Lc510	3,6 b	2,6 c	31 b	10,5 c	75,1 b
UFRGS Lc524	3,1 b	2,4 c	36 b	9,3 c	65,7 b
CV (%)	9,7	9,8	14,5	10,8	18,9

Controle NI 50: tratamento não inoculado com adição do equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>; Controle NI 100: tratamento não inoculado com adição do equivalente a 100 Kg de N ha<sup>-1</sup>; Todos os tratamentos inoculados receberam adição de N, equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>; Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Para fins de análise estatística, os valores do número de perfilhos foram transformados ((X + 1)<sup>0,5</sup>)



**Figura 6.** Índice de eficiência relativa (IER %) dos rizóbios quanto ao aumento de massa seca de pensacola.

Os índices de eficiência relativa (IER%) quanto à promoção de crescimento de plantas de pensacola, apresentados na figura 6, são referentes à percentagem de massa seca total das plantas inoculadas em relação aos tratamentos controle, e no caso da inoculação de rizóbios em pensacola foram muito variáveis, oscilando de – 32 a 146%. O destaque foi o isolado UFRGS Lc394, que apresentou IER% de 146%. Os rizóbios SEMIA816, UFRGS Lc134, e UFRGS Lc336 também foram eficientes, alcançando IER acima de 80%.

No tratamento inoculado com o isolado UFRGS Lc323 observou-se IER intermediário, enquanto os rizóbios UFRGS Lc348, Lc510 e Lc524 foram ineficientes.

No experimento com capim Tanzânia em casa de vegetação, observou-se resposta à inoculação com rizóbios. Houve estímulo na produção de massa seca da parte aérea, massa seca e volume radicular e teor de nitrogênio total da parte aérea (Tabela 5). As plantas também foram avaliadas quanto ao número de folhas e número de perfilhos por planta, porém quanto a estes parâmetros não houve diferenças dos tratamentos inoculados para os não inoculados.

**Tabela 5.** Produção de massa seca da parte aérea, massa seca de raízes, volume radicular, e Nitrogênio total da parte aérea de capim Tanzânia (*Panicum maximum*) inoculado com rizóbios e avaliado 60 dias após germinação. Média de quatro repetições, incluindo duas plantas por repetição.

Tratamentos	Massa	Massa	Volume	Nitrogênio
	seca da parte aérea	seca de raízes	radicular	total na parte aérea
	------(g)-----		(cm <sup>3</sup> )	(mg)
NI 50	5,6 b	3,0 b	49 b	61,1 c
NI 100	6,7 a	3,3 b	61 a	100,0 a
SEMIA816	6,6 a	3,7 a	63 a	74,7 b
UFRGS Lc134	6,5 a	3,6 a	58 a	61,5 c
UFRGS Lc323	6,6 a	3,7 a	68 a	77,6 b
UFRGS Lc336	6,1 b	4,0 a	67 a	69,4 b
UFRGS Lc348	6,3 a	4,1 a	70 a	64,3 c
UFRGS Lc394	5,8 b	3,1 b	47 b	62,3 c
UFRGS Lc510	6,8 a	3,7 a	61 a	63,0 c
UFRGS Lc524	6,4 a	3,6 a	60 a	65,9 c
C.V. (%)	7,1	14,2	13,2	9,0

NI 50: tratamento não inoculado com adição do equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>; NI 100: tratamento não inoculado com adição do equivalente a 100 Kg de N ha<sup>-1</sup>; Todos os tratamentos inoculados receberam adição de N, equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>; Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

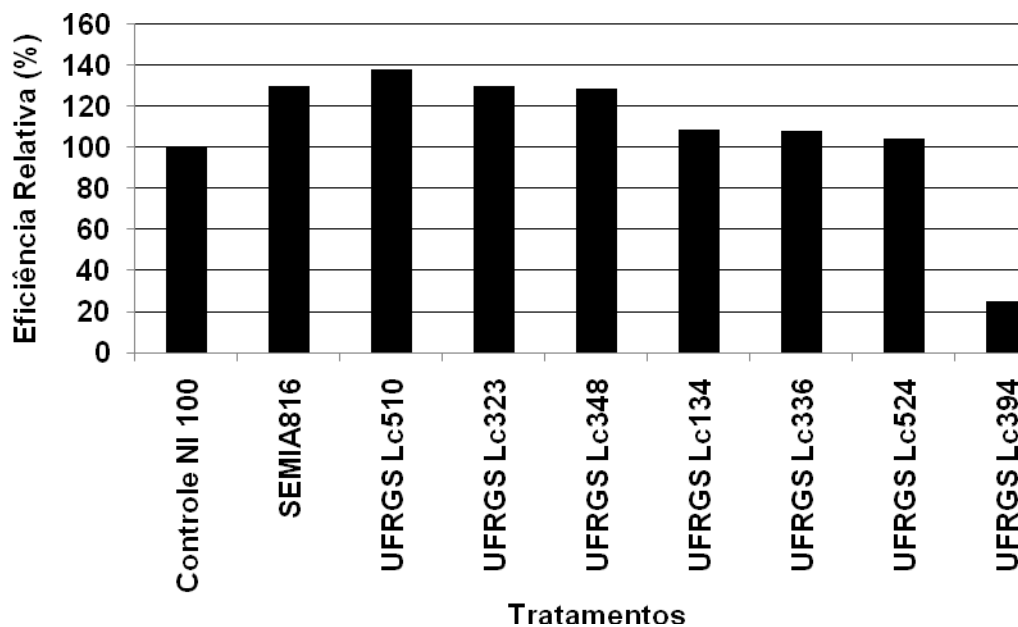
As plantas de capim Tanzânia inoculadas com a estirpe SEMIA816 e com os isolados UFRGS Lc134, Lc323, Lc348, Lc510 e Lc524 produziram massa seca da parte aérea superior à das plantas do tratamento NI 50 com a mesma dose de N (50 kg.ha<sup>-1</sup>), e equivalente às plantas do SI 100 (Tabela 5). Os rizóbios SEMIA816, UFRGS Lc134, Lc323, Lc336, Lc348, Lc510 e Lc524 também estimularam as raízes das plantas, produzindo maior massa seca radicular e mesmo volume radicular do que as plantas do NI 100 (Tabela 5). Com exceção do isolado UFRGS Lc394, todos os rizóbios estimularam o



crescimento das plantas, mesmo o que não produziu AIA em meio LM não enriquecido com triptofano (UFRGS Lc134) e os que produziram baixas quantidades (UFRGS Lc336 e UFRGS Lc323).

Também observou-se que apesar de não serem capazes de fixar biologicamente nitrogênio atmosférico em gramíneas, os rizóbios UFRGS Lc323, Lc 336 e SEMIA816 promoveram maior acúmulo de nitrogênio total da parte aérea das plantas de capim Tanzânia. Provavelmente este efeito está associado ao estímulo que estes organismos empregaram às raízes.

Na figura 7 é apresentado o gráfico referente ao índice de eficiência relativa (IER %) do acúmulo de massa seca de plantas, promovido por rizóbios nativos e pela estirpe SEMIA816 em capim Tanzânia.



**Figura 7.** Índice de eficiência relativa (IER %) dos rizóbios quanto ao aumento de massa seca de capim Tanzânia.

Todos os rizóbios, exceto o isolado UFRGS Lc394, apresentaram índices acima de 100%, superando o tratamento controle NI 100. Com estes resultados, demonstra-se que estes isolados e a estirpe SEMIA816 foram capazes de promover o crescimento das plantas de capim Tanzânia, aumentando a massa vegetal das plantas inoculadas.

No experimento em casa de vegetação com inoculação de rizóbios em braquiária, observou-se que os isolados UFRGS Lc336, Lc348 e Lc524

promoveram maior precocidade das plantas, visto que a emissão de panículas foi superior à verificada nos outros tratamentos. A inoculação com os rizóbios nativos UFRGS Lc348 e UFRGS Lc524 também induziu maior emissão de folhas e perfilhos, comparativamente ao tratamento controle NI 50 (Tabela 6).

Quanto à massa seca da parte aérea, massa seca e volume radicular, bem como o teor de N total da parte aérea das plantas de braquiária, não houve efeito positivo nos tratamentos inoculados. Não obteve-se diferença dos tratamentos inoculados para o tratamento controle NI 50 quanto à massa seca da parte aérea, já o tratamento controle NI 100, com o dobro da dose de N foi superior aos demais tratamentos (Tabela 6).

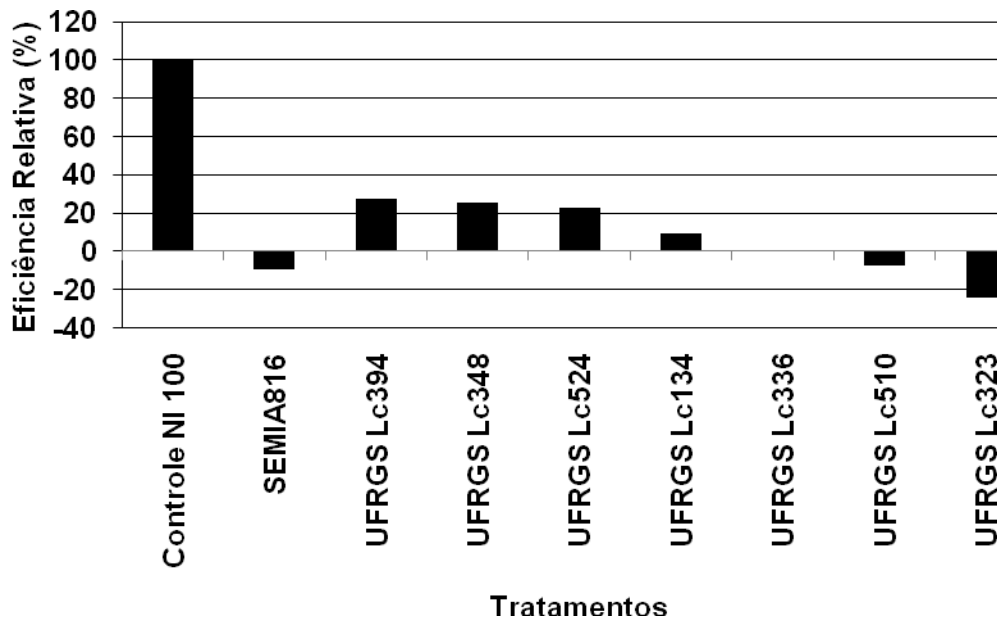
Também não houve diferença quanto aos resultados de massa seca e volume radicular obtidos nos tratamentos no experimento com inoculação de rizóbios em braquiária, inclusive entre os tratamentos controle NI 50 e NI 100. Possivelmente isto deva-se à limitação física imposta ao crescimento radicular pelo cultivo em vasos. Apesar de utilizar-se vasos com 8 litros de volume, ao final dos 60 dias de cultivo verificou-se que os ápices radiculares estavam adensadas no fundo dos vasos.

Na figura 8 é apresentado o gráfico referente ao índice de eficiência relativa (IER%) do acúmulo de massa seca de plantas, promovido por rizóbios nativos e pela estirpe SEMIA816 em braquiária. O IER de todos os tratamentos inoculados foi inferior a 40%, o que significa que os rizóbios estudados não promoveram significativos acúmulos de massa vegetal quando inoculados em braquiária.

**Tabela 6.** Produção de massa seca da parte aérea, massa seca de raízes, volume radicular, Nitrogênio (N) total da parte aérea, número de folhas (Fl.), número de perfilhos (Perf.) e número de panículas (Pan.) por planta de braquiária (*Brachiaria decumbens*) inoculada com rizóbios e avaliada 60 dias após germinação. Média de quatro repetições, com uma planta por repetição.

Tratamentos	Massa seca da parte aérea	Massa seca de raízes	Volume radicular	N total na parte aérea	Fl.	Perf.	Pan.
	------(g)-----		(cm <sup>3</sup> )	(mg)	----- planta <sup>-1</sup> -----		
NI 50	9,5 b	9,2 a	131,8 a	100,0 b	45,3 c	6,7 c	0,0 b
NI 100	13,8 a	10,0 a	148,5 a	186,5 a	61,3 a	7,9 a	0,8 b
SEMIA816	10,4 b	7,9 a	126,0 a	84,2 c	40,5 c	6,4 c	0,8 b
UFRGS Lc134	9,5 b	9,7 a	192,3 a	75,2 c	44,8 c	6,7 c	0,0 b
UFRGS Lc323	10,0 b	7,6 a	105,8 a	96,7 b	43,5 c	6,6 c	0,0 b
UFRGS Lc336	10,3 b	8,5 a	137,3 a	91,9 b	41,8 c	6,5 c	2,0 a
UFRGS Lc348	10,6 b	9,4 a	141,8 a	97,8 b	51,3 b	7,2 b	2,0 a
UFRGS Lc394	9,8 b	10,4 a	149,8 a	77,4 c	43,3 c	6,6 c	0,0 b
UFRGS Lc510	9,6 b	8,8 a	137,3 a	81,3 c	36,0 c	6,1 c	0,0 b
UFRGS Lc524	10,6 b	9,3 a	153,0 a	91,1 b	49,3 b	7,1 b	1,3 a
C.V. (%)	9,5	14,3	21,6	13,1	13,9	6,6	25,4

NI 50: tratamento não inoculado com adição do equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>; NI 100: tratamento não inoculado com adição do equivalente a 100 Kg de N ha<sup>-1</sup>; Todos os tratamentos inoculados receberam adição de N, equivalente a 50 Kg ha<sup>-1</sup>; Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Cada valor representa a média de quatro repetições, com uma planta por repetição. Os dados de folhas, panículas e perfilhos foram transformados, conforme a fórmula  $(X + 1)^{0,5}$ .



**Figura 8.** Índice de eficiência relativa (IER %) dos rizóbios quanto ao aumento de massa seca de braquiária.

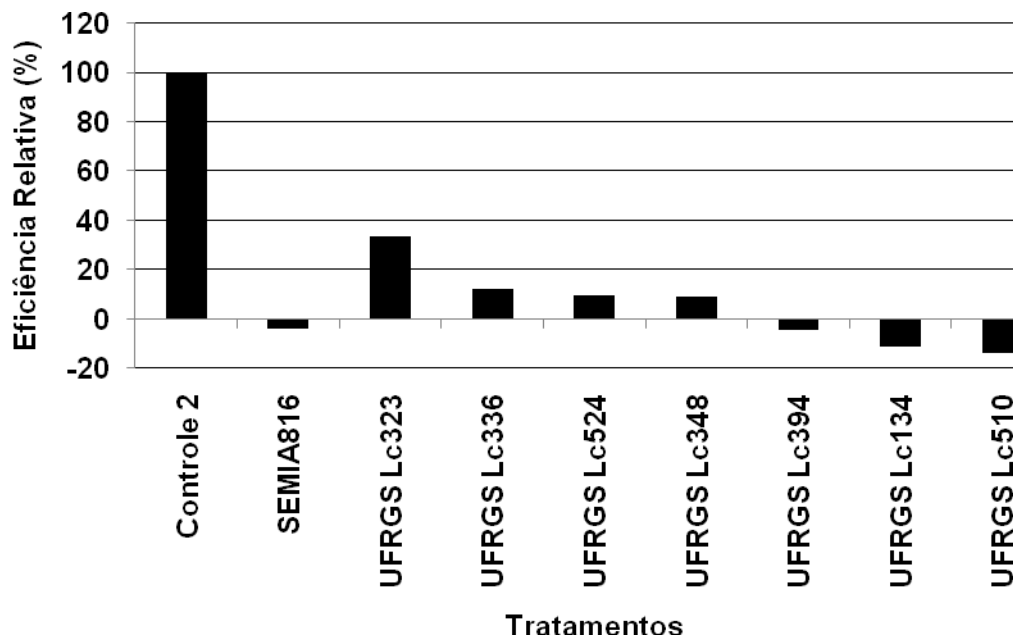
No experimento conduzido em casa de vegetação com inoculação de rizóbios em azevém, não observou-se incremento no acúmulo de massa seca de plantas nos tratamentos inoculados, comparativamente ao controle NI 50. Também não foram notadas diferenças entre os tratamentos inoculados e o controle NI 50 quanto ao número de perfilhos por planta e acúmulo de N total da parte aérea. No tratamento inoculado com o isolado UFRGS Lc323 observou-se maior volume radicular em comparação ao NI 50, porém este incremento no volume radicular das plantas não ocasionou maior acúmulo de N total da parte aérea (Tabela 7).

**Tabela 7.** Produção de massa seca da parte aérea, massa seca de raízes, volume radicular, número de perfilhos (Perf.) e Nitrogênio total da parte aérea de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) inoculado com rizóbios e avaliado 60 dias após germinação. Média de quatro repetições, incluindo duas plantas por repetição.

<b>Tratamentos</b>	<b>Massa seca da parte aérea</b>	<b>Massa seca de raízes</b>	<b>Volume radicular</b>	<b>Perfilhos</b>	<b>Nitrogênio total na parte aérea</b>
	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(mL)</b>	<b>planta<sup>-1</sup></b>	<b>(mg)</b>
NI 50	3,3 b	3,1 a	38,3 b	8,3 b	10,0 b
NI 100	6,4 a	5,9 a	52,7 a	12,6 a	24,4 a
SEMIA816	3,5 b	2,7 a	36,7 b	8,8 b	11,0 b
UFRGS Lc134	2,6 b	3,1 a	36,7 b	7,0 b	7,8 b
UFRGS Lc323	3,9 b	4,5 a	53,3 a	9,5 b	12,0 b
UFRGS Lc336	3,8 b	3,3 a	34,7 b	9,1 b	11,3 b
UFRGS Lc348	3,0 b	3,9 a	38,3 b	8,8 b	10,6 b
UFRGS Lc394	3,1 b	3,1 a	39,3 b	9,0 b	9,7 b
UFRGS Lc510	2,9 b	2,7 a	36,7 b	8,0 b	8,5 b
UFRGS Lc524	3,3 b	3,7 a	42,5 b	8,0 b	11,0 b
CV (%)	15,1	29,15	10,83	13,1	14,5

NI 50: tratamento não inoculado com adição do equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>; NI 100: tratamento não inoculado com adição do equivalente a 100 Kg de N ha<sup>-1</sup>; Todos os tratamentos inoculados receberam adição de N, equivalente a 50 Kg de N ha<sup>-1</sup>; Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Cada valor representa a média de quatro repetições, com duas plantas por repetição. Os dados do número de perfilhos foram transformados, conforme a fórmula  $(X + 1)^{0,5}$ .

Na figura 9 é apresentado o gráfico referente ao índice de eficiência relativa (IER%) do acúmulo de massa seca de plantas, promovido por rizóbios nativos e pela estirpe SEMIA816 em azevém. O IER de todos os tratamentos inoculados foi inferior a 40%, o que significa que os rizóbios estudados não promoveram significativos acúmulos de massa vegetal quando inoculados em azevém.



**Figura 9.** Índice de eficiência relativa (IER %) dos rizóbios quanto ao aumento de massa seca de azevém.

Observa-se que houve maior acúmulo de massa seca vegetal nas plantas de pensacola e capim Tanzânia inoculadas com a estirpe SEMIA816 e os isolados UFRGS Lc134, Lc323, Lc336 e Lc348 comparativamente ao controle NI 50 (Tabelas 4 e 5). Os isolados UFRGS Lc336 e Lc348 também promoveram maior número de panículas em braquiária (Tabela 6). O isolado UFRGS Lc524 causou efeito positivo no acúmulo de massa seca de capim Tanzânia e também maior número de panículas e número de perfilhos em braquiária. Os isolados UFRGS Lc394 e Lc510 aumentaram o acúmulo de massa seca de pensacola e capim Tanzânia, respectivamente. Com isso, todos os rizóbios estudados promoveram o crescimento e/ou o desenvolvimento de ao menos uma das gramíneas forrageiras (Tabelas 4, 5 e 6). Outros autores também observaram a capacidade de rizóbios em promover o crescimento de gramíneas e outras não leguminosas (Noel et al., 1996; Biswas, 2000; Kravchenko et al., 2002; Prithviraj et al., 2003; Matiru & Dakora, 2004; Silveira, 2008; Osório Filho, 2009; Etesami et al., 2009).

Mesmo os rizóbios que apresentaram baixa produção de AIA (UFRGS Lc336 e UFRGS Lc323) ou nenhuma produção em meio não enriquecido com triptofano (UFRGS Lc134), estimularam o crescimento de plantas, provavelmente devido à produção de outros fitoestimuladores que não

foram estudados neste trabalho mas também são produzidas por rizóbios, tais como citocininas (Persello-Cartieaux et al., 2003), giberelinas (Yanni et al., 2001; Erum & Bano, 2008), ácido abscísico (Dangar & Basu, 1991), lipooligosacarídeos (LCOs) (Prithviraj et al., 2003; Miransari & Smith, 2009) e lumicromo (Volpin & Phillips, 1998).

Resultados semelhantes foram obtidos em trabalho conduzido por Santillana et al.,(2005), no qual os autores verificaram efeito positivo de duas cepas do gênero *Rhizobium* na germinação e no crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). Estas rizobactérias são promotoras de crescimento de tomate, e as possíveis alternativas para a redução do uso de fertilizantes químicos. Em trabalho conduzido por Yanni et al. (2001) também houve efeito positivo de rizóbios em diferentes variedades de arroz, entre outros benefícios, foi relatada maior produção de biomassa vegetativa nas plantas inoculadas, a qual provavelmente está relacionada à modulação da arquitetura radicular das plantas pelos rizóbios e melhor exploração da rizosfera.

É interessante destacar os resultados obtidos com a inoculação do isolado UFRGS Lc394 em pensacola (Tabela 4) e capim Tanzânia (Tabela 5). Com a inoculação do Lc394 em pensacola obteve-se o maior índice de eficiência relativa (IER%) em acúmulo de massa seca total, superando-se inclusive o controle NI 100. Porém o isolado UFRGS Lc394 não foi eficiente em promover crescimento de capim Tanzânia, não diferindo do tratamento controle NI 50, e tendo desempenho inferior a todos os outros tratamentos inoculados. Com base nos presentes resultados, infere-se que houve diferentes níveis de compatibilidade nas interações entre gramíneas e rizóbios, bem como diferentes respostas das gramíneas às inoculações. Resultados semelhantes foram observados por Osório Filho (2009), que identificou na relação entre diferentes cultivares de arroz e rizóbios, materiais genéticos mais responsivos à inoculação com determinadas bactérias, os quais expressaram grande potencial para a produção de inoculantes comerciais com rizóbios.

A inserção de rizóbios promotores de crescimento de gramíneas em sistemas de rotação de culturas representa uma importante inovação biotecnológica, de baixo custo e menor impacto ambiental. Sabe-se muito pouco sobre o comportamento de gramíneas forrageiras quando em

associação com rizóbios, e também sobre a infectividade e compatibilidade das interações. Desta forma, os estudos de seleção de rizóbios compatíveis com espécies exploráveis em sistemas de sucessão ou consorciação com leguminosas são de grande importância, e surgem como possíveis alternativas para melhorar a sustentabilidade econômica e ecológica das pastagens, na medida em que forem eficientes a ponto de possibilitar uma redução na necessidade de fertilizantes químicos sem prejuízos no rendimento das culturas.



## 5. CONCLUSÕES

1 - A estirpe SEMIA816 e os isolados UFRGS Lc134, Lc510, Lc522 e Lc524 são pertencentes ao gênero *Mesorhizobium*, e os isolados UFRGS Lc336 e Lc394 ao gênero *Bradyrhizobium*.

2 - Todos os rizóbios estudados produzem AIA em meio de cultura LM (Vincent, 1970).

3 - A inoculação com os rizóbios estudados, em condições de laboratório, antecipa a germinação de sementes de azevém.

4 - A estirpe SEMIA816 e o isolado UFRGS Lc134 promovem crescimento vegetal em plantas de pensacola e capim Tanzânia.

5 - Os isolados UFRGS Lc336 e Lc394 promovem crescimento vegetal em plantas de pensacola.

6 - A estirpe SEMIA816 e os isolados UFRGS Lc323 e Lc336 promovem maior acúmulo de nitrogênio total e crescimento da parte aérea de capim Tanzânia, enquanto os isolados UFRGS Lc323, Lc348, Lc510 e Lc524 promovem crescimento vegetal em plantas de capim Tanzânia.

7 - Os isolados UFRGS Lc348 e Lc524 aumentam o número de folhas, perfilhos e panículas de braquiária.

8 - Em azevém a inoculação com os rizóbios estudados não promove o crescimento de plantas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-MALLAH, M. K.; DAVEY, M. R.; COCKING, E. Formation of nodular structures on rice seedlings by rhizobia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 40, p. 473-478, 1989.
- ALVIM, M. J. et al. Efeito da aplicação de nitrogênio em pastagens de azevém sobre a produção de leite. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 18, p. 21-31, 1989.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANDERSON, I. C. Plant characteristic that affect yeld. In: HYBRID CORN INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, 22., 1967, [S.I.]. **Proceedings...** Washington, 1967. p. 71-73.
- ANTOUN, H. et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effects on radishes (*Raphanus sativus* L.) **Plant and Soil**, The Hague, v. 204, p. 57-67, 1998.
- ARAÚJO, A. A. **Melhoramento das pastagens**. Porto Alegre: Sulina, 1965. 148 p.
- ARORA, N. K.; KANG, S. C.; MAHESHWARI, D. K. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. **Current Science**, Bangalore, v. 81, n. 6, p. 673-677, 2001.
- ASGHAR, H. N. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 231-237, 2002.
- BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, p. 2397-2406, 1999.
- BASTIÁN, F. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 24, p. 7-11, 1998.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R.; PEREIRA, J. M. C. Potencial forrageiro de acessos do gênero *Paspalum* no ensaio de 1993/94. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32., 1995, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1995, p. 62-64.

BELIMOV, A. et al. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 642-652, 2001.

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

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.

BURTON, G. W.; MULLINIX, B. G. Yield distributions of spaced plants within pensacola bahiagrass populations developed by recurrent restricted phenotypic selection. **Crop Science**, Madison, v. 38, p. 333-336, 1998.

CABALLERO-MELLADO, J. Microbiología agrícola y interacciones microbianas con plantas. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México D. F., v. 48, p. 154-161, 2006.

CANTARUTTI, R. B.; BODDEY, R. M. Transferência de nitrogênio das leguminosas para as gramíneas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 1997, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997, p. 431-446.

CARVALHO, M. M. Fixação biológica como fonte de nitrogênio para pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE CALAGEM E ADUBAÇÃO DE PASTAGENS, 1986, Nova Odessa. **Anais...** Piracicaba: Potafos, 1986, p. 125-143.

CHABOT, R. H et al. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2767-2772, 1996.

CHARENTREUIL, C. et al. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5437-5477, 2000.

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

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

DAKORA, F. D. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 158, p. 39-49, 2003.

DANGAR, T. K.; BASU, P. S. Abscisic acid production in culture by some *Rhizobium* spp. of leguminous trees and pulses. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 36, p. 527-532, 1991.

DEUBEL, A.; MERBACH, W. Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. In: BUSCOT, F.; VARMA, A. **Microorganisms in soils: roles in genesis and functions**, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. p. 177-191.

EDWARDS, U. et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, p. 7843-7853, 1989.

EKLÖF, S. et al. Transgenic tobacco plants co-expressing *Agrobacterium iaa* and *ipt* genes have wild-type hormone levels but display both auxin- and cytokinin-overproducing phenotypes. **Plant Journal**, Oxford, v. 23, p. 279-284, 2000.

EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 28, p. 377–381, 1999.

ERUM, E.; BANO, A. Variation in phytohormone production in *Rhizobium* strains at different altitudes of north areas of Pakistan. **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 10, p. 536-540, 2008.

ETESAMI, H.; ALI ALIKHANI, H.; ALI AKBARI, A. Evaluation of plant growth hormones production (IAA) ability by Iranian soils rhizobial strains and effects of superior strains application on wheat growth indexes. **World Applied Sciences Journal**, Babol, v. 6, p. 1576-1584, 2009.

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 2000. 145 p.

FONTINELI, P. R. S. Azevém anual. In: ENCONTRO DE INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA DO PLANALTO MÉDIO RIO-GRANDENSE, 1984, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 1984. p. 134-150.

FONTOURA, R. A. **Seleção de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus***. 2007. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FRIZZO, M. L. S. **Seleção e Caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr**. 2007. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GIONGO, A. **Diversidade de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum* que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul.** 2007.168 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GORDON, S. A.; WEBER, P. R. Colorimetric estimation of indolacetic acid. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 26, p. 192-195, 1951.

GOUWS, L. M. **The molecular analysis of the effects of lumichrome as a plant growth promoting substance.** 2009. 161 p. Dissertation (present for the degree of Doctor of Philosophy) – Stellenbosch University, Stellenbosch, 2009.

GUTIERREZ-ZAMORA, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays*). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 117-126, 2001.

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

HAYASHI, T. Biochemical studies on “Bakanae” fungus on rice, part 6: Effect of gibberellin on the activity of amylase in germinated cereal grains. **Journal of Agricultural Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 16, p. 531-538, 1940.

JANK, L. Potencial do gênero *Panicum*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FORRAGEIRAS E PASTAGENS, 11., 1994, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1994. p. 25-31.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. Nod factor [Nod Bj V (C18:1, MeFuc)] and lumichrome enhance photosynthesis and growth of corn and soybean. **Journal of Plant Physiology**, Minneapolis, v. 185, p. 1342-1351, 2008.

KISSMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas.** t. 1 - 2. ed., São Paulo: BASF, 1997. 825 p.

KRAVCHENKO, L. V. et al. The effect of tryptophan present in plant root exudates on phytostimulating activity of rhizobacteria. **MAIK Nauka/Interperiodica - Microbiology**, Moscow, v. 73, p. 156-158, 2004.

LAMBRECHT, M. et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, p. 298-300, 2000.

LASCANO, C. E. Caracterización de las pasturas para maximizar producción animal. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Mayaguez, v. 10, p. 126-132, 2002.

LEBUHN, M.; HEULIN, T.; HARTMANN, A. Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 22, p. 325-334, 1997.

- LEMOS, M. T. O. **Prospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em quatro espécies arbóreas nativas do Brasil**. 2009. 72 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- LEMOS, R. A. A. et al. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, p. 507-510, 1998.
- LÓPEZ, J.; PRESTES, P. J. Q.; MAGALHÃES, E. A curva de crescimento e a composição em carboidratos solúveis, estruturais, lignina e proteína e a digestibilidade em cornichão. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE PASTAGENS, 9., 1965, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Alarico, 1966. p. 851-887.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3. ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 608 p.
- LUNDEGARDH, H.; STENLID, G. The exudation of nucleotides and flavanones from living roots. **Arkiv för Botanik**, Stockholm, v. 31, p. 1-27, 1944.
- MA, W.; GUINEL, F.; GLICK, B. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4396-4402, 2003.
- MARCHIORO, L. E. T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- MATIRU, V. N.; DAKORA, F. D. Potencial use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 3, p. 1-7, 2004.
- MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 315-332, 2006.
- METIVIER, J. R. Giberelinas. In: FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal**. v. 2, São Paulo: EDUSP, 1986. p. 129-161.
- MIRANSARI, M.; SMITH, D. Rhizobial lipo-chitooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. **Biotechnology**, Faisalabad, v. 8, p. 270-275, 2009.
- MISHRA, R. P. N. et al. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 383-389, 2006.

MISLEVY, P. Forages for grazing systems in warm climates. In: McDOWELL, L. R. **Nutrition of grazing ruminants in warm climates**. Orlando: Ademic Press, 1985. p. 73-102.

MORAES, A.; MARASCHIN, G. E.; NABINGER, C. Pastagens nos ecossistemas de clima subtropical: Pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32., 1995, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1995, p. 147-200.

MOURA, R. A. et al. **Técnicas de laboratório**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1987.

NEILANDS, J. B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, p. 26723-26726, 1995.

NOEL, T. C. et al. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 279-283, 1996.

OSORIO FILHO, B. D. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. 2009. 113 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PAIM, N. R. Research on *Lotus* spp. in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Lotus Newsletter**, Colonia, v. 19, p. 37-43, 1988.

PENGELLY, B. C.; CONWAY, M. J. Pastures on cropping soils: which tropical pasture legume to use? **Tropical Grasslands**, Brisbane, v. 34, p. 162-168, 2000.

PENROSE, D.; GLICK, B. Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 77-80, 2001.

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

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 189-199, 2003.

PRITHIVIRAJ, B. et al. A host-specific bacteria-to-plant signal molecule (Nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants. **Planta**, Berlin, v. 21, p. 437-445, 2003.

RADWAN, T. S. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 997-1004, 2005.

- REDDY, P. M. et al. Rhizobial communication with rice roots: induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. **Plant and Soil**, The Hague, v. 194, p. 81-98, 1997.
- REDMOND, J. W. et al. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. **Nature**, London, v. 323, p. 632-635, 1986.
- ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 181, p. 337-344, 2004.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANTILLANA, N.; ARELLANO, C.; ZÚÑIGA, D. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). **Ecología Aplicada**, Lima, v. 4, p. 47-51, 2005.
- SANTOS JUNIOR, A. C. M. et al. Caracterização de bactérias do gênero *Pseudomonas* como bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6., 2008, Anápolis. **Anais...** Anápolis: Universidade Estadual de Goiás, 2008.
- SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. **Summa Phitopathologica**, Piracicaba, v. 1, p. 231-234, 1975.
- SATURNINO K. C. et al., Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 195-202, 2010.
- SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 658-664, 2008.
- SCHLOTTER, M. et al. Root colonization of different plants by plant growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2038-2046, 1997.
- SILVEIRA, E. L. **Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva**. 2008. 99 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- SOMMERS, E.; VANDERLEYDEN, J. Rhizosphere bacterial signaling: A love parade beneath our feet. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 30, p. 205-240, 2004.
- SOULEIMANOV, A.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. The major Nod factor of *Bradyrhizobium japonicum* promotes early growth of soybean and corn. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1929-1934, 2002.



- SPAEPEN, S. et al. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 31, p. 425-448, 2007.
- SRIDEVI, M.; MALLAIAH, K. V.; YADAV, N. C. S. Phosphate solubilization by *Rhizobium* isolates from *Crotalaria* species. **Journal of Plant Sciences**, New York, v. 2, p. 635-639, 2007.
- TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, planta e outros materiais**. 2. ed., Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174 p.
- TOLEDO, B. F. B. **Identificação de estirpes de rizóbios por sequenciamento parcial dos genes 16S rDNA e nifH**. 2008. 139 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- TONON, B. C. **Compatibilidade simbiótica e caracterização de rizóbios de *Lotus spp.*, isolados de solos do Rio Grande do Sul**. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- TRINICK, M. J. Structures of nitrogen fixing root nodules formed on *Parasponia andersonii* Planch. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 25, p. 565-578, 1979.
- VAN DER BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Review: genetics of the *Azospirillum*-plant root association. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 14, p. 445-446, 1995.
- VAZQUEZ, P. et al. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 460-468, 2000.
- VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, p. 25-40, 1994.
- VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p.
- VOLPIN, H.; PHILLIPS, D. A. Respiratory elicitors from *Rhizobium meliloti* affect intact alfalfa roots. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 116, p. 777-783, 1998.
- WEAVER, R. J. **Plant growth substances in agriculture**. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1972. 594 p.
- WEBSTER, G. et al. Interactions of rhizobia with rice and wheat. **Plant and Soil**, The Hague, v. 194, p. 115-122, 1997.

WEINGART, H.; VÖLKSCH, B. Ethylene production by *Pseudomonas syringae* Pathovars In Vitro and In Planta. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 156-161, 1997.

YAGI, K. Chemical determination of flavins. **Methods of Biochemical Analysis**, New York, v. 10, p. 320-355, 1956.

YANNI, Y. G. et al. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessments of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, The Hague, v. 194, p. 99-114, 1997.

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

ZAKHARYCHEV, V. V., **Fitogormony, ikh analogi i antagonisty v kachestve gerbitsidov i regulyatorov rosta rastenii** (Phytohormones, their analogues and antagonists as herbicides and plant growth regulators), 1999. In: TSAVKELOVA, E. A. et al. Hormones and hormone-like substances of microorganisms: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v. 42, p. 229-235, 2006.

## **7. APÊNDICES**

**Apêndice 1: Meio Levedura-Manitol-Ágar – LMA (Vincent, 1970)**

Composição	Concentração (gL <sup>-1</sup> )
Manitol	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,1
Extrato de Levedura	0,5
Ágar	15

**Modo de preparo:**

- Dissolver o manitol e o extrato de levedura em água destilada,
- adicionar os sais preparados previamente em solução estoque,
- para identificação de rizóbios por características morfológicas em meio LMA (Vincent, 1970) em placa de petri, adicionar 10 mL da solução de corante vermelho-congo (Apêndice 2) por litro de meio LMA (Vincent, 1970),
- para produção de inoculo em meio LM (Vincent, 1970) líquido, excluir o Agar da composição do meio,
- ajustar o volume para 1000 mL,
- ajustar o pH em 6,8.

**Apêndice 2: Corante Vermelho Congo**

Composição	Concentração
Vermelho Congo	250 mg

**Modo de preparo:**

- Dissolver 250 mg de Vermelho Congo em 100 mL de água destilada,
- armazenar em frasco de vidro escuro ou envolto com papel alumínio.

### Apêndice 3: Solução Sarruge (Sarruge, 1975)

Composição	Concentração (gL <sup>-1</sup> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2
CaCl <sub>2</sub>	5
KCl	5
Solução de FeEDTA	10
Micronutrientes	1

#### Modo de preparo:

- adicionar em água destilada os sais preparados previamente em solução estoque,
- ajustar o volume para 1000 mL
- Ajustar o pH em 6,0

#### Solução de Micronutrientes

Composição	Concentração (gL <sup>-1</sup> )
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
ZnCl <sub>2</sub>	0,10
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,04
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,02

#### Solução Fe-EDTA

Composição	Concentração (gL <sup>-1</sup> )
NaEDTA*	3,72
FeSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,78

\* C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.2H<sub>2</sub>O