



UESB

**ISOLAMENTO E INOCULAÇÃO DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM ARROZ
(*Oryza sativa*L.) CULTIVADO EM VITÓRIA DA
CONQUISTA - BA**

TARCIANA DE OLIVEIRA VIANA

2012

TARCIANA DE OLIVEIRA VIANA

**ISOLAMENTO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS EM ARROZ (*Oryza sativa* L.) CULTIVADO
EM VITÓRIA DA CONQUISTA - BA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:

Prof. DSc. Joilson Silva Ferreira

Co-Orientador:

Prof^a. DSc. Vera Lúcia Divan Baldani

VITÓRIA DA CONQUISTA
BAHIA, BRASIL
2012

V668i Viana, Tarciana de Oliveira.
Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz
(*Oryza sativa L.*) cultivado em Vitória da Conquista-BA /
Tarciana de Oliveira Viana, 2012.
96f: il.
Orientador (a): Joilson Silva Ferreira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste
da Bahia, Programa de Pós-Graduação de Mestrado em
Agronomia, Vitória da Conquista, 2012.
Referências: f. 58-71.

1. FBN. 2. Produção de grãos. 3. *Herbaspirillum*
Seropedicae. I. Ferreira, Joilson Silva. II. Universidade
Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Agronomia. III. T.
CDD: 633.18

Catálogo na fonte: Elinei Carvalho Santana - CRB 5/1026
UESB – Campus Vitória da Conquista-BA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
Área de Concentração em Fitotecnia

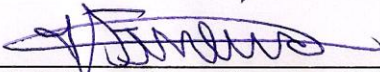
Campus de Vitória da Conquista - BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “ISOLAMENTO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM ARROZ (*Oryza sativa* L.) CULTIVADO EM VITÓRIA DA CONQUISTA-BA”

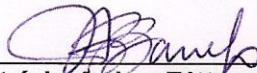
Autora: Tarciana de Oliveira Viana

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, pela Banca Examinadora:

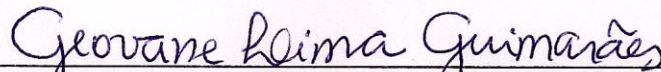


Prof. Joilson Silva Ferreira, D.Sc., UESB

Presidente



Prof. Patrícia Anjos Bittencourt Barreto, D.Sc., UESB



Prof. Geovane Lima Guimarães, D.Sc., FBAIANO-Valença

Data de realização: 31 de Agosto de 2012.

Estrada do Bem Querer, Km 4 – Caixa Postal 95 – Telefone: (77) 3425-9383 – Fax: (77)
3424-1059 – Vitória da Conquista – BA – CEP: 45031-900
e-mail: ppgagronomia@uesb.edu.br

**A você Mainha, que sempre esteve ao
meu lado, por ter me proporcionado
coisas maravilhosas e por ter feito de
mim o que sou hoje.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida;

À Mainha, pelo amor incondicional, carinho, apoio, incentivo, por sempre se fazer presente em minha vida, mesmo estando a quase 8.000 km de distância de mim, e pela força diante das dificuldades;

Aos meus irmãos, Philipe e Thaís, pelo apoio e carinho;

A Renato, pelo amor e carinho em todos os momentos que vivemos juntos e espero que esses momentos se repitam por todo o sempre;

Ao Dr. Joilson Silva Ferreira, pela orientação e paciência;

À Dr^a Vera Baldani, pela co-orientação, amizade e paciência;

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Agronomia da UESB, pelos ensinamentos;

Aos colegas de mestrado: Augusto, Glauce, Gleice e Ivana, pelos momentos de descontração durante os estudos em grupo, na pizzaria e em diversos momentos, ao longo destes dois anos;

Aos colegas e amigos de Vitória da Conquista, em especial, à Celsiane, Joelma e Cristina;

Aos colegas do alojamento da EMBRAPA, onde passei ótimos momentos;

Aos funcionários da EMBRAPA Agrobiologia, em especial, Lúcio, Wilson, Claudinho, Geraldo Baeta, Luiz Carlos, Adriana, Ernani e todo o pessoal do terraço;

Aos funcionários do DICAP – UESB.

RESUMO

VIANA, T. O. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa*L.) cultivado em Vitória da Conquista - BA.** Vitória da Conquista-BA: UESB, 2012. 97 p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia)*

O arroz é a terceira maior cultura cerealífera do mundo, apenas ultrapassado pelo milho e trigo. Constitui um dos cereais básicos da dieta humana, representando, aproximadamente, 20% da ingestão de energia e 15% de proteína. Dentre as várias formas de incrementar a produção vegetal, destaca-se o suprimento de fertilizantes, sendo o nitrogênio o elemento mais importante para a obtenção de alta produtividade, pois atua na síntese de proteínas e enzimas que garantem a vida do vegetal. Fontes alternativas de suprimento de nitrogênio às plantas, como a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), podem complementar ou até substituir o uso do N nos processos agrícolas. O objetivo do presente trabalho foi isolar e inocular bactérias diazotróficas eficientes quanto à FBN, solubilização de fosfato, capacidade de redução do acetileno e capacidade de produção de compostos indólicos em arroz, cultivado em Vitória da Conquista e com potencial para utilização na região Sudoeste da Bahia. Foram conduzidos 2 experimentos em casa de vegetação e um no laboratório de Gramíneas da Embrapa Agrobiologia. O primeiro experimento foi realizado afim de isolar bactérias diazotróficas no solo cultivado, sendo utilizadas as cultivares BRS Tropical e BRS MG Curinga, inoculação com a estirpe de bactéria BR11417 (ZAE94 – *Herbaspirillum seropedicae*), ausência de inoculação e quatro doses de N (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹). As plantas controle foram levadas ao laboratório para a realização do isolamento das bactérias eficientes quanto à FBN. O segundo experimento foi realizado com as três melhores estirpes isoladas do primeiro experimento, a estirpe BR11417, a ausência de inoculação e a interação com doses de N. Foram observados efeitos positivos quanto à inoculação na produção de grãos, cujos ganhos chegaram a 208,5%, dependendo da estirpe e dose de N utilizada.

Palavras-chave: FBN; *Herbaspirillum seropedicae*; Produção de Grãos.

* Orientador: Joilson Silva Ferreira, D.Sc., UESB, e Co-orientador: Vera Lúcia Divan Baldani, D.Sc., Embrapa.

ABSTRACT

VIANA, T. O. **Isolation and inoculation of diazotrophs in rice (*Oryza sativa* L.) grown in Vitória da Conquista – BA.** Vitória da Conquista-BA: UESB, 2012. 97 p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia)*

Rice is the third largest cereal crops of the world, only surpassed by corn and wheat. Is one of the cereals of basic human diet, representing, approximately, 20% of energy intake and 15% protein. Among the various ways to enhance the production plant, stands out the supply of fertilizers and nitrogen the most important element for obtaining high productivity, because it acts in the synthesis of proteins and enzymes that guarantee the life of the plant. Alternative sources of supply of nitrogen to plants, such as the Nitrogen Biological Fixation (NBF), can complement or even replace the use of N in agricultural processes. The objective of this work was to isolate and inoculate diazotrophic bacteria efficient in BNF, solubilization of phosphate, reduction capacity of the acetylene and production capacity of compounds indolicos in cultivated rice in Vitoria da Conquista, with potential for use in the southwestern region of Bahia. Were conducted 2 experiments in the home of vegetation, and a laboratory. The first experiment was conducted in order to isolate diazotrophic bacteria in cultivated soil, the cultivars used were BRS Tropical and BRS MG Curinga, inoculation with the strain of bacterium BR11417 (ZAE94 - *Herbaspirillum seropedicae*), absence of inoculation and four dose of N (0, 20, 60 and 100 kg ha⁻¹). The control plants were brought to the Laboratory of Gramineous of Embrapa Agrobiology for the completion of the isolation of bacteria efficient on the NBF. The second experiment was carried out with the best three strains isolated from the first experiment, the strain BR11417, the absence of inoculation and the interaction with doses of N. Were observed positive effects on the inoculation and the production of grain, where the gains reached 208,5 %.

Keywords: BNF; *Herbaspirillum seropedicae*; Grain Production.

* Adviser: Joilson Silva Ferreira, D.Sc., UESB, and Coadvises: Vera Lúcia Divan Baldani, D.Sc., Embrapa.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - População de bactérias diazotróficas presentes nas plantas pela técnica de número mais provável (NMP).....	54
Tabela 2 - Número de isolados de bactérias diazotróficas obtidos de dois cultivares de arroz (BRS Tropical e MG Curinga), cultivadas em Vitória da Conquista – BA.	56
Tabela 3 - Capacidade de Produção de Auxina e capacidade de Redução de Acetileno por bactérias cultivadas em meios de cultivo JMV, NFb e JNFb (continua).....	58
Tabela 4 - Inoculação com 4 estipes de bactérias diazotróficas e tratamento sem inoculação sobre os efeitos de altura de plantas aos 60 DAE, altura final de plantas, número de perfilhos, massa fresca de plantas, massa fresca de grãos, massa seca de plantas e massa seca de grãos.	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Análise de regressão da variável altura de plantas e número de perfilhos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹) na variedade BRS Tropical inoculada ou não com a estirpe ZAE 94, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso⁻¹ e 6 repetições). Vitória da Conquista, 2012. 44
- Figura 2** - Análise de regressão da variável acúmulo de massa fresca e seca aos 60 DAE em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹) na variedade BRS Tropical inoculada ou não com a estirpe ZAE 94, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso⁻¹ e 6 repetições). Vitória da Conquista, 2012. 48
- Figura 3** - Análise de regressão da variável altura de plantas e número de perfilhos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹) na variedade BRS MG Curinga inoculada ou não com a estirpe ZAE 94 sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso⁻¹ e 6 repetições). Vitória da Conquista, 2012. 50
- Figura 4** - Análise de regressão da variável acúmulo de massa fresca e seca aos 60 DAE em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹) na variedade BRS MG Curinga inoculada ou não com a estirpe ZAE 94, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso⁻¹ e 6 repetições). Vitória da Conquista, 2012. 53
- Figura 5** - Análise de regressão da variável altura de plantas aos 60 DAE e altura final de plantas em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹) na variedade BRS Tropical inoculada ou não com a estirpe ZAE 94, sob condições de casa de vegetação

	(média de 4 plantas.vaso ⁻¹ e 4 repetições). Vitória da Conquista, 2012.	65
Figura 6	- Análise de regressão da variável número e perfilhos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha ⁻¹) na variedade BRS Tropical inoculada ou não com a estirpe ZAE 94, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso ⁻¹ e 4 repetições). Vitória da Conquista, 2012.....	66
Figura 7	-Análise de regressão das variáveis acúmulo e massa fresca e seca de plantas em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha ⁻¹) na variedade BRS Tropical inoculada ou não com a estirpe ZAE 94, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso ⁻¹ e 4 repetições). Vitória da Conquista, 2012.	68
Figura 8	-Análise de regressão das variáveis acúmulo de massa fresca e seca de grãos em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha ⁻¹) na variedade BRS Tropical inoculada ou não com a estirpe ZAE 94, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso ⁻¹ e 4 repetições). Vitória da Conquista, 2012.	70

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Análise de Variância da altura de plantas, número de perfilhos, matéria fresca e acúmulo de matéria seca na cultivar BRS Tropical.	90
Apêndice B - Análise de Variância da altura de plantas, número de perfilhos, matéria fresca e seca de plantas na cultivar MG Curinga.	91
Apêndice C - Análise de Variância de altura de plantas aos 60 DAE, número de perfilhos aos 60 DAE, altura final de plantas, acúmulo de massa fresca e seca de plantas e acúmulo de massa fresca e seca de grãos.	92

LISTA DE ANEXOS

Anexo A -Meios de Cultivo.....	94
Anexo B - Soluções	97

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Orizicultura	20
2.2 Nitrogênio	23
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio	25
2.4 Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas	28
2.5 Fixação biológica de nitrogênio em arroz e sua resposta à inoculação com bactérias diazotróficas.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Experimento de Inoculação e Isolamento de Bactérias Diazotróficas em Vitória da Conquista, região Sudoeste da Bahia.....	32
3.1.1 Descrição do experimento	32
3.1.2 Material Genético.....	33
3.1.3 Delineamento experimental e tratamentos	33
3.1.4 Análise Estatística.....	34
3.2 Isolamento das Bactérias Diazotróficas	35
3.2.1 Atividade de redução de acetileno.....	37
3.2.2 Capacidade de produção do hormônio Auxina	37
3.2.3 Quantificação de Proteína total.....	38
3.2.4 Solubilização de Fosfato.....	39
3.2.5 Análise Estatística.....	39
3.3 Experimento 2: Avaliação da eficiência dos isolados quanto às FBN sobre as características agronômicas	39
3.3.1 Preparo do inoculante	40
3.3.2 Características avaliadas	40

3.3.3 <i>Análise Estatística</i>	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Experimento 1: Experimento de Inoculação e Isolamento de Bactérias Diazotróficas em Vitória da Conquista, região Sudoeste da Bahia	42
4.1.1 <i>Cultivar BRS Tropical</i>	42
4.1.2 <i>Cultivar BRS MG Curinga</i>	49
4.2 Isolamento das bactérias diazotróficas.....	54
4.2.1 <i>Produção de Ácido Indolacético (AIA)</i>	57
4.2.2 <i>Técnica de Redução de Acetileno (ARA)</i>	60
4.3 Plantio de arroz para avaliação da eficiência dos isolados quanto às características agronômicas	61
<i>Cultivar BRS Tropical</i>	61
5 CONCLUSÕES	73
6 REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICES	89
ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é uma planta da família das *Poaceas*, terceira maior cultura cerealífera do mundo, apenas ultrapassado pelo milho e trigo. Tem em sua composição teor de proteína variando de 15 a 20%, amido entre 75 a 80% e é rico em hidratos de carbono (STORCK, 2004).

O arroz constitui um dos cereais básicos da dieta humana, representando, aproximadamente, 20% da ingestão mundial de energia e 15% do aporte de proteína (KENNEDY e BURLINGAME, 2003). Aproximadamente, 150 milhões de hectares são utilizados para seu cultivo, e destes, 75% crescem em condições de solos alagados (LIESACK e outros, 2000).

O Brasil se destaca como o maior produtor de fora do continente Asiático. Segundo dados da CONAB (2012), o cultivo de arroz na safra 2011/12 é de 2.515,1 mil hectares, cuja produção nacional ficou em torno de 11.267,7 mil toneladas. O Rio Grande do Sul se destaca como o maior estado produtor, responsável por 63,9% da produção nacional, com o predomínio do sistema de cultivo alagado. Segundo o IBGE (2012), no Estado da Bahia, a área plantada na safra 2011/12 é em torno de 15 mil hectares, apresentando uma redução de 15,4% em relação à safra 2010/11.

A área cultivada com arroz vem diminuindo constantemente, tanto no Centro-Oeste quanto no Nordeste, onde o clima favorece a cultura do arroz de terras altas. Os motivos são a concorrência com a soja, milho e a restrição à abertura de novas áreas de plantio, onde o arroz tem preferência no primeiro ano de cultivo.

Dentre as várias formas de incrementar a produção vegetal, destaca-se o suprimento de fertilizantes, sendo o nitrogênio o elemento mais importante para a obtenção de alta produtividade, pois atua na síntese de proteínas e enzimas que

garantem a vida do vegetal. Os processos que se constituem fontes capazes de fornecer grandes quantidades de nitrogênio são a decomposição da matéria orgânica do solo, a utilização de fertilizantes nitrogenados e a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) (CARVALHO, 2002).

Por se tratar de um elemento que se perde facilmente por lixiviação, volatilização e desnitrificação no sistema solo-planta (FAGERIA e BALIGAR, 2005), o uso irracional de fertilizantes nitrogenados onera os custos de produção e pode causar efeitos negativos ao meio ambiente, como contaminação dos cursos d'água e aumento da concentração dos gases do efeito estufa. Fontes alternativas de suprimento de nitrogênio às plantas, como a Fixação Biológica de Nitrogênio, podem complementar ou até substituir o uso de fertilizantes nitrogenados nos processos agrícolas.

A FBN é um dos mais importantes processos conhecidos na natureza, sendo realizado apenas por organismos procariotos. Estes organismos, chamados diazotróficos, são capazes de reduzir o N_2 atmosférico, tornando-o assimilável para as plantas (REIS e outros, 2006).

A interação de bactérias diazotróficas com as culturas tem sido pesquisada em todo o mundo, devido ao potencial no aumento da produtividade das culturas, o que pode possibilitar redução dos custos de produção com a diminuição do volume de adubos nitrogenados e, conseqüentemente, melhor conservação dos recursos ambientais (KUSS, 2006).

A atuação das bactérias diazotróficas quanto à fixação biológica de nitrogênio foi verificada inicialmente entre as plantas leguminosas, mas inúmeros experimentos têm demonstrado que plantas da família *Poaceas* apresentam potencial significativo, respondendo com aumento na produção, quando inoculadas com bactérias diazotróficas (BALDANI e outros, 2002; GUIMARÃES e outros, 2003; CAMPOS e outros, 2003; GUIMARÃES e outros, 2010).

A orizicultura é altamente dependente de insumos, sendo que o nitrogênio exerce influência no crescimento vegetativo, promove a expansão foliar, o acúmulo de matéria seca, o aumento do número de perfilhos e do número de espiguetas férteis, o que reflete de forma positiva no aumento da produção de grãos (WADA e outros, 1986; AKITA, 1989; FAGERIA e outros, 2006).

A Bahia apresenta regiões com boas condições edafoclimáticas para a produção de grãos. A região Oeste é a maior produtora de grãos do estado e responsável por 90% da produção total de arroz (MENDONÇA, 2006). Porém, o cultivo de arroz de terras altas na região vem diminuindo a cada safra.

O arroz era preferido em abertura de novas áreas para a soja, mas atualmente existem cultivares de soja que se adaptam bem às terras novas. Dessa forma, ela é preterida ao arroz, por apresentar maior rentabilidade. Da mesma forma, o arroz vem perdendo espaço para o algodão nos cultivos rotacionados com pastagens (EMBRAPA, 2007).

A inoculação com bactérias diazotróficas fixadoras de N é uma alternativa viável para o produtor, com aumentos significativos na produção de grãos e redução no uso de adubos nitrogenados, com diminuição dos custos.

O isolamento de bactérias diazotróficas nativas da Bahia e sua inoculação em plantas de arroz pode apresentar maiores efeitos quanto à FBN, do que bactérias oriundas de outras regiões do Brasil, já que estas podem apresentar maior adaptabilidade às condições das regiões produtoras do Estado.

Os objetivos deste trabalho foram: - Isolar e inocular bactérias diazotróficas eficientes quanto à FBN, solubilização de fosfato, capacidade de redução do acetileno, capacidade de produção de compostos indólicos em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista, e com potencial para utilização na região Sudoeste da Bahia; - Quantificar a contribuição da inoculação das bactérias diazotróficas isoladas para a cultura de arroz nas

variáveis: altura de plantas, número de perfilhos, acúmulo de massa fresca e seca e produção de grãos, na variedade de arroz BRS Tropical.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Orizicultura

O arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado é uma cultura anual, monocotiledônea, pertencente à família das *Poaceas*. É cultivado desde as latitudes 53° Norte ao 40° Sul (LU e CHANG, 1980), suportando imensa diversidade ambiental. O seu ciclo de cultivo situa-se na faixa de 110 a 150 dias, podendo variar de acordo com a variedade e com o ambiente (MOREIRA e KLUNGE, 1999).

O arroz é considerado o produto de maior importância econômica em muitos países em desenvolvimento, tanto do ponto de vista social quanto econômico, constituindo-se alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas, principalmente para população de baixa renda (KENNDY e BURLIGAME, 2003). Estes autores ressaltam que o arroz contribui com aproximadamente 20% e 15% do consumo mundial de energia e de proteína, respectivamente. Cultivado e consumido em todos os continentes (FAGERIA e outros, 1997), o arroz é considerado um dos alimentos com melhor balanço nutricional, que se adapta às diferentes condições de solo e clima, sendo a espécie de maior potencial para o controle da fome no mundo (AZAMBUJA e outros, 2004).

A China é o maior produtor mundial de arroz, representando cerca de 30,3% da produção mundial, seguido da Índia, com 20,7%, e Indonésia, com 8,6% (USDA, 2012). O Brasil se destaca como o maior produtor de fora do continente Asiático. Segundo dados da CONAB (2012), o cultivo com arroz na safra 2011/12 foi de 2.453,4 mil hectares, 13% menor que a área da safra

anterior. A produção nacional de arroz ficou em 11.559,2 mil toneladas, considerando uma produtividade média nacional de 4,7 Mg.ha⁻¹, redução 15,1% e 2,4% em comparação com safra 2010/2011, respectivamente.

A queda na produção é decorrente da redução significativa de área plantada em relação ao ano passado, verificada em praticamente todos os estados. As regiões Norte e Nordeste apresentaram redução na área plantada em cerca de 13% e 10,1%, respectivamente. O quadro não foi pior em razão da produtividade ter se mantido estável, em especial, na região Sul, onde se concentrou 51,2% da área cultivada, que contribuiu com 78,6% da produção nacional (IBGE, 2012).

Nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, onde predomina o arroz de terras altas ou de sequeiro, também ocorreu expressiva redução de área, porém, com níveis de produtividades dentro de um quadro de normalidade, devido às boas condições climáticas e à qualidade do plantio. Registrou-se aumentos de 2,2 e 10,3%, respectivamente, em relação à safra passada, amenizando a queda na produção total nessas duas regiões, quando comparada com o ano anterior (BRASIL, 2012).

O Brasil é o país que apresenta a maior área cultivada com arroz de terras altas. O seu cultivo já foi superior ao irrigado em termos de área plantada. Atualmente, equivale ao irrigado e vem diminuindo safra a safra a área de cultivo. Ainda se verifica queda da produção, uma vez que o arroz irrigado vem num constante crescimento de produtividade, com lançamento de novas variedades altamente produtivas e a disseminação do cultivo dos híbridos que alcançam altas produtividades (BRASIL, 2012).

A maior área de cultivo com arroz de terra alta está concentrada no bioma Cerrado, onde se difundiu como cultura pioneira e ocupação de fronteira agrícola. No cerrado, aproximadamente a metade do arroz de terras altas é produzido em área nova, na qual se procede a derrubada de vegetação e, outra

metade se constitui de arroz cultivado em rotação com soja ou pastagem. O cultivo do arroz de terras altas, após derrubada de vegetação nativa, tende a desaparecer, em razão dos altos impactos ambientais, como a mudança climática, a severa perda de biodiversidade e o alto custo financeiro para conversão de sistemas naturais (EMBRAPA, 2007).

Nesta região, o arroz, muitas vezes, é cultivado em solos ácidos, pobres em nutrientes, com baixa capacidade de retenção de água e em regiões onde existe irregularidade na distribuição das precipitações pluviiais (CRUSCIOL e outros, 2006). Tal sistema caracterizou-se por apresentar um baixo custo de produção, com baixo uso de técnicas e práticas recomendadas para a cultura, acarretando em baixa produtividade (DIAS e outros, 2010).

A orizicultura na Região Nordeste é caracterizada por ser uma cultura subsidiária e utilizada basicamente para o autoconsumo. Sua produção representou apenas 6,5% da safra nacional e sua produtividade de apenas 1,2 Mg/ha na safra 2011/2012 (FREITAS, 2010).

O Maranhão é o maior estado produtor dentro da Região Nordeste, com 441 mil hectares plantados e produção de 474,1 mil toneladas na safra 2011/2012, seguido do Piauí, com 117 mil hectares plantados e produção de 136,2 mil toneladas, e do Ceará, com 24,5 mil hectares plantados e produção de 47,5 mil toneladas. A Bahia é o quarto maior estado nordestino em área plantada, com 13,8 mil hectares e a quinta maior produção, com 23,2 mil toneladas de grãos. O estado de Sergipe é quem apresentou a quarta maior produção, com 42,6 mil toneladas, numa área correspondente a quase a metade da área plantada pelo estado baiano (CONAB, 2012).

Nos últimos anos, o cultivo de arroz na Bahia também vem sofrendo acentuada queda em área plantada. Em 1996, a área plantada correspondia a 50,3 mil hectares; em 2006, a área plantada foi de 14,9 mil hectares; e em 2012, uma área de 13,8 mil hectares, havendo redução de quase 73%, o que pode ser

explicado pela migração de cultura do arroz para outras culturas, principalmente a soja, ocorrida na Região Oeste, a maior produtora de grãos do Estado (FREITAS, 2010; BRASIL, 2012).

2.2 Nitrogênio

O nitrogênio é o nutriente mais exigido pelas culturas e, frequentemente, é o que mais limita a produtividade de grãos (RAIJ, 1991; COSER e outros, 2007). É constituinte obrigatório de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, participando direta e indiretamente de diversos processos bioquímicos das plantas (FAGERIA e outros, 2003).

É o elemento mais abundante na atmosfera, correspondendo a, aproximadamente, 78% da fração gasosa do ar na forma de N_2 , um gás inerte, que não reage quimicamente nas condições naturais. Este elemento não está prontamente disponível para as plantas, já que a forma de absorção no solo se dá através do íon nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) (FERNANDES e SOUZA, 2006), que se encontram em menor concentração no solo, entre 1 e 5%, sendo que parte do N no solo se encontra na forma orgânica (FAGERIA e STONE, 2003).

De todo o nitrogênio sintético utilizado para a produção das culturas, apenas 50% do nitrogênio aplicado é absorvido pelas plantas, o restante é perdido no sistema solo-planta, elevando os custos de produção, causando efeitos negativos ao meio ambiente, como acidificação de solos cultiváveis, contaminação das águas superficiais e do lençol freático, devido à mobilidade no solo, através do fluxo de massa e perdas por volatilização, desnitrificação e lixiviação (FREY e SCHUEPP, 1992; FAGERIA e BALIGAR, 2005; VIDEIRA, 2008).

Como a maioria das culturas, a planta de arroz é bastante exigente em

nutrientes, dos quais o nitrogênio é o segundo nutriente mais exigido pela cultura do arroz e o mais exportado como produto colhido (FORNASIERI FILHO E FORNASIERI, 2006).

A utilização de doses e épocas de aplicação e o parcelamento do nitrogênio são realizados de acordo com a necessidade da planta de arroz, com a produtividade esperada e com o histórico da área (HERNANDES e outros, 2010).

As aplicações de nitrogênio exercem influência no crescimento vegetativo, promove a expansão foliar, acúmulo de matéria seca, aumento do número de perfilhos e do número de espiguetas férteis, o que reflete de forma positiva no aumento da produção de grãos (WADA e outros, 1986; AKITA, 1989; FAGERIA e outros, 2006). Altas doses de nitrogênio aplicado induzem à formação de grande número de perfilhos e folhas novas, provocando sombreamento, acamamento e criando condições favoráveis à ocorrência de doenças, refletindo de forma negativa na produção de grãos (MALAVOLTA e FORNASIERI FILHO, 1983; BARBOSA FILHO, 1987; BARBOSA FILHO, 1989).

A planta apresenta maior eficiência na absorção do nitrogênio para a produção de grãos na fase reprodutiva, na qual o sistema radicular se encontra mais desenvolvido e com maior potencial de absorção de nutrientes (SCIVITTARO e MACHADO, 2004). Segundo Crusciol e outros (2007), cerca de 50% do nitrogênio absorvido pela cultura do arroz é exportado na forma de grãos.

A maior produtividade do arroz está em plantios nos solos de várzeas, que são ácidos e, após dois ou três cultivos, têm significativa diminuição na fertilidade (VAHL, 1999). Em condições de alagamento, o N é um dos elementos mais influenciados pelas condições de anaerobiose. Esse nutriente pode sofrer várias transformações, sendo que algumas delas possibilitam perdas,

principalmente pelo processo de desnitrificação. Nesses solos e nessas condições, a absorção do nitrogênio pela cultura do arroz situa-se em torno de 40% (FAGERIA e BALIGAR, 2001).

Fageria e outros (2007) citam que o uso racional da adubação nitrogenada é fundamental para aumentar a eficiência da absorção do N, aumentar a produtividade das culturas, diminuir o custo de produção e os riscos de poluição ambiental. A adequação da dose aplicada e época apropriada pode aumentar a eficiência de recuperação de nitrogênio, garantindo aumentos na produtividade tanto do arroz alagado quanto do arroz de terras altas, onde a dose propicia a obtenção de produtividade máxima econômica e a época correta aumenta sua eficiência de utilização.

Como citado anteriormente, o cultivo de arroz de terras altas no Brasil está, em sua maioria, situado na região do cerrado, onde tem o predomínio de solos pobres em nutrientes e com a ocorrência de períodos de estiagem. A maior região produtora de grãos na Bahia é a Região Oeste, que esta está inserida dentro do bioma cerrado.

O cultivo de arroz em áreas de Cerrado tem, basicamente, como finalidade, formar pastagens ou adequar a área para o cultivo posterior da soja, feijão, milho, entre outras. Por esse motivo, o agricultor está habituado a usar quantidades insuficientes de insumos, apenas o indispensável para aumentar a fertilidade dos solos e a produtividade das culturas (EMBRAPA, 2007).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

Fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a redução do N_2 (gás inerte) a NH_3^+ , tornando o nitrogênio disponível para as plantas. É um processo mediado por uma pequena parcela de procaríotos, conhecidos como fixadores de N_2

(MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; REIS e TEIXEIRA, 2005).

Os organismos fixadores de N_2 promovem a redução do nitrogênio atmosférico (N_2) à amônia (NH_3^+), através da quebra da ligação tripla do N pela enzima nitrogenase, com alto consumo de energia na forma de ATP, podendo ocorrer à temperatura ambiente e pressão adequada (REIS e TEIXEIRA, 2005; REIS e outros, 2006; BERGAMASCHI, 2006). Esse processo disponibiliza nitrogênio na forma assimilável às plantas, como uma alternativa de se obter este elemento, quando o mesmo encontra-se escasso no solo.

O N_2 atmosférico pode ser fixado naturalmente, mediante descargas elétricas na atmosfera, e de forma artificial, através de processos industriais utilizados para a produção de fertilizantes. Porém, a FBN contribui com, aproximadamente, 175 milhões de toneladas, representando cerca de 65% do N fixado na Terra, o que o faz ser considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta, perdendo apenas para a fotossíntese (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

A FBN é responsável pela incorporação do N atmosférico em sistemas naturais e agrícolas (SANTOS e outros, 2008), talvez sendo o processo microbiano relacionado à agricultura mais bem estudado e explorado tecnologicamente. É um processo indispensável ao planeta e o mais importante conhecido na natureza, sendo estimada a extinção da vida em algumas décadas, caso fosse interrompido (FRANCO e BALIEIRO, 1999).

A FBN é mais conhecida em plantas da família Leguminosae, às quais realizam uma simbiose mutualística com determinadas bactérias, cujo maior sucesso está na cultura da soja, sendo o Brasil referência no cultivo desta leguminosa. As pesquisas envolvendo a associação de bactérias diazotróficas e plantas da família das *Poaceas* foram impulsionadas na década de 50 com a colaboração de pesquisadores brasileiros (DÖBEREINER e ALVAHYDO, 1959).

As plantas leguminosas apresentam os maiores ganhos de nitrogênio via FBN. Estas possuem estruturas hipertróficas nas raízes chamadas de nódulos. Nos nódulos ocorre a simbiose com as rizobactérias, na qual se observa uma maior eficiência no processo de fixação do N (SPRENT e SPRENT, 1990).

Dentre as leguminosas produtoras de grãos de importância econômica, é na cultura da soja que os ganhos de nitrogênio, através da FBN, têm sido mais expressivos. É por meio da FBN e da adubação nitrogenada que a soja recebe suprimentos de nitrogênio em quase todo o seu ciclo de vida (HUNGRIA e outros, 2001). Segundo Mariangela Hungria (2012, comunicação pessoal), no Brasil, a economia gerada com fertilizantes nitrogenados está em torno de US\$ 7 bilhões de dólares por ano.

Em gramíneas, a FBN é um processo realizado exclusivamente por organismos procariotos (algumas espécies de bactérias, cianobactérias e actinomicetos do gênero *Frankia*), conhecidos como diazotróficos, os quais apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, bioquímica, genética e filogenética (SIQUEIRA & FRANCO, 1988; SPRENT e SPRENT, 1990; MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Como benefício da FBN está a incorporação do N atmosférico, o que diminui o uso de fertilizante nitrogenado, evitando ou reduzindo a contaminação do meio ambiente pela lixiviação do nitrato e otimizando os custos de produção.

O uso das bactérias diazotróficas por meio da inoculação representa um grande potencial para a redução da dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos. O aumento do custo dos adubos nitrogenados e a preocupação cada vez maior, no exterior e no Brasil, com os possíveis efeitos negativos do uso indiscriminado do nitrogênio ao meio ambiente, são fatores que devem ser levados em consideração para o incentivo ao estudo do processo natural de FBN (CANTARELLA e DUARTE, 2004; CONCEIÇÃO e outros, 2009). Assim, todas as possibilidades de incremento da FBN na agricultura devem ser

exploradas, não somente como fonte alternativa econômica, mas também como uma forma ecológica (CANUTO, 2003).

2.4 Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas

A FBN em gramíneas ficou conhecida pelo isolamento da bactéria *Beijerinckia fluminensis* da rizosfera de cana-de-açúcar por Döbereiner e Rushel (1958). O interesse maior dos pesquisadores pela FBN em gramíneas se deu somente após a descoberta de bactérias fixadoras do gênero *Azospirillum* (DÖBEREINER e DAY, 1975).

Os estudos envolvendo a associação de bactérias diazotróficas com as gramíneas se intensificaram a partir da década de 70, época que coincidiu com a crise do petróleo, despertando o interesse por formas alternativas ao uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Gramíneas de interesse econômico fazem associações com bactérias diazotróficas (BALDANI e outros, 1997; BODDEY e outros, 2003; BRASIL, 2005; MEHNAZ e outros 2007). Esta associação ocorre sem a formação de uma estrutura especializada para a fixação do nitrogênio, como os nódulos em plantas leguminosas, e as bactérias podem penetrar ou não no tecido da planta, através de ferimentos na epiderme, pontos de emissão de raízes secundárias e estômatos, sendo distribuída para o restante da planta através dos vasos condutores (REIS e outros, 2006). Os produtos da fotossíntese são liberados pela planta e absorvidos pelas bactérias, as quais podem estar na rizosfera ou no interior da planta. As bactérias fixam o nitrogênio e transferem o NH_3^+ para a planta.

No processo da FBN em gramíneas, a transferência do N fixado para a planta ocorre lentamente e apenas uma pequena parte torna-se disponível para o vegetal (VAN DOMMELEN e outros, 1998), porém, este processo é demorado e pouco eficiente, quando comparado à fixação de N por microrganismos

simbióticos em leguminosas (MYLONA e outros, 1995).

2.5 Fixação biológica de nitrogênio em arroz e sua resposta à inoculação com bactérias diazotróficas

A maioria das espécies de bactérias diazotróficas descobertas foi isolada em regiões tropicais, principalmente, no Brasil. A Embrapa Agrobiologia é referência mundial nas pesquisas envolvendo a FBN e as gramíneas. Experimentos de inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de arroz vêm mostrando efeitos benéficos, porém, a inconsistência dos resultados vem limitando o uso destas bactérias em escala comercial.

Bactérias de diversos gêneros têm sido isoladas de plantas de arroz, principalmente, àquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (BALDANI e DOBEREINER, 1980; BALDANI e outros, 1986, 2000; ENGELHARD e outros, 2000). Segundo James (2002), dentre os diazotróficos endofíticos, um dos mais promissores em termos de FBN em plantas de arroz é *H. seropedicae*.

Embora estes sejam colonizadores mais frequentes e mais estudados, outros menos comuns, também foram encontrados em plantas de arroz, tais como *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Bradyrhizobium*, *Alcaligenes*, *Paenibacillus azotofixans*, *Acetobacter*, *Ideonella*, *Klebsiella*, *Sphingomonas azotifigens*, *Pleomorphomonas oryzae*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azospira oryzae*, *Phytobacter diazotrophicus*, dentre outras (LADHA e outros, 1983; BALDANI e DOBEREINER, 1980; MALIK e outros, 1981; FUJIE e outros, 1987; TOU E ZHOU, 1989; ROSADO e outros, 1998; REINHOLD-HUREK e HUREK, 2000; ENGELHARD e outros, 2000; KIRCHHOF e outros, 2001; XIE e YAKOTA, 2006; 2005a,b;ZHANG e outros, 2007).

São inúmeros os efeitos positivos da inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de arroz. Pereira e Baldani (1995), avaliando a inoculação com *H. seropedicae*, encontrou aumento no rendimento dos grãos equivalente à aplicação de 40 kg.ha⁻¹ de N. Enquanto Malik e outros (2002), avaliando *Azospirillum* sp., observaram que a inoculação contribuiu com 30% do N total nas plantas.

Em experimentos realizados por Baldani e outros (2000), em condições de casa de vegetação, demonstraram que as estirpes M130 (*Burkholderiasp.*), ZAE94 (*H. seropedicae*) e M209 (*Burkholderiasp.*) contribuíram com 20, 17 e 11%, respectivamente, do nitrogênio acumulado na massa seca das plantas de arroz.

Guimarães e outros (2003) observaram que a inoculação com as estirpes de *H. seropedicae* e *Burkholderia brasiliensis* na cultivar de arroz Guarani contribuiu para o aumento de massa seca, conteúdo de nitrogênio e produção de grãos nos experimentos conduzidos em vasos, sob condições de casa de vegetação. Em condições de campo, os autores observaram que os aumentos na produção de grãos chegaram a 50%. Em 2007, Sabino, utilizando as mesmas estirpes, não observou influência da inoculação na produção de grãos, no entanto, o teor de nitrogênio nos grãos aumentou significativamente nos tratamentos inoculados.

Ferreira e outros (2010), avaliando inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas, verificaram que a inoculação com a ZAE 94 aumentou em 13% a produção de grãos na variedade IAC4440.

A disponibilidade de nitrogênio no solo para a planta é outro fator que influencia a FBN. Diversos autores têm demonstrado que a aplicação de uma dose de N subótima para a máxima produção tem proporcionado os maiores ganhos em termos de FBN em plantas de arroz (SABINO, 2003; GUIMARÃES, 2006).

Guimarães (2006) observou que a cultivar IR42 obteve um aumento de 48% na produção de grãos, quando foi inoculada com bactérias diazotróficas e recebeu uma adubação de 50 kg.ha⁻¹ de nitrogênio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento de Inoculação de Bactérias Diazotróficas em Vitória da Conquista, região Sudoeste da Bahia

3.1.1 Descrição do experimento

Foi conduzido um experimento em casa de vegetação na Área Experimental do Campus da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), em Vitória da Conquista, localizada no Sudoeste do Estado, a 14°51' latitude Sul, 40°50' longitude oeste, a 928 metros de altitude.

De acordo com Köppen (OMETTO, 1981), o clima do município foi classificado como tropical de altitude (Cwb), com médias de temperatura máxima e mínima de, respectivamente, 25,3 e 16,1°C e precipitação média anual de 733,9 mm, concentrada no período de novembro a março.

Foram utilizados os primeiros 20 cm do horizonte A de um Latossolo Amarelo Álico A Moderado, relevo plano, com textura média, oriundo do Campo Experimental da UESB, com as seguintes características químicas: pH em H₂O de 5,4; teores de Al, Ca e Mg de 0,2; 1,7 e 0,5 cmol_c.dm⁻³ e, teores de P e K de 1 e 15,6 mg.dm⁻³.

Os vasos utilizados tinham capacidade para 9 kg. A correção da fertilidade do solo foi realizada segundo recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais (RIBEIRO e outros, 1999) para o arroz de terras altas, superior à recomendação da correção da fertilidade do solo, segundo o Manual de Adubação e Calagem para o Estado da Bahia.

3.1.2 Material Genético

Foram utilizadas as variedades de arroz BRS Tropical e BRS MG Curinga. As sementes foram cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão.

A variedade BRS Tropical é recomendada para as várzeas da região tropical, adaptada à região Nordeste e aos Estados do Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Pará, Roraima e Rio de Janeiro. Apresenta boa resistência às doenças, produtividade média em torno de 6,0 Mg.ha⁻¹, boa qualidade de grão, não sendo difícil sua aceitação no mercado produtor. Tem ciclo médio de 140 dias, altura média de 110 cm e boa qualidade dos grãos (CUTRIM e outros, 2008)

A variedade BRS MG Curinga é recomendada para plantio em sistema de terras altas e várzea úmida ou drenada de Minas Gerais, e também para os Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Piauí, Maranhão, Rondônia, Pará e Amazonas. Possui arquitetura com folhas eretas, semelhante à de arroz irrigado por submersão, tem boa resistência à seca, apresenta resistência ao acamamento e resistência moderada a brusone de panícula e moderada susceptibilidade à mancha parda, mancha de grãos e escaldadura. Possui produção média de 4,4 Mg.ha⁻¹, apresenta porte baixo e ciclo de cultivo de 115 dias (SOARES e outros, 2005).

3.1.3 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, tendo-se tratamentos dispostos num esquema fatorial 4 x 2, no qual o primeiro fator constituiu as doses de nitrogênio aplicadas na forma de uréia (0, 20, 60 e 100kg de N.ha⁻¹) e o segundo fator foi a presença ou ausência de inoculante. Foram

realizados 8 tratamentos com 6 repetições para cada genótipo de arroz utilizado, totalizando 96 parcelas (vasos) e com 4 plantas por vaso.

A semeadura foi realizada no dia 19/05/2011 e a inoculação foi feita no dia da semeadura com o inoculante proveniente da Embrapa Agrobiologia, contendo a estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* ZAE 94 (depositada na coleção de culturas de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia com o código BR 11417). As sementes foram envoltas na turfa e secas à sombra, até a hora do plantio. Foram utilizadas 10g de turfa por kg de semente. A emergência das plântulas aconteceu 10 dias após o plantio.

As adubações nitrogenadas foram feitas de forma parcelada, 1/2 no plantio, 1/4 no 10º dias após a emergência, exceto para o tratamento 2 (20 kg.ha⁻¹ de N), o qual recebeu a outra metade nesta ocasião, e a última parcela 30 dias após a emergência das plântulas, para as doses 60 e 100 kg.ha⁻¹ de N.

A avaliação foi realizada durante o período vegetativo da cultura, aos 60 dias após a emergência, determinando-se a altura de plantas, o número de perfilhos e o acúmulo de massa fresca e seca de plantas. As testemunhas absolutas das duas variedades foram coletadas e levadas à Embrapa Agrobiologia, para a realização do isolamento das bactérias diazotróficas.

3.1.4 Análise Estatística

Por se tratar de cultivares com hábitos distintos, foram realizadas comparações independentes para cada cultivar, quanto à inoculação e dose de N.

Os dados foram analisados no programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983), quanto à sua normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet). A separação das médias foi feita utilizando o teste estatístico LSD a 5% de probabilidade, além do uso da análise

de regressão para descrever a resposta das plantas aos diferentes níveis de adubação. Para realização do teste estatístico, foi utilizado o programa Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2003).

3.2 Experimento de Isolamento das Bactérias Diazotróficas

O isolamento das bactérias diazotróficas foi realizado no laboratório de gramíneas da Embrapa Agrobiologia, centro de excelência e referência mundial em Fixação Biológica de Nitrogênio em gramíneas.

Para a realização do isolamento, foi coletada a testemunha absoluta de cada genótipo de arroz utilizado, sendo separada em parte aérea e raízes. As amostras foram desinfestadas superficialmente em água corrente e, em seguida, em água destilada, eliminando-se qualquer resíduo de solo. Triturou-se 10g de cada amostra em liquidificador com 90 mL de solução salina e seguiu-se diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-7} , transferindo sucessivamente 1 mL da suspensão de cada diluição para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina. De cada uma das diluições, alíquotas de 100 μ L foram inoculadas em triplicata em frascos de vidro de 15 mL, contendo 5 mL dos meios de cultura semiespecíficos livres de nitrogênio, NFB para *Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum* spp., JMV para *Burkholderia* spp. e LGI para *Azospirillum amazonense*.

Os frascos foram incubados a 30°C, por 7 dias, sendo considerados positivos para contagem aqueles que apresentaram película aerotáxica típica, próxima da superfície do meio. A contagem da população de bactérias diazotróficas foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de Mc Crady para as 3 repetições, por diluição (DOBEREINER e outros, 1995).

A partir dos frascos que apresentaram película característica em cada um dos meios utilizados, foram retiradas amostras com o auxílio de uma alça de platina para um novo meio semisólido e semiespecífico, até o crescimento de uma nova película. Este processo foi repetido, até que apenas as bactérias de interesse crescessem nos meios. Em seguida, as películas foram transferidas para placas de Petri contendo meios sólidos batata.

As placas foram incubadas a 30°C por 5 dias e as colônias, com as características das espécies de interesse, foram selecionadas e novamente repicadas para os meios semisólido e semiespecíficos. Após o crescimento das películas, elas foram transferidas novamente para placas de Petri, contendo meio sólido batata, e incubadas a 30°C por 5 dias. Após o período de incubação, as colônias foram transferidas para um novo meio semisólido e semiespecífico e incubadas até a formação de nova película.

As películas foram retiradas e transferidas para placas de Petri contendo meios sólidos semiespecíficos, incubados, e foram observadas colônias com mesmas características de forma e coloração. Neste momento, as bactérias já se encontravam puras, prontas para serem avaliadas quanto ao potencial de fixação biológica de nitrogênio, realizada através da atividade de redução de acetileno, quanto à produção do hormônio auxina e quanto à capacidade de solubilização de fosfato inorgânico.

A morfologia das colônias foi observada por meio do crescimento dos isolados em meios sólidos, semiespecíficos (NFB, JNFB e JMV) e em meio rico (batata), onde se observou as características morfológicas das colônias, como forma, bordas, coloração e textura (DÖBEREINER e outros, 1995).

3.2.1 Atividade de redução de acetileno

A atividade da nitrogenase dos isolados foi avaliada pela técnica de redução de acetileno (ARA), descrita por Boddey e outros (1990). As bactérias foram crescidas em frascos com capacidade de 15 mL contendo 5 mL de meio semisólido semiespecífico sem indicador de pH. Estes frascos foram incubados a 30°C por 48 horas. Após a formação da película, os frascos foram fechados com rolhas de borracha perfurável do tipo subseal esterilizadas, e, com uma seringa, foi retirado 1mL de ar de cada frasco e injetado 1mL de acetileno. Os frascos foram incubados a 30°C por uma hora e, posteriormente, 0,5 mL da fase gasosa foram introduzidas no cromatógrafo de gás com ionização de chama, Perkin Elmer, modelo F11, para determinar a concentração de etileno na amostra.

Após a determinação da ARA, os frascos foram homogeneizados em um agitador de mesa, até a completa homogeneização da película e no meio de cultura. Em seguida, seguiu-se para o congelador, para, posteriormente, realizar a determinação do teor de proteína.

3.2.2 Capacidade de produção do hormônio Auxina

A capacidade de produção do hormônio auxina foi analisada pelo método de microplaca, descrito por Sarwar & Kremer (1995). Foi usado 1µl de cultura bacteriana, cultivada, previamente, por 24 horas em meio DYGS e inoculada em 20 ml de meio DYGS suplementado com L – triptofano, na concentração final de 200 µg.ml⁻¹ por tubo de ensaio. Os tubos foram acondicionados no escuro, sob agitação de 150 RPM, à temperatura constante de 30°C. Alíquotas de 1 ml foram retiradas, após 42 horas de cultivo, e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos.

Em microplacas do tipo U de 96 poços, uma alíquota de 150 µl do sobrenadante foi misturado a 100 µl do reagente de Salkowski (1 ml de 0,5 M FeCl₃ em 49 ml de ácido perclórico 35 %), previamente preparado. As amostras permaneceram no escuro por 30 minutos, sob temperatura ambiente, e a leitura de absorbância foi feita em um leitor de microplaca (Labsystem iems reader MF, Labsystem) em um comprimento de onda de 540 nm. A quantificação de compostos indolólicos foi avaliada utilizando a curva de calibração preparada com diluições seriadas de padrões de AIA (10-80 µg ml⁻¹).

Para padronização das amostras, os resultados foram expressos na unidade µg ml⁻¹ de AIA por unidade de proteína. Todas as amostras de AIA foram analisadas em triplicata nas placas em U de 96 poços, e o resultado foi decorrente de uma média das 3 leituras.

3.2.3 Quantificação de Proteína total

Para a determinação da proteína total, os frascos foram descongelados e homogeneizados novamente, em placas de Elisa em U, sendo utilizada uma alíquota de 20µl da amostra, 30µl de água destilada estéril e 50µl de NaOH 1M, para lisar as células. Em seguida, aqueceu-se por 5 minutos a 100°C. A essa solução, adicionou-se 900µl do reagente de Bradford e as placas foram agitadas no vortex e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, foi feita a leitura de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro (BRADFORD e outros, 1976). A concentração de proteína foi determinada usando a curva padrão obtida pelos valores de absorbância das quantidades conhecidas de BSA (soro-albumina bovina), nas seguintes concentrações: 0, 2, 4, 8, 12, 16 e 25 µg. ml⁻¹. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o resultado foi decorrente de uma média das 3 leituras.

3.2.4 Solubilização de Fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato inorgânico foi testada em meio de cultura NBRIP sólido (National Botanical Institute's Phosphate – Nautiyal e outros, 1999). As bactérias foram previamente cultivadas em meio DYGS líquido, por 24 horas, sob temperatura de 30°C e sem a presença de luz. Em seguida, usando-se o método *drop plate*, uma alíquota de 20µl foi inoculada na placa de Petri contendo o meio NBRIP solidificado. Foram estabelecidas 3 alíquotas por placa e 3 repetições. O diâmetro do halo de solubilização foi determinado após 8 e 15 dias de incubação a 30°C.

3.2.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados no programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983) quanto à sua normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet). A separação das médias foi feita utilizando o teste estatístico Scott Knott a 5% de probabilidade. Para realização do teste estatístico, foi utilizado o programa Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2003).

3.3 Experimento de avaliação da eficiência dos isolados quanto às FBN sobre as características agronômicas

Este segundo experimento foi conduzido conforme o item 3.1.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, tratamentos dispostos num esquema fatorial 4x5, onde o primeiro fator constituiu nas doses aplicadas (0, 20, 60 e 100 kg de N.ha⁻¹) e o segundo fator foi a inoculação com

estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* ZAE 94 (depositada na coleção de culturas de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia com o código BR11417), as três melhores estirpes isoladas do primeiro experimento, que apresentaram maior eficiência na produção de auxina e na redução de acetileno para cada meio de cultivo, e a ausência de inoculação. A adubação nitrogenada na forma de ureia foi feita parceladamente, metade no plantio e a outra metade aos 60 dias após a emergência das plantas. Foram realizados 20 tratamentos com 4 repetições para o cultivar BRS Tropical. O experimento foi conduzido em vasos contendo 9 kg de solo, totalizando 80 vasos conduzidos com 4 plantas em cada.

3.3.1 Preparo do inoculante

As melhores estirpes de cada meio semiespecífico foram selecionadas para o preparo do inoculante e, posteriormente, realizada a inoculação na variedade BRS Tropical. As estirpes foram cultivadas em 50 mL de meio DYGS a 150 rpm de agitação, temperatura de 30°C por 24 horas. A turfa já se encontrava pronta e estéril, fazendo-se a mistura de 15 mL da suspensão bacteriana para 35g de turfa. Antes do plantio, as sementes foram envoltas na turfa e secas à sombra, na proporção de 10g de turfa por kg de semente.

3.3.2 Características avaliadas

Foram realizadas duas avaliações, sendo a primeira durante o período vegetativo, 60 dias após a emergência das plântulas, para a variedade estudada, quando mediu-se a altura das plantas e o número de perfilhos. A segunda

avaliação ocorreu por ocasião da colheita, avaliando-se altura de plantas, o número de perfilhos, acúmulo de massa fresca e seca de plantas e acúmulo de massa fresca e seca de grãos.

3.3.3 Análise Estatística

Os dados foram analisados no programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983) quanto à sua normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet). A separação das médias foi feita utilizando o teste estatístico LSD a 5% de probabilidade, além do uso da análise de regressão para descrever a resposta das plantas aos diferentes níveis de adubação. Para realização do teste estatístico, foi utilizado o programa Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1: Inoculação de Bactérias Diazotróficas em Vitória da Conquista, região Sudoeste da Bahia

4.1.1 Cultivar BRS Tropical

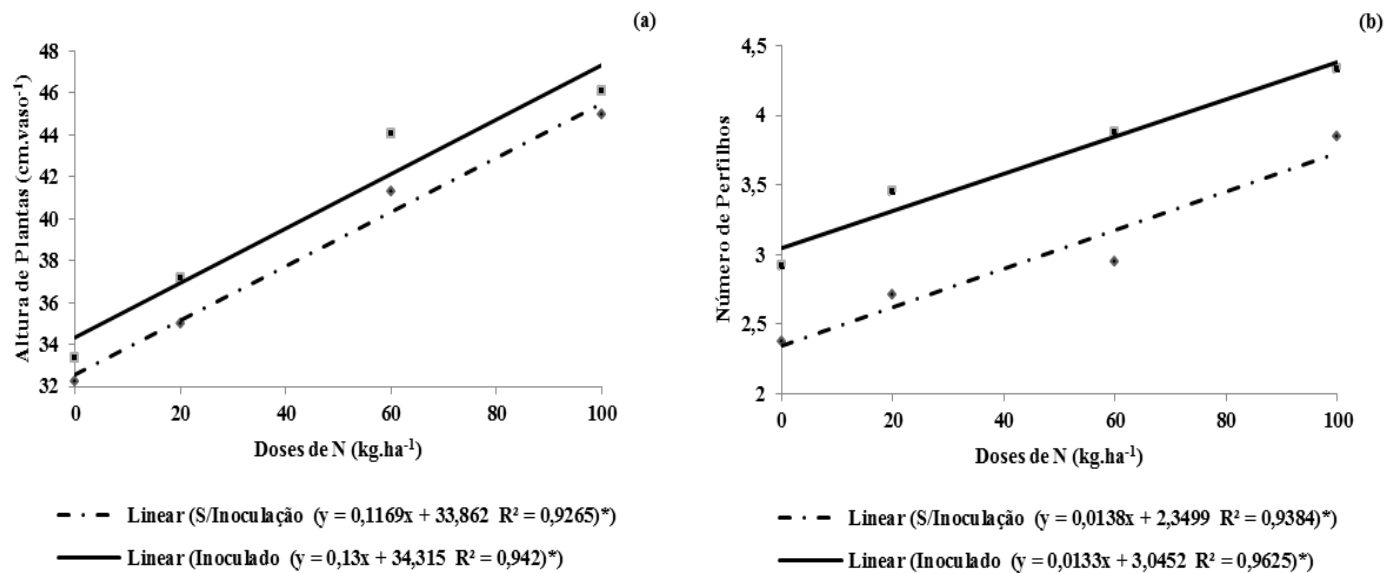
Os resultados obtidos na Análise de Variância (Apêndice A) mostraram que houve diferenças significativas para a inoculação e doses de nitrogênio em todas as variáveis analisadas. Para a interação, apenas a variável altura de plantas não foi estatisticamente significativa.

Para todas as variáveis analisadas, a tendência de comportamento ocorreu de forma linear. Com o aumento das doses de N, verificou-se aumento na altura de plantas aos 60 dias após a emergência (DAE), o maior número de perfilhos por planta e aumento na massa fresca de plantas e no acúmulo de massa seca para o cultivar BRS Tropical (Figuras 1 e 2).

A inoculação com a estirpe ZAE94, combinada com doses de N, proporcionou aumentos de 3,5%, 6,0%, 6,8% e 2,6%, em relação ao tratamento sem inoculação, com as doses 0,20, 60 e 100 kg.ha⁻¹ de nitrogênio, respectivamente, para a variável altura de plantas.

Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que a inoculação foi benéfica à cultura do arroz nas condições testadas e estão de acordo com o experimento realizado por Kuss (2008), utilizando a variedade IRGA-420 aos 40 DAS (dias após a semeadura), combinação entre doses de nitrogênio na forma de ureia (0, 60 e 120 kg.ha⁻¹), inoculação com *Azospirillum brasilense*, isolado UFSM-BD-31-06, e o controle, os quais não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos quanto à altura de plantas, porém,

a inoculação promoveu aumento na variável analisada.



*Diferença Significativa pelo teste LSD ao nível de 5 % de probabilidade.

Figura 1- Análise de regressão da variável altura de plantas e número de perfilhos, em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹) na variedade BRS Tropical, inoculada ou não com a estirpe ZAE 94, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso⁻¹ e 6 repetições). Vitória da Conquista, 2012.

Os resultados encontrados neste trabalho, no qual a inoculação acrescida de 60 kg.ha⁻¹ de nitrogênio apresentou aumento de 37% para a cultivar BRS Tropical, em relação ao tratamento controle para a variável altura de plantas. Estes dados corroboram com os resultados encontrados por Ramos e outros (2010) que, ao avaliarem o crescimento de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum lipoferum* (estirpe BR 11084), 30 dias após a semeadura, observaram aumento na altura de plantas de 21,4%, quando as plantas foram inoculadas com a adição de 30 kg.ha⁻¹ de N, e aumento de 17,6%, quando houve apenas a inoculação.

A inoculação com *H. seropedicae* apresentou aumento de 3,5% na altura de plantas de arroz da cultivar BRS Tropical, corroborando com os resultados encontrados por Pedrinho e outros (2010), que constataram que houve diferenças significativas entre os tratamentos controle, inoculação com *A. brasilense* e *Sphingomonas* spp. quanto à altura de plantas de milho aos 70 dias após a emergência das plântulas. A inoculação com *A. brasilense* apresentou altura de plantas 14% superiores ao controle e a inoculação com *Sphingomonas* spp. apresentou aumento de 4,5%.

Para a variável número de perfilhos, o aumento foi de 22,7%, 27,8%, 31,5% e 12,5%, em relação ao tratamento sem inoculação, com as doses testadas no experimento, respectivamente (Figura 1).

A inoculação com bactérias diazotróficas promoveu aumento no número de perfilhos, provavelmente, conduzindo a ganhos na produção de massa seca e de grãos para a cultivar BRS Tropical, o que estão de acordo com os resultados encontrados por Oliveira e outros (2007), trabalhando com *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Estes autores observaram que essa gramínea, sem aplicação de nitrogênio e com inoculação de bactérias diazotróficas, produziu mais forragem do que a testemunha (sem aplicação de nitrogênio e sem inoculação).

O acúmulo de massa fresca e de massa seca dos tratamentos com inoculação foram superiores ao tratamento sem inoculação. O acúmulo de massa seca foi 27,4%, 28,2%, 50,8 e 44,2%, e o acúmulo de massa fresca foi 32%, 36,2%, 70,5 e 55,7% superior em relação ao tratamento sem inoculação para as doses testadas, respectivamente (Figura 2).

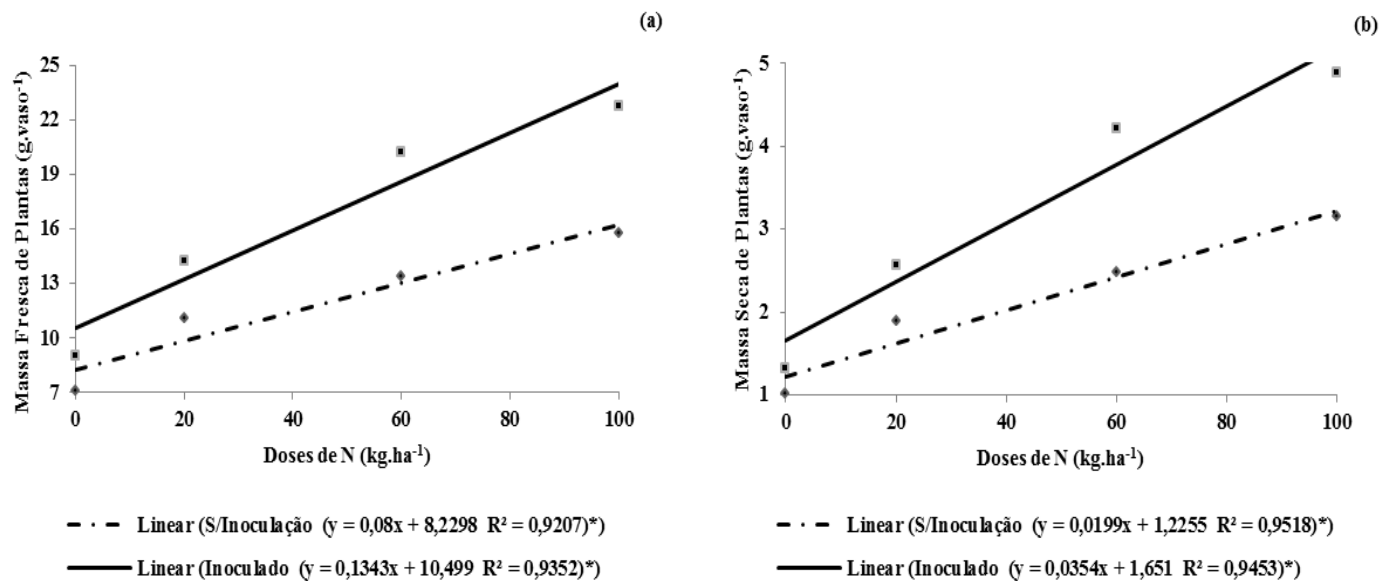
O comportamento do cultivar BRS Tropical foi semelhante ao experimento realizado por Sabino (2003), no qual os maiores acúmulos de massa seca observados corresponderam à inoculação com ZAE 94, independente da cultivar suplementada com aplicação de nitrogênio mineral, proporcionando aumentos de 43% no acúmulo de massa seca, quando comparados ao tratamento controle.

Estudos realizados por Guimarães e outros (2003), avaliando o efeito da inoculação com bactérias diazotróficas na cultura do arroz de sequeiro, observaram que houve aumento na massa seca da parte aérea na presença de inoculação, porém, não encontraram diferenças significativas entre as estirpes avaliadas e o tratamento controle.

Os resultados encontrados para a cultivar BRS Tropical também apresentaram aumento no acúmulo de massa seca, com ganhos de 28%. Guimarães (2006) verificou acúmulo de massa seca nas cultivares IR42 e IAC 4440, inoculadas com a estirpe ZAE 94, apresentando valores acima aos do controle e estatisticamente iguais aos tratamentos com doses de 50 e 100 kg.ha⁻¹ de nitrogênio. As plantas inoculadas mostraram acúmulo de nitrogênio em torno de 12% em relação à testemunha absoluta e, quando adubadas com 50 kg.ha⁻¹ de nitrogênio e inoculadas com a ZAE94, apresentaram acúmulo de nitrogênio de 46%.

Os resultados encontrados no presente trabalho para a cultivar BRS Tropical concordam com os resultados encontrados por Guimarães (2006), porém, diferem dos resultados encontrados por Sabino (2007), nos quais a

inoculação praticamente não influenciou no acúmulo de massa seca nas mesmas cultivares de arroz estudadas.



*Diferença Significativa pelo teste LSD ao nível de 5 % de probabilidade.

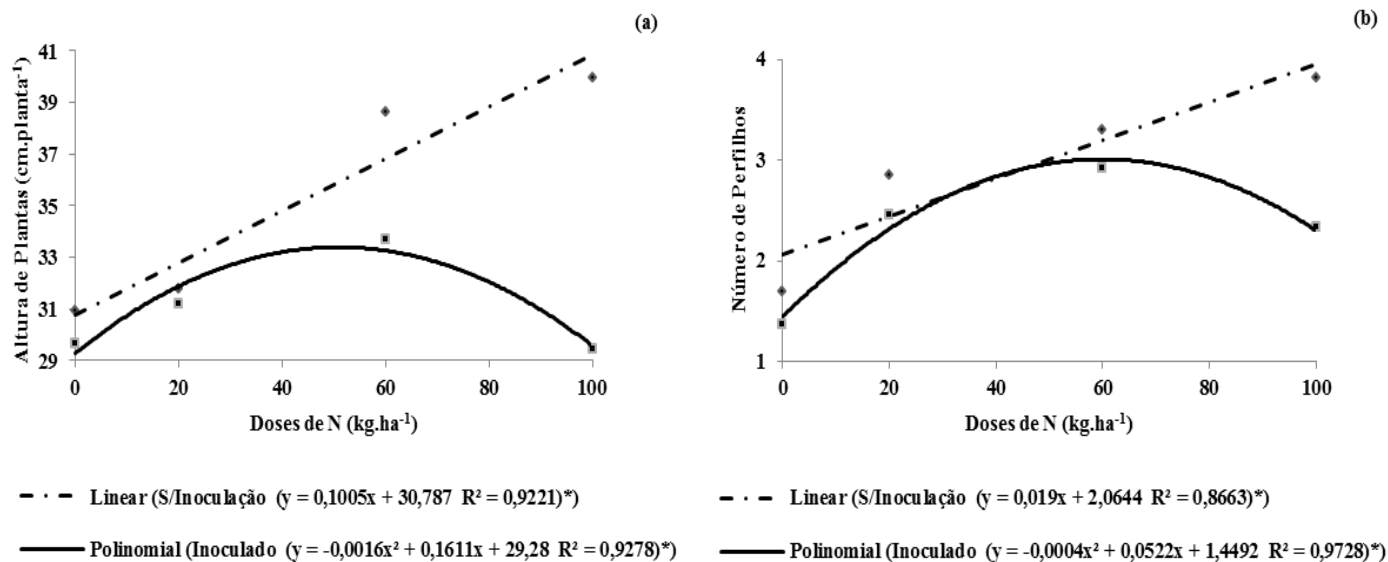
Figura 2 - Análise de regressão da variável acúmulo de massa fresca e seca aos 60 DAE em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹) na variedade BRS Tropical inoculada ou não com a estirpe ZAE 94, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso⁻¹ e 6 repetições). Vitória da Conquista, 2012.

4.1.2 Cultivar BRS MG Curinga

A cultivar BRS MG Curinga teve comportamento diferente da cultivar BRS Tropical para o tratamento inoculado, sendo este inferior ao tratamento sem inoculação e teve tendência de comportamento quadrático, sugerindo que existe uma dose máxima de N que garante o aumento quantitativo das variáveis estudadas (Figuras 3 e 4). Neste caso, foi a dose 60 kg.ha⁻¹ de nitrogênio. Já para o tratamento sem inoculação, a cultivar seguiu a mesma tendência da cultivar BRS Tropical (Figura 3 e 4), em que a maior dose de nitrogênio aplicada foi responsável pelos aumentos das variáveis analisadas.

Em comparação as duas cultivares, a cultivar BRS MG Curinga apresentou menor altura de plantas. Por se tratarem de cultivares com características distintas, não há como realizar comparação ou explicar a variação de comportamento entre os mesmos.

Os resultados encontrados no presente trabalho, nos quais a inoculação com a estirpe ZAE 94 proporcionou altura de plantas 4,5% inferior às plantas que não receberam inoculação (Figura 3), concordam com os resultados encontrados por Kuss e outros (2008) que, avaliando a altura de plântulas de três cultivares de arroz irrigado (IRGA-417, IRGA-419 e IRGA-420), 26 dias após o transplante, inoculadas com *Azospirillum lipoferum* (BR 11080) e *A. Brasilense* (BR-11001), observaram que não houve diferenças significativas entre as duas inoculações e o tratamento controle. O tratamento controle apresentou altura de plantas 3,4% maior que o tratamento inoculado com *A. Brasilense* e 2% maior que aquele com *A. lipoferum*.



*Diferença Significativa pelo teste LSD ao nível de 5 % de probabilidade.

Figura 3 - Análise de regressão da variável altura de plantas e número de perfilhos, em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹), na variedade BRS MG Curinga, inoculada ou não com a estirpe ZAE 94, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso⁻¹ e 6 repetições). Vitória da Conquista, 2012.

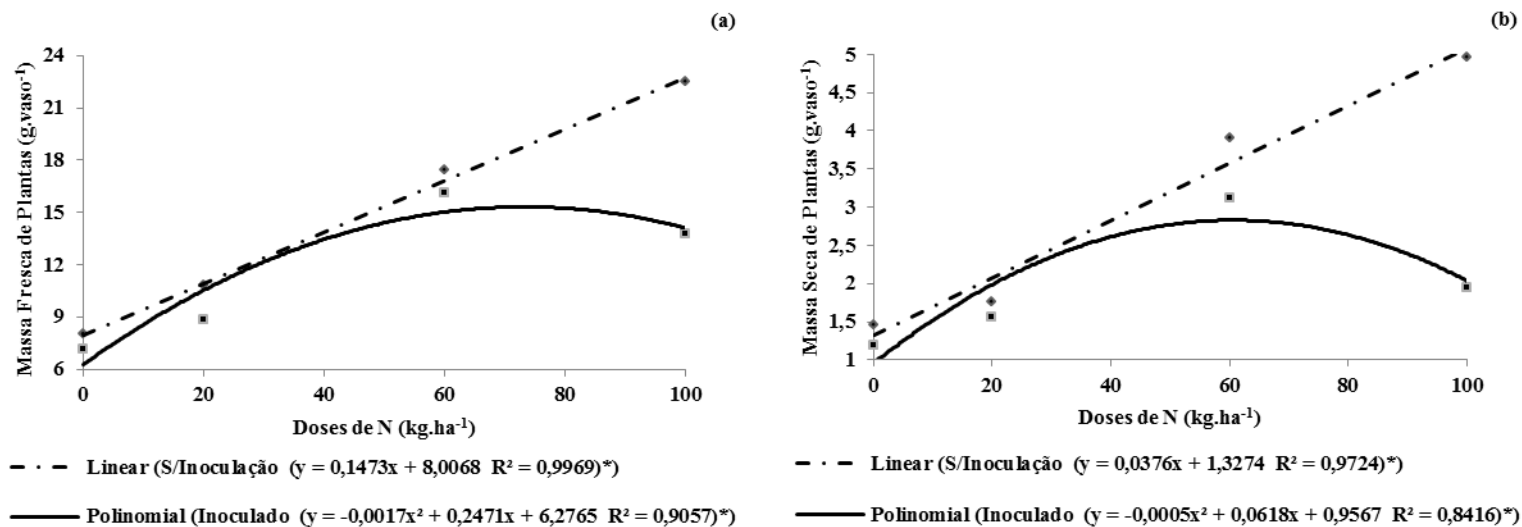
A maior dose de nitrogênio aplicado sem inoculação proporcionou aumento do perfilhamento em 124% em relação ao tratamento sem inoculação e sem adição de nitrogênio. No tratamento inoculado, o número máximo de perfilhos foi observado com a adição de 60 kg.ha⁻¹ de nitrogênio, com aumento de 112%, porém, 11,5% inferior ao tratamento sem inoculação com a mesma dose de N aplicado (Figura 3). Guimarães e outros (2011), estudando os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* spp. em capim-marandu, encontraram resultados semelhantes, nos quais o perfilhamento máximo foi observado no tratamento com adubação nitrogenada. A adubação nitrogenada aumentou o número de perfilhos em 32% e 7,6%, em relação aos tratamentos controle e o inoculado, respectivamente.

A cultivar BRS MG Curinga, inoculada com a estirpe ZAE 94, acrescido de 20 kg.ha⁻¹ de nitrogênio, apresentou ganhos no acúmulo de massa seca em torno de 31% em relação ao tratamento sem adição de nitrogênio, porém, 12% inferior ao tratamento sem inoculação, com a mesma dose de N aplicado (Figura 4). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Ferreira (2008), cujos tratamentos inoculados com a estirpe ZAE 94, acrescidos de 20 kg.ha⁻¹ de nitrogênio, apresentaram uma tendência em aumentar a massa seca da parte aérea de arroz em até 28%, em relação à testemunha absoluta, dependendo da variedade e estágio de desenvolvimento das plantas de arroz, em que os acréscimos foram verificados no estágio vegetativo.

Para todos os parâmetros analisados, ficou evidenciado que a cultivar MG Curinga não apresentou resposta positiva à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* - ZAE 94.

Uma possível explicação para esse resultado seria a época de realização do experimento, que não coincide com a época indicada para o plantio de arroz. Este fato pode ter contribuído para os resultados encontrados neste trabalho. A cultivar BRS MG Curinga apresenta excelente desempenho nas diversas

condições edafoclimáticas de Minas Gerais, desde que seja semeada e colhida na época ideal para o desenvolvimento da cultura. Outra explicação pode estar relacionada ao período de avaliação, que pode ter sido insuficiente para que a inoculação respondesse de forma positiva. Assim, novos trabalhos podem ser realizados a fim de avaliar o comportamento da cultivar BRS MG Curinga e a inoculação com bactérias diazotróficas dentro da época ideal de cultivo, já que o arroz não tolera temperaturas baixas, sendo ideal para o seu desenvolvimento temperaturas entre 20 e 35°C, e a temperatura média em Vitória da Conquista, durante o período do experimento, foi de 17,9°C (INMET, 2012).



*Diferença Significativa pelo teste LSD ao nível de 5 % de probabilidade.

Figura 4 - Análise de regressão da variável acúmulo de massa fresca e seca aos 60 DAE em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹) na variedade BRS MG Curinga inoculada ou não com a estirpe ZAE 94, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso⁻¹ e 6 repetições). Vitória da Conquista, 2012.

4.2 Experimento 2: Isolamento das bactérias diazotróficas

Foram encontradas populações de bactérias diazotróficas nos meios de cultivo JMV, NFB e JNFB. Apenas no meio LGI não foram encontradas populações bacterianas (Tabela 1).

Através da técnica do NMP (número mais provável), o número de bactérias encontradas nas raízes das plantas foram superiores aos valores encontrados na parte aérea das plantas (Tabela 1). Diversos pesquisadores já constataram que o número de bactérias diazotróficas presentes nas plantas de arroz é muito maior nas raízes, quando comparado ao caule e folhas (BALDANI, 1984; BODDEY e outros, 1995; BALDANI, 1996; BARRAQUIO e outros, 1997; GUIMARÃES, 2001; SABINO, 2003; RODRIGUES e outros, 2006; SABINO, 2007).

Tabela 1- População de bactérias diazotróficas presentes nas plantas pela técnica de número mais provável (NMP).

Cultivar	Local de extração	JNFB	NFB	JMV
		número de células por grama de massa fresca (log)		
BRS Tropical	Raiz	6,65	7,65	7,40
	Parte Aérea	5,65	3,60	6,65
BRS MG Curinga	Raiz	6,65	6,98	7,65
	Parte Aérea	5,40	5,65	6,18

Várias bactérias de vida livre e associativas podem ser isoladas a partir de meios semisólidos livres de N (KIRCHOFF e outros, 1997). O crescimento de isolados bacterianos, nos meios semiespecíficos utilizados (JMV, NFB e JNFB), não implica, necessariamente, que todos os isolados obtidos neste estudo sejam dos gêneros *Burkholderia*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, o que torna

necessário que estes isolados também sejam caracterizados quanto às suas características fenotípicas, fisiológicas e genéticas, para confirmação das espécies.

O isolamento de bactérias diazotróficas, oriundas das cultivares BRS Topical e BRS MG Curinga, cultivadas em Vitória da Conquista-BA, permitiu a obtenção de 50 isolados, dos quais 18% foram classificados como similares aos do gênero *Burkholderia*, 16% similares ao gênero *Azospirillum* e 66% similares aos de *Herbaspirillum* (Tabela 2).

Os isolados encontrados na cultivar BRS Tropical (Tabela 1) foram provenientes dos três meios de cultivo usados no experimento, no qual cerca de 55% dos isolados foi proveniente das raízes das plantas desinfestadas. Do total de 31 isolados, 9 foram cultivados em meio JMV e provenientes das raízes das plantas, 8 foram cultivados em meio NFB, sendo 1 oriundo de parte aérea e o restante das raízes das plantas coletadas, e o restante dos isolados foram cultivados em meio JNFB, onde 13 foram isolados da parte aérea das plantas e apenas 1 foi isolado das raízes.

Os isolados encontrados na cultivar BRS MG Curinga foram em menor número, quando comparado aos isolados encontrados na cultivar BRS Tropical. Todos os 19 isolados encontrados foram cultivados em meio JNFB e extraído da parte aérea das plantas (Tabela 2). Esta cultivar pode exercer maior interação com bactérias do gênero *Herbaspirillum*, explicando, assim, o fato de apenas bactérias similares ao gênero terem sido encontradas nesta cultivar.

Tabela 2 - Número de isolados de bactérias diazotróficas obtidos de duas cultivares de arroz (BRS Tropical e MG Curinga), cultivadas em Vitória da Conquista – BA.

Cultivar	Meio JMV (<i>Burkholderia</i> spp.)		Meio NFb (<i>Azospirillum</i> spp.)		Meio JNFb (<i>Herbaspirillum</i> spp.)	
	PA	R	PA	R	PA	R
BRS Tropical	-	9	1	7	13	1
MG Curinga	-	-	-	-	19	-
Total	9		8		33	

O gênero *Herbaspirillum* foi o único encontrado em ambas cultivares, porém, com maior incidência na parte aérea das plantas cultivadas (Tabela 2).

Os resultados encontrados neste estudo são semelhantes aos encontrados por Brasil e outros (2005) e Cardozo (2008), em isolamento de bactérias diazotróficas que colonizavam raízes, colmos e folhas de cultivares de arroz irrigado, obtendo-se um número mais alto de isolados do gênero *Azospirillum*, originados de raízes em comparação com colmos. Brasil e outros (2005) também encontram em braquiária, capim carona e capim mimoso maior número de bactérias diazotróficas nas raízes do que na parte aérea ou no solo.

Araújo (2008) e Rodrigues e outros (2006) observaram uma maior população de bactérias diazotróficas em raízes de arroz, quando comparadas à população encontrada em colmos e folhas, o que também foi observado para as bactérias dos gêneros *Burkholderia* e *Azospirillum*, porém, divergente dos resultados encontrados para o gênero *Herbaspirillum*.

Os isolados testados não foram eficientes quanto à solubilização de fosfato, o que significa que nenhum isolado foi capaz de solubilizar o fosfato inorgânico.

4.2.1 Produção de Ácido Indolacético (AIA)

A produção de ácido indolacético ou auxina (AIA), pelas bactérias associadas com as plantas, estimulam a alongação celular, a divisão e diferenciação celular nas plantas (DOBBELAERE e outros, 2003). Os isolados estudados apresentaram capacidade diferenciada quanto à produção do hormônio auxina (AIA).

Os resultados encontrados nos três gêneros avaliados apresentaram valores compreendidos entre 0,261 e 4,347 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína (ptn). O maior valor encontrado para a produção de auxina foi do isolado 37C, obtido da parte aérea da cultivar BRS MG Curinga, cultivada em meio JNFB, similar ao observado nas bactérias do gênero *Herbaspirillum*. O menor valor encontrado foi do isolado A, obtido da raiz da cultivar BRS Tropical, cultivado em meio JMV, similar às bactérias do gênero *Burkholderia*.

As maiores concentrações de compostos indólicos produzidos foram encontradas nos isolados similares a *Herbaspirillum* spp., seguido pelos isolados similares a *Burkholderia* spp. e similares de *Azospirillum*spp. Radwan e outros (2004) observaram que estirpes de *Azospirillum* spp. produzem de três a sete vezes mais compostos indólicos que estirpes de *Herbaspirillum*, o que diverge do presente trabalho, em que os isolados crescidos no meio JNFb, supostamente classificados como pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* spp., produziram em média 3,36 vezes mais composto indólicos do que os isolados do gênero *Azospirillum*.

Tabela 3- Capacidade de Produção de Auxina e capacidade de Redução de Acetileno por bactérias cultivadas em meios de cultivo JMV, NFb e JNFb (continua)

Isolado	Produção de Auxina (ug/ml de ptn)	Redução de Acetileno (mmol/h/ml de ptn)	Extração	Meio de Cultura
A	0,260867s	89.1440m	Raiz	JMV
1 A	0,482967r	83.8167n	Raiz	JMV
2 A	1,141167n	39.2863r	Raiz	JMV
3 A	1,473067l	129.4737i	Raiz	JMV
4 A	1,476533l	83.9177n	Raiz	JMV
5 A	1,355633m	73.7663o	Raiz	JMV
6 A	1,149100n	31.0713s	Raiz	JMV
7 A	1,213567n	45.1567q	Raiz	JMV
8 A	1,844867i	163.0573c	Raiz	JMV
1 B	0,668433q	30.9477s	Raiz	NFb
4 B	0,660733q	33.8060s	Raiz	NFb
6 B	0,468700r	115.5047j	Raiz	NFb
9 B	0,527133r	30.4020s	Raiz	NFb
12 B	0,756067q	142.5363f	Raiz	NFb
16 B	1,374833m	133.1050h	Raiz	NFb
17 B	2,189967h	137.3937g	Parte Aérea	NFb
18 B	1,627033j	19.1783t	Raiz	NFb
1 C	1,052667o	199.7177a	Parte Aérea	JNFb
2 C	1,443900l	165.5707c	Parte Aérea	JNFb
3 C	1,286167n	181.2887b	Parte Aérea	JNFb
4 C	1,786833i	120.4983j	Parte Aérea	JNFb
6 C	1,242433n	182.9253b	Parte Aérea	JNFb
7 C	1,010700o	52.4077p	Parte Aérea	JNFb
8 C	1,246200n	176.2757b	Parte Aérea	JNFb

10 C	1,563933l	137.3490g	Parte Aérea	JNFb
------	-----------	-----------	-------------	------

Continuação

11 C	1,665667j	129.3000i	Parte Aérea	JNFb
14 C	1,731933j	180.5873b	Parte Aérea	JNFb
15 C	1,539567l	179.0817b	Parte Aérea	JNFb
16 C	1,336933m	69.3117o	Parte Aérea	JNFb
20 C	1,828433i	149.5740e	Parte Aérea	JNFb
22 C	1,412167m	135.9387g	Raiz	JNFb
23 C	3,350700e	126.0990i	Parte Aérea	JNFb
24 C	3,893000b	158.1157d	Parte Aérea	JNFb
25 C	3,781333c	163.1320c	Parte Aérea	JNFb
27 C	3,154800f	154.9537d	Parte Aérea	JNFb
28 C	3,297967e	152.4887d	Parte Aérea	JNFb
30 C	3,786167c	154.7167d	Parte Aérea	JNFb
31 C	3,318867e	181.5587b	Parte Aérea	JNFb
32 C	3,709200c	97.6840l	Parte Aérea	JNFb
33 C	3,343767e	146.4560e	Parte Aérea	JNFb
35 C	3,479267d	125.9333i	Parte Aérea	JNFb
36 C	3,923900b	133.2053h	Parte Aérea	JNFb
37 C	4,347300a	165.3170c	Parte Aérea	JNFb
38 C	3,118500f	161.0403c	Parte Aérea	JNFb
41 C	3,424733d	141.5430f	Parte Aérea	JNFb
42 C	3,318700e	157.7300d	Parte Aérea	JNFb
43 C	2,853567g	147.4773e	Parte Aérea	JNFb
44 C	3,765233c	45.8017d	Parte Aérea	JNFb
46 C	3,074267f	22.3610t	Parte Aérea	JNFb
48 C	3,726633c	16.55867t	Parte Aérea	JNFb

Valores seguidos da mesma letra, dentro da coluna, não diferem entre si, segundo o teste Skott Knot, a 5% de probabilidade.

4.2.2 Técnica de Redução de Acetileno (ARA)

A capacidade de realizar a FBN, por meio da atividade da nitrogenase, medida pela técnica de redução de acetileno (ARA), demonstrou que todos os isolados selecionados foram capazes de reduzir o acetileno a etileno, comprovando a eficiência destas bactérias quanto ao potencial de fixar o nitrogênio atmosférico em maior ou menor intensidade.

A variabilidade entre os isolados ocorreu na faixa de 16,559 a 199,717 mmol/ml de proteína por hora de incubação. Esta alta variabilidade ocorreu entre os meios de cultivo semisólido utilizados, onde o maior valor foi encontrado no isolado 1 C, proveniente da parte aérea das plantas da cultivar BRS MG Curinga, e o menor valor de ARA foi encontrado no isolado 48C, proveniente da parte aérea das plantas da cultivar BRS Tropical, ambos cultivados em meio JNFb.

Esta alta variabilidade na capacidade de se realizar a FBN, por meio da técnica de redução de acetileno, foi também observada em bactérias isoladas de arroz por Rodrigues e outros (2006) e Kuss e outros (2007). Han e New (1998) observaram que a alta FBN em meio de cultivo não se relaciona com a alta FBN em campo.

Para a realização do segundo experimento, foi selecionada uma bactéria de cada meio de cultivo trabalhado, por meio da combinação dos melhores resultados de produção de compostos indólicos e capacidade de reduzir o acetileno de cada meio de cultivo. Os isolados selecionados foram 8A, 17B e 37C.

O isolado 8A foi isolado da raiz da cultivar BRS Tropical e apresentou valores de AIA=1,844867 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína e de ARA=163.0573 mmol/h/ml de proteína. Estes foram os maiores valores encontrados pelo isolados cultivados em meio JMV.

O isolado 17B provém da parte aérea da cultivar BRS Tropical e apresentou valores de AIA = $2,189967\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de ptn ARA = 137.3937mmol/h/ml de proteína. Para a produção de auxina, o isolado 17B foi o que apresentou maior valor entre os isolados cultivados no meio NFB, porém, para a capacidade de redução de acetileno, ele foi o segundo maior. A escolha do isolado 17B em relação ao isolado 12B, o qual apresentou maior valor de ARA, foi devido ao fato de que a sua produção de AIA foi bem inferior à mesma produção pelo isolado 17B. Dessa forma, o isolado 17B foi selecionado por apresentar uma combinação dos melhores valores de AIA e ARA.

O isolado 37C foi isolado da parte aérea da cultivar BRS MG Curinga e apresentou valores de AIA = $4,347300\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína e de ARA = 165.3170mmol/h/ml de proteína. Este isolado também não apresentou o maior valor de ARA, mas apresentou a melhor combinação dos resultados de AIA e ARA.

4.3 Experimento 3: Plantio de arroz para avaliação da eficiência dos isolados quanto às características agronômicas

Cultivar BRS Tropical

Os resultados obtidos na Análise de Variância (Apêndice C) mostraram que houve diferenças significativas quanto à inoculação (I), às doses de nitrogênio (D) e à interação D x I, para todos os parâmetros analisados.

O desdobramento da inoculação proporcionou diferenças significativas dentro de cada dose de N analisada. Em todas as doses estudadas, a estirpe 17B foi superior às demais inoculações para a variável altura de plantas, aos 60 dias, após a emergência, nas doses 20, 60 e $100\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de nitrogênio. Nas variáveis acúmulo de massa fresca e seca de plantas, a estirpe 17B foi estatisticamente igual às inoculações em todas as doses estudadas. Na altura final de plantas,

apenas na dose 100 kg de N, a estirpe 17B foi inferior ao tratamento sem inoculação, porém, estatisticamente igual. A estirpe 37C superou as demais quanto ao número de perfilhos em todas as doses estudadas. A estirpe ZAE94 foi superior para as variáveis acúmulo de massa fresca e seca de grãos. Para a variável número de perfilhos, todos os tratamentos tiveram comportamento semelhante, apresentando pouca variação estatística (Tabela 3).

De uma forma geral, a inoculação com bactérias diazotróficas foi positiva para a cultivar BRS Tropical, em relação ao tratamento sem inoculação, com ganhos de 9,4% e 3,3% na altura de plantas, aos 60 DAE, e altura final de plantas, respectivamente, 14,4% no número de perfilhos, 97 e 98% no acúmulo de massa fresca e seca de plantas, e 7,4 e 3,2% no acúmulo de massa fresca e seca de grãos.

A análise de regressão para o desdobramento de doses seguiu a mesma tendência em todas as variáveis analisadas, segundo cada inoculação estudada. As estirpes 17B, 37C e ZAE94 tiveram tendência de comportamento quadrático, no qual a dose 60 kg de nitrogênio proporcionou o maior aumento nas variáveis analisadas e economia no volume de N aplicado. A estirpe 1A teve tendência de comportamento linear de forma negativa, no qual o aumento na dose de nitrogênio proporcionou diminuição nas variáveis analisadas, e o tratamento controle teve tendência de comportamento linear, sugerindo que o aumento da dose de nitrogênio garanta aumentos das variáveis estudadas.

Tabela 4 - Inoculação com 4 estirpes de bactérias diazotróficas e tratamento sem inoculação sobre os efeitos de altura de plantas aos 60 DAE, altura final de plantas, número de perfilhos, massa fresca de plantas, massa fresca de grãos, massa seca de plantas e massa seca de grãos.

Dose	Inoculação	Altura aos 60 DAE cm.planta ⁻¹	Altura Final cm.planta ⁻¹	Perfilhos	Massa Fresca de Plantas g.planta ⁻¹	Massa Fresca de Grãos g.planta ⁻¹	Massa Seca de Plantas g.planta ⁻¹	Massa Seca de Grãos g.planta ⁻¹
Sem N	1 A	42,10a	57,33a	3,06b	39,23a	7,40c	19,14a	3,43c
Sem N	17 B	43,04a	58,83a	3,44a	40,68a	7,99bc	20,65a	3,73bc
Sem N	37 C	42,22a	57,38a	3,50a	39,66a	7,51c	19,43a	3,55bc
Sem N	ZAE94	39,48b	55,96b	3,06b	31,92b	8,81a	15,09b	4,15a
Sem N	Sem Inoculação	39,33b	56,95b	3,06b	20,67c	8,20ab	10,42c	4,02ab
20 kgde N	1 A	42,43b	56,93c	3,13a	38,98a	7,68c	19,56a	3,72c
20 kg de N	17 B	44,10a	59,72a	3,19a	42,79a	8,55ab	21,38a	4,12b
20 kgde N	37 C	42,44b	59,39ab	3,44a	41,78a	8,36ab	20,57a	4,37ab
20 kg de N	ZAE94	40,06c	57,86bc	3,19a	39,35a	9,44a	19,42a	4,86a
20 kgde N	Sem Inoculação	40,05c	58,08b	3,06a	26,64b	8,42ab	13,27b	4,17b
60 kg de N	1 A	41,24c	55,57c	3,38a	36,54b	6,92c	17,78b	3,12c
60 kg de N	17 B	45,03a	62,40a	3,25a	44,58a	9,72ab	22,00a	4,65ab
60 kg de N	37 C	42,97b	59,86b	3,44a	44,13a	8,89b	21,72a	4,25b
60 kg de N	ZAE94	40,72c	59,06b	3,44a	41,36a	10,46a	20,99a	5,56a
60 kg de N	Sem Inoculação	41,48bc	59,78b	3,19a	29,82c	8,63b	14,45c	4,32b
100 kg de N	1 A	41,13bc	55,19c	3,38b	35,30bc	6,28b	16,26c	2,97b
100 kg de N	17 B	43,49a	60,26a	3,56ab	42,53a	8,25a	21,12a	3,84a
100 kg de N	37 C	40,97bc	58,58b	3,88a	41,53a	8,13a	20,79a	4,03a
100 kg de N	ZAE94	39,13c	56,72bc	3,47ab	37,47b	8,92a	18,14b	4,66a
100 kg de N	Sem Inoculação	41,66b	60,42a	3,50ab	32,04c	8,85a	16,61c	4,54a

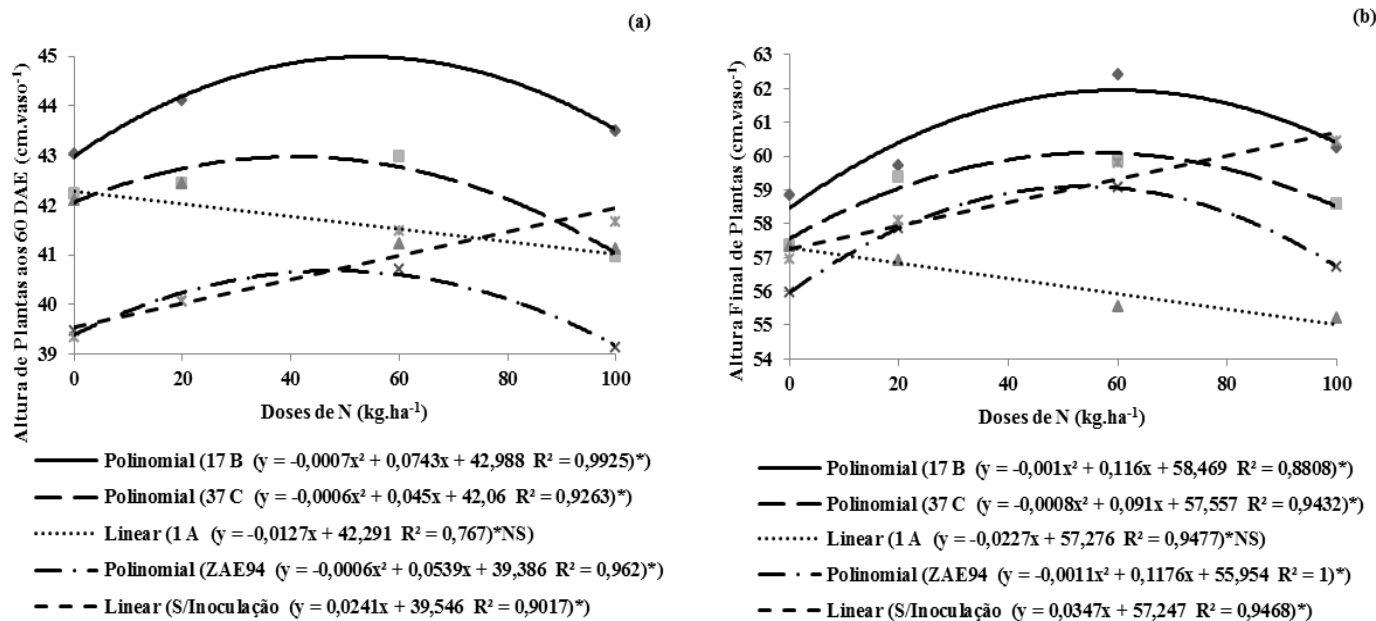
1 A – Similar à *Burkholderia* spp; 17 B - Similar à *Azospirillum* spp.; 37 C – Similar à *Herbaspirillum* ssp.; ZAE94 - *Herbaspirillum seropedicae*; Valores seguidos da mesma letra, dentro da coluna, não diferem entre si para cada inoculação testada, segundo o teste LSD, a 5% de probabilidade.

Todas essas observações foram válidas para as variáveis analisadas, exceto para o número de perfilhos, do qual em todos os tratamentos a tendência foi linear (Figuras 5, 6 e 7).

A aplicação de doses inferiores às recomendadas para a cultura resultou em maiores ganhos e gerou economia, já que reduziu a quantidade de N aplicado. Inúmeros resultados confirmam os encontrados neste trabalho, nos quais o uso de pequenas doses de N podem beneficiar a FBN (ALVES e outros, 2003; GUIMARÃES, 2006; SABINO, 2007).

Em muitos casos, a ausência de resposta à inoculação por gramíneas é devido ao uso de linhagens inadequadas (REIS e outros, 2000). Deve-se considerar a interação genótipo x estirpe de bactéria diazotrófica, já que a pouca ou ausência desta interação pode não promover efeitos positivos na FBN.

Sala e outros (2008) não encontraram diferenças entre a adubação com 60 e 120 kg.ha⁻¹ de nitrogênio na cultura do trigo, na presença de inoculação. Provavelmente, isso está relacionado a alguma modificação fisiológica ou morfológica, promovida pela bactéria, na qual a maior dose de N aplicado não representou consumo de luxo para as plantas. Fato este que pode ter sido observado no presente trabalho, porém, sem comprovação científica, ou pode ainda ter sido resultado da melhor interação entre as bactérias inoculadas e o genótipo da planta.



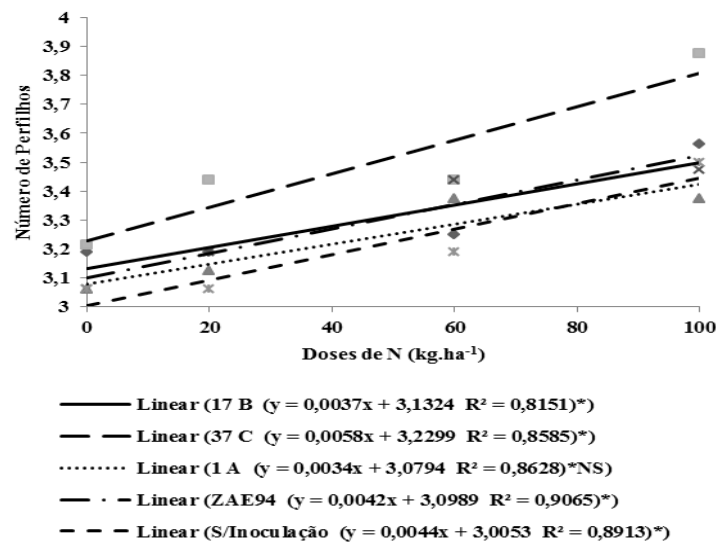
*Significativo pelo teste LSD ao nível de 5 % de significância;

*NS – Não significativo pelo teste LSD ao nível de 5 % de significância.

Figura 5- Análise de regressão da variável altura de plantas aos 60 DAE e altura final de plantas, em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹), na variedade BRS Tropical, inoculada com as estirpes 1 A, 17 B, 37 C, ZAE 94 e ausência de inoculação, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso⁻¹ e 4 repetições). Vitória da Conquista, 2012.

Dotto e outros (2010), estudando a produtividade do milho em resposta à inoculação com *H. seropedicae* e diferentes níveis de N, observaram que não houve interação positiva entre inoculação de *H. seropedicae* e níveis de N em cobertura para as variáveis analisadas.

Em geral, a inoculação com estirpes isoladas na região apresentou superioridade em relação à inoculação com ZAE 94, para a variável altura de plantas, evidenciando que isolados nativos são mais eficientes, pois já são adaptados às condições edafoclimáticas da região.



*Significativo pelo teste LSD ao nível de 5 % de significância;

*NS – Não significativo pelo teste LSD ao nível de 5 % de significância.

Figura 6-Análise de regressão da variável número e perfilhos, em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹), na variedade BRS Tropical, inoculada com as estirpes 1 A, 17 B, 37 C, ZAE 94 e ausência de inoculação, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso⁻¹ e 4 repetições). Vitória da Conquista, 2012.

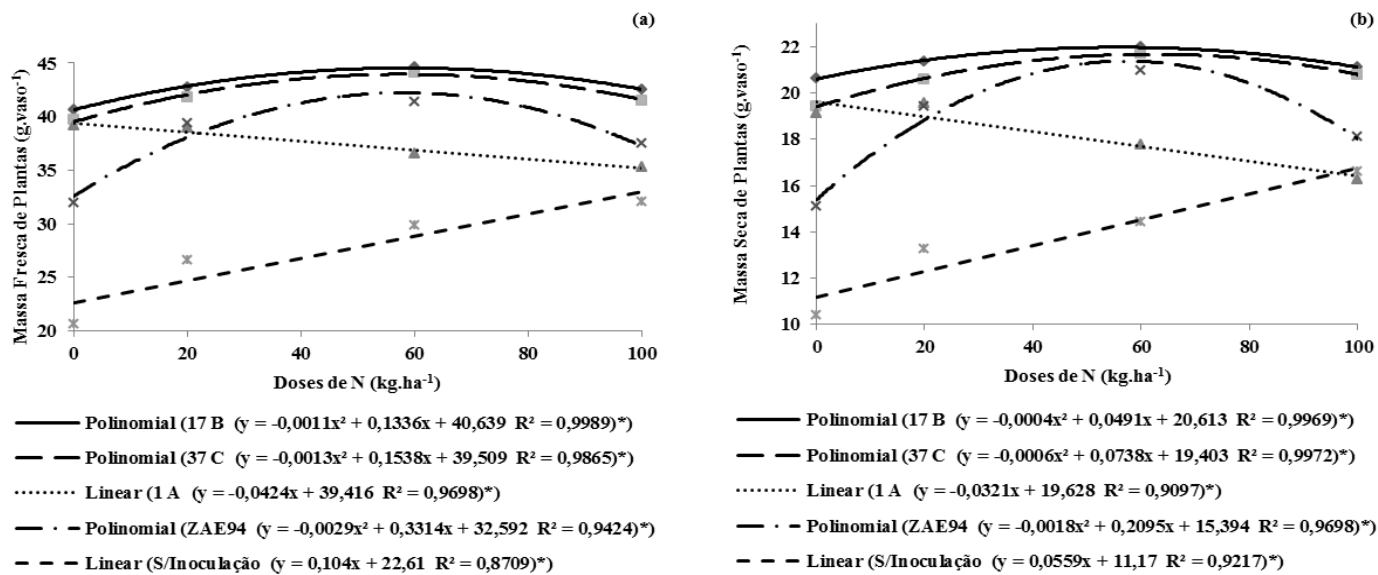
A altura de plantas foi inferior à altura de plantas descrita para a cultivar, fato que pode ter sido influenciado pelas condições testadas durante a condução do experimento (Figura 5). Comparando os resultados encontrados nos dois experimentos, a inoculação com a estirpe ZAE94 foi superior neste experimento em relação ao primeiro experimento realizado em 2011, para altura de plantas, o que pode ser explicado pelo plantio e avaliações em épocas distintas.

Os resultados aqui encontrados apresentaram diferenças significativas em todas as inoculações testadas, o que diverge dos resultados encontrados por Araújo (2008), estudando 9 genótipos de arroz e 7 inoculações diferentes, no quais observou que a altura de plantas não foi influenciada pelas diferentes inoculações.

Ramos e outros (2010) encontraram aumentos significativos na altura de plantas de milho, quando houve a inoculação com *Azospirillum*, e resultados ainda superiores quando a inoculação teve adição de N.

Para a variável número de perfilhos, os resultados encontrados estão de acordo com Sala e outros (2008) que, avaliando a interação entre bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada na cultura do trigo, observaram maior contribuição da inoculação no período vegetativo para o perfilhamento da planta, possibilitando maior número de panículas por m², conseqüentemente, aumento na produtividade.

A inoculação mostrou efeitos positivos e estatisticamente superiores ao tratamento sem inoculação, em relação ao acúmulo de massa seca de plantas. A estirpe ZAE94, embora inferior às inoculações 17B e 37C, foi a mais responsiva ao aumento de doses de N, até a dose 60 kg.ha⁻¹, com aumento de 30% em relação ao tratamento sem adição de N. A inoculação com as estirpes 17B e 37C, apresentaram, respectivamente, aumentos de 9,5 e 11,3%, e para as inoculações com as estirpes 17 B e 37 C, para a mesma dose de N (Figura 7).



*Significativo pelo teste LSD ao nível de 5 % de significância;

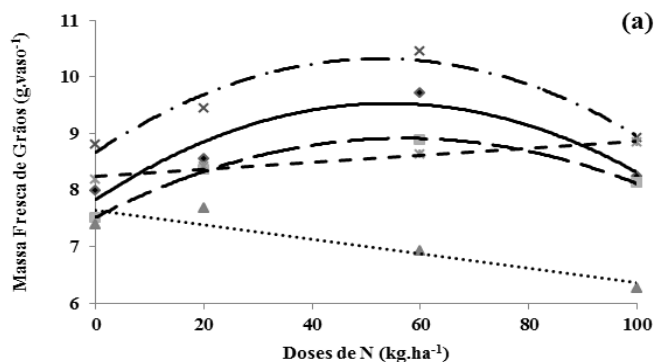
Figura 7 - Análise de regressão das variáveis acúmulo de massa fresca e seca de plantas, em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹), na variedade BRS Tropical, inoculada com azeitirpes 1 A, 17 B, 37 C, ZAE 94 e ausência de inoculação, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso⁻¹ e 4 repetições). Vitória da Conquista, 2012.

Na Figura 7, foi observado que as inoculações responderam de forma positiva ao incremento de doses de nitrogênio, até o limite de 60 kg.ha⁻¹ para as estirpes 17B, 37C e ZAE 94. Estes resultados divergem dos encontrados por Guimarães e outros (2003), que observaram efeito positivo no acúmulo de massa seca de plantas de arroz da variedade Guarani, aos 40 dias após transplântio das plantas inoculadas com estirpes de *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, mas não aos 70 e 130 dias após o transplântio.

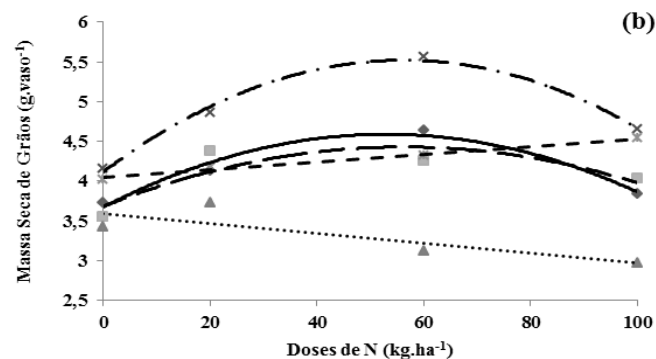
Riggs e outros (2001), trabalhando com as culturas de milho e trigo, em condições de casa de vegetação, verificaram que a inoculação de *H. seropedicae* promoveu acréscimos de produção de matéria seca de 49 a 82%, quando aplicada juntamente com fertilizante nitrogenado, em comparação com 16% de aumento, quando as plantas foram apenas inoculadas e não adubadas.

Guimarães e outros (2010) observaram efeitos positivos no acúmulo de massa seca para o cultivar IAC4440, inoculada e seguida de adubação nitrogenada. No estágio de florescimento, os maiores acúmulos foram observados nos tratamentos adubados com 50 e 100 kg.ha⁻¹ de N. Os incrementos foram de 30 e 16%, respectivamente, para *H. seropedicae* e *Burkholderia* sp. Esses autores observaram, também, que no estágio de enchimento de grãos, as plantas inoculadas com as bactérias diazotróficas mostraram maiores incrementos de massa seca, quando em conjunto com a adubação nitrogenada.

Guimarães e outros (2011) observaram que plantas de arroz inoculadas e sem a suplementação com N-mineral não apresentaram diferenças, com relação ao controle, porém, os tratamentos que receberam com adubação nitrogenada na forma de sulfato de amônio obtiveram maiores acúmulos de massa seca.



— Polinomial (17 B ($y = -0,0006x^2 + 0,0627x + 7,8339$ $R^2 = 0,9038$)*)
 - - Polinomial (37 C ($y = -0,0004x^2 + 0,049x + 7,522$ $R^2 = 0,9982$)*)
 Linear (1 A ($y = -0,0129x + 7,6489$ $R^2 = 0,8664$)*NS)
 - · - Polinomial (ZAE94 ($y = -0,0006x^2 + 0,0629x + 8,6723$ $R^2 = 0,9333$)*)
 - - - Linear (S/Inoculação ($y = 0,0062x + 8,2447$ $R^2 = 0,9741$)*NS)



— Polinomial (17 B ($y = -0,0003x^2 + 0,0346x + 3,672$ $R^2 = 0,9581$)*)
 - - Polinomial (37 C ($y = -0,0002x^2 + 0,0265x + 3,6819$ $R^2 = 0,7106$)*)
 Linear (1 A ($y = -0,0062x + 3,5921$ $R^2 = 0,6933$)*NS)
 - · - Polinomial (ZAE94 ($y = -0,0004x^2 + 0,0499x + 4,1165$ $R^2 = 0,991$)*)
 - - - Linear (S/Inoculação ($y = 0,0049x + 4,0398$ $R^2 = 0,989$)*NS)

*Significativo pelo teste LSD ao nível de 5 % de significância;

*NS – Não significativo pelo teste LSD ao nível de 5 % de significância.

Figura 8 - Análise de regressão das variáveis acúmulo de massa fresca e seca de grãos, em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹), na variedade BRS Tropical, inoculada com azeitirpes 1 A, 17 B, 37 C, ZAE 94 e ausência de inoculação, sob condições de casa de vegetação (média de 4 plantas.vaso⁻¹ e 4 repetições). Vitória da Conquista, 2012.

Os resultados encontrados para a produção de grãos mostraram que a inoculação com as diferentes estirpes de bactérias diazotróficas foi positiva e estatisticamente superiores ao tratamento sem inoculação. Na dose 60 kg.ha⁻¹ de N, os ganhos foram de 7,6% e 28,7% para as estirpes 17B e ZAE94, respectivamente, em relação ao tratamento sem inoculação com a mesma dose de N aplicado. A inoculação com estirpe 37C foi estatisticamente igual ao tratamento sem inoculação.

Guimarães e outros (2010) encontraram ganhos de 3%, em média, para a cultivar IAC 4440, inoculada com bactérias diazotróficas, em relação ao controle, embora sem efeitos significativos.

Baldani e outros (2000) mostraram que estirpes de *B. brasilensis* promoveram aumentos na produção de grãos, variando de 11 a 20%, sob condições de casa de vegetação. Estes autores ainda observaram que os tratamentos inoculados com estirpes de *H. seropedicae* promoveram aumentos de até 19% na produção de grãos.

Ferreira (2004) observou aumentos na produção e no conteúdo de N nos grãos na cultivar IAC4440, variando entre 13 e 19%, quando as plantas foram inoculadas com *H. seropedicae*.

Estimando a produção de grãos para um hectare com espaçamento entre linhas de 0,3 m e com 100 plantas por metro linear, baseando-se na produção de grãos por vaso de planta, observa-se que a produção foi superior em todos os tratamentos estudados à produção descrita para a cultivar que é de 6.000 kg.ha⁻¹ (Tabela 5).

Tabela 5: Estimativa da produção de grãos (em Mg.ha⁻¹) em função das doses de nitrogênio (0, 20, 60 e 100 kg.ha⁻¹), na variedade BRS Tropical, inoculada com as estirpes 1 A, 17 B, 37 C, ZAE 94 e ausência de inoculação.

Inoculação	Doses de N (kg.ha ⁻¹)			
	0	20	60	100
1 A	7,718	8,370	7,020	6,682
17 B	8,393	9,270	10,462	8,640
37 C	7,987	9,832	9,562	9,067
ZAE 94	9,338	10,935	12,510	10,485
S/Inoculação	9,045	9,383	9,720	10,215

A inoculação com as estirpes 17B, 37C e ZAE 94, acrescida de 60 kg.ha⁻¹ de nitrogênio, proporcionou aumento na produção de 174,4%, 159,4% e 208,5%, respectivamente, em relação à produção descrita para a cultivar. A inoculação com bactérias diazotróficas nativas da região Sudoeste da Bahia mostrou-se bastante eficiente para a produção de grãos, garantindo uma alta produtividade com economia de fertilizante nitrogenado, porém, a inoculação com a estirpe ZAE 94 proporcionou aumentos ainda maiores do que a inoculação com as estirpes isoladas da região (Tabela 5).

Com a inoculação de bactérias diazotróficas, espera-se alcançar aumentos na produção de grãos com redução no volume de adubos nitrogenados, contribuindo para a sustentabilidade do sistema agrícola, o que foi observado no presente trabalho.

A máxima resposta na produção de grãos foi observada com a inoculação com a estirpe ZAE 94, acrescida de 60 kg.ha⁻¹ de nitrogênio, cujo aumento foi superior a 200%. O tratamento sem inoculação sem bactérias diazotróficas apresentou produção superior aos tratamentos inoculados com as estirpes isoladas nas doses 0 e 100 kg.ha⁻¹ de nitrogênio, com ganhos de até

17,2% e 52,9%, respectivamente.

O efeito positivo da inoculação com bactérias diazotróficas foi observado por diversos autores. Ferreira e outros (2003), estudando as variedades IR 42 e IAC 4440, em condições de campo, observaram aumentos na produção de grãos de 38 e 18%, respectivamente, quando inoculado com a estirpe ZAE 94 em relação ao tratamento controle que não recebeu inoculação.

Guimarães (2006) observou aumento na produção de grãos de arroz para a cultivar IR42 em relação à testemunha absoluta com plantas inoculadas com as estirpes ZAE 94 e M 130, acrescidas de 50 kg.ha⁻¹ de nitrogênio. A estirpe M 130 apresentou aumento na produção em torno de 21%.

Cavallet e outros (2000), estudando a produção de milho inoculadas com o inoculante comercial “Graminante”, a base de *Azospirillum* spp., observaram que a inoculação e o uso de adubação nitrogenada aumentaram a produção em 30%.

Sala e outros (2007), estudando plantas de trigo IAC-370, inoculadas com os isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-11, observaram aumentos na produção de grãos em 20 e 26%, quando as plantas foram adubadas com 120 kg.ha⁻¹ de nitrogênio.

5 CONCLUSÕES

- O isolamento permitiu a obtenção de 50 isolados, 19 da cultivar BRS MG Curinga e 31 do cultivar BRS Tropical;
- Os isolados não apresentaram eficiência em solubilizar fosfato inorgânico;
- Dentre os isolados obtidos, os 1A, 17B e 37C apresentaram os maiores resultados na produção de auxina e capacidade em reduzir o acetileno, dependendo do meio utilizado;
- A inoculação com bactérias diazotróficas, acrescida de 60 kg.ha⁻¹ de N, exceto a estirpe 1A, proporcionou efeitos positivos quanto às características agronômicas analisadas com aumentos de até 28,7% na produção de grãos, estatisticamente superiores aos demais tratamentos;
- Verifica-se uma maior contribuição da inoculação, quando associada à adubação nitrogenada mineral;
- Nas condições testadas, a estimativa de produção de grãos demonstrou que a inoculação com bactérias diazotróficas proporcionou aumentos de até 208,5%, dependendo da estirpe utilizada.

6 REFERÊNCIAS

AKITA, S. Improving yield potential in tropical rice. In: IRRI. **Progress in irrigated rice research**. Los Baños, p.41-73, 1989.

ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252: p.1-9, 2003.

ARAÚJO, A. E. da S. **Caracterização e uso de bactérias diazotróficas isoladas de diferentes cultivares de arroz originárias do estado do Maranhão**. 2008. 99p. Tese (Doutorado em Agronomia - Fitotecnia) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

AZAMBUJA, I.H.V.; VERNETTI Jr., F.J.; MAGALHÃES Jr., A.M. Aspectos socioeconômicos da produção do arroz. In: GOMES, A. da S.; MAGALHÃES Jr., A.M. de (Eds técnicos). **Arroz Irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004, 899p.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DOBEREINER, J. A. 4th *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 56, n. 3, p. 365, 1984.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**.v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J. I.; REIS, V. R. S.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (org) **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS, Caxias do Sul, 2002, 433p.

BALDANI, V. L. D. **Efeito da Inoculação de Herbaspirillum spp., no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 1996. 238 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 485–491, 2000.

BALDANI V. L. D.; DOBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 433–439, 1980.

BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J. I.; KIRCHHOF, G.; DOBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.69, p.116-166, 1997.

BARBOSA FILHO, M. P. Nutrição e adubação do arroz (sequeiro e irrigado).Piracicaba: **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato**, 1987. 129 p. (Boletim Técnico, 9)

BARBOSA FILHO, M. P. Adubação do arroz de sequeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, n.14, v.161, p.32-38, 1989.

BARRAQUIO, W.L., LADHA, J.K., REVILLA, L. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, v. 194, p.15-24, 1997.

BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo**. 2006. 83 p. Dissertação (Mestrado-Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal Rural do Rio Grande do Sul, 2006.

BODDEY, R. M.; BODDEY, L. H.; URQUIAGA, S. **A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio**. Itaguaí: Editora Universidade Rural, 1990. 37 p. (EMBRAPA-CNPBS. Documentos, 6).

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C. D.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. D., BALDANI, V. L. D., DOBEREINER, J.. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v.174, p.195–209, 1995.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira Café** - Safra 2012. Segunda estimativa, maio. Brasília - DF. 2012.

BRASIL, M.S., BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. V.29, p. 179-190, 2005

CAMPOS, D. B.; RESENDE, A. S.; ALVEZ, B. J.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura de arroz sob inundação. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 41-46, 2003.

CANTARELLA, H.; DUARTE, A.P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G. V. **Tecnologias de Produção do milho**. Viçosa, MG: UFV, 2004. p.139-182.

CANUTO, E.L.; SALLES, J.F.; OLIVEIRA, A.L.M.; PERIN, L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Respostas de plantas micropropagadas de cana - de açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, 37 (2): 67 - 72, 2003.

CARDOZO, I. C. M. **Ocorrência e diversidade de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* na cultura do arroz irrigado em Santa Catarina**. 2008. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

CARVALHO, E. A. **Avaliação agrônômica da disponibilização de nitrogênio à cultura do feijão sob sistema de semeadura direta**. 2002. 80 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba.

CAVALLET, L.E.; PESSOA, A.C. DOS S.; HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R. & OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum spp.* **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.1, p.129-132, 2000.

CONCEIÇÃO, P. M.; VIEIRA, H. D.; Canellas, L. P.; OLIVARES, F. L.; CONCEIÇÃO, P. S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias

diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, 2009.

COSER, T.R.; RAMOS, M.L.G.; AMABILE, R.F.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. Nitrogênio da biomassa microbiana em solo de Cerrado com aplicação de fertilizante nitrogenado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.3, p.399-406, 2007.

CRUSCIOL, C.A.C.; SORATTO, R.P.; ARF, O.; MATEUS, G.P. Yield of upland rice cultivars in rain fed and sprinkler irrigated systems in the Cerrado region of Brazil. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v.46, n.9, p.1515-1520, 2006.

CRUSCIOL, C.A.C.; SORATTO, R.P.; ARF, O. Produtividade de grãos e exportação de nutrientes de cultivares de arroz irrigadas por aspersão em consequência da época de semeadura. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.2, p.247-257, 2007.

CUTRIM, V. A.; CORDEIRO, A. C. C.; LOPES, A. M.; PEREIRA, J. A.; FONSECA, J. R.; NAKANO, P. H.; AMORIM NETO, S. BRS Tropical: Cultivar de arroz de ampla adaptação para as várzeas tropicais. **Comunicado Técnico 163**, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goias, GO, 2008.

DIAS, A. F. de S.; SILVA, F. N.; MAIA, S. S. S. Resposta do arroz de sequeiro à adubação com NPK em solos do município de Ji-Paraná/Rondônia. **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil) v.5, n.3, p.120 – 124, 2010.

DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II Influência das diversas partes do vegetal. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, p.251-258, 1959.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa-SPI, Brasília, 1995.60 p.

DÖBEREINER, J., DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: **International Symposium on Nitrogen Fixation**. Pullman Proceedings Washington. Washington State University, vol. 01, p.518-538, 1975.

DÖBEREINER, J., RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 261-272, 1958.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 3, p. 376-382, 2010.

EMBRAPA, 2007. **Informações técnicas sobre o arroz de terras altas: Estados de Mato Grosso e Rondônia : safra 2007/2008. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão**, 2007. 84 p. – (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644; 212).

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

EUCLYDES, R.F. 1983. Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG. **Central de Processamento de Dados**. Viçosa, MG: UFV. 68p. (Manual do usuário).

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C. Low land rice response to nitrogen fertilization. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.32, p.1405-1429, 2001.

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. **Advances in Agronomy**, v.88, p.97-185, 2005.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; CLARK, R. B. **Physiology of crop production**. New York: Food Products Press, 2006. 345 p.

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; JONES, C.A. **Growth and mineral nutrition of field crops**. New York: Marcel Dekker, 1997. 2. ed. 624 p.

FAGERIA, N. K.; SANTOS, A. B. dos; CUTRIM, V. dos. Produtividade de arroz irrigado e eficiência de uso do nitrogênio influenciados pela fertilização nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, Brasília, v. 42, n. 7, p. 1029-1034, jul. 2007.

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

FAGERIA, N.K. & STONE, L.F. Manejo do nitrogênio. Manejo da fertilidade do solo para o arroz irrigado. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p.51-94, 2003.

FERNANDES, M.S. & SOUZA, S.R. Absorção de nutrientes. In: FERNANDES, M.S., ed. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.115-152

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 5.0. In: **45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria**. UFSCar, São Carlos, SP, 2003. p.255-258.

FERREIRA, J.S. **Seleção e avaliação de veículos para inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz inundado**. 2004. 44p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

FERREIRA, J. S. **Inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em Duas Variedades de Arroz Irrigado: Qualidade do Inoculante e Necessidade da Reinoculação**. 2008. 85p. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciências do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 179-185, 2010.

FORNASIERI FILHO, D.; FORNASIERI, J.L. **Manual da cultura do arroz**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 589p.

FRANCO, A.A.; BALIEIRO, F.C. Fixação biológica de nitrogênio: alternativas aos fertilizantes nitrogenados. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S; LOPES, A.S.; GUILERME, L.R.G.; FAQUIM, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Lavras, p. 577-595, 1999.

FREITAS, G. A. Produção e área colhida de arroz no Nordeste. **Informe Rural**

Etene, Banco do Nordeste, ano IV, v. 23, 8 p. 2010.

FREY, B.; SCHUEPP, H. Transfer of symbiotically fixed nitrogen from berbeem (*Trifolium alexandrinum* L.) to maize via vesicular-arbuscular mycorrhizal hyphae. **New Phytologist**, Oxford, v.22, p.447-454, 1992.

FUJIE, T.; HUANG, Y. D.; HIGASHITANI, A.; NISHIMURA, Y.; IYAMA, S.; HIROTA, Y. Y.; DIXON R. A. Effect of inoculation with *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* on dinitrogen fixation by rice-bacteria associations. **Plant and Soil**, v.103, p.221–226, 1987.

GUIMARÃES, S.L. **Seleção de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas para inoculação em três cultivares de arroz inundado**. 2001. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

GUIMARÃES, S. L. **Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral**. 2006. 86p. Tese (Doutorado em Agronomia - Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 25-30, 2003.

GUIMARÃES, S. L.; BONFIM-SILVA, E. M.; POLIZEL, A. C.; CAMPOS, D. T. da S. Produção de capim-marandu inoculado com *Azospirillum* spp. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer -Goiânia, v.7, n.13, p. 816-825, 2011.

GUIMARÃES, S. L.; CAMPOS, D. T. S.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 4, p. 32-39, 2010.

HERNANDES, A.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M.; ARF, O.; SÁ, M. E. Doses, fontes e épocas de aplicação de nitrogênio em cultivares de arroz. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, p.307-312, 2010.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48p.

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201

207. Acessado em: 12 de setembro de 2012

http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_automograf. Acessado em: 12 de agosto de 2012

JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W.L.; REDDY, P.M.; IANNETTA, P.P.M.; OLIVARES, F.L.; LADHA, J.K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth - promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 15 (9): 894- 906, 2002.

KENNDY, G.; BURLIGAME, B. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. **Food Chemistry**, Barking, v.80, n.4, p.589-596, apr. 2003.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C₄-fibre plants. **International Journal of Systematics Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 157-168, 2001.

KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Bio. Biochem.**, v. 29, n. 5/6, p. 853-862, 1997.

KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. 2006. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2006.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; HOLTZ, E. K.; LOVATO, T. Inoculação de bactérias diazotróficas e desenvolvimento de plântulas de arroz irrigado em solo e câmara de crescimento. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.15, n.1, p. 90-102. 2008.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

LADHA, J. K.; BARRAQUIO, W. L.; WATANABE, I. Isolation and identification of nitrogen fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p.301-1308, 1983.

LEE, K-K; WANI, S. P; YONEYAMA, T.; TRIMURTULU, N.; HARIKRISHNAN, R. Associative N₂-fixing in pearl millet and sorghum: levels and response to inoculation. **Soil Science Plant Nutrition**, Tóquio, v. 40, p. 477-484, 1994.

LETHBRIDGE, G.; DAVIDSON, M. S. Microbial biomass as a source of nitrogen for cereals. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 15, no. 3, p. 375-376. 1983.

LIESACK, W.; SCHNELL, S.; REVSBECH, N.P. Microbiology of flooded rice paddies. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p. 625 – 645, 2000.

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

MALAVOLTA, E.; FORNASIERI FILHO, D. Nutrição mineral da cultura do arroz. In: FERREIRA, M. E.; YAMADA, T.; MALAVOLTA, E. (Ed.). **Cultura do arroz de sequeiro: fatores afetando a produtividade**. Piracicaba: **Instituto da Potassa e do Fosfato**, 1983. p.95-140.

MALIK, K. A.; MIRZA, M. S.; HASSAN, U.; MEHNAZ, S.; RASUL, G.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P. The role of plant-associated beneficial bacteria in rice-wheat cropping system. In: KENNEDY, I. R. & CHOUDHURY, A.T. M. A. (Eds.). **Biofertilisers in Action**. Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra, 2002, p. 73–83.

MALIK, K. A. & SCHIEGEL, H. G. Chemolithoautotrophic growth of bacteria able to grow under N₂-fixing conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v.11, p.63-67, 1981.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., nitrogen-fixing bacterium isolated from the rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 620-624, 2007.

MENDONÇA, J. O. O potencial de crescimento da produção de grão no Oeste da Bahia. **Bahia Agrícola**, v.7, n.2, abr. 2006.

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

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**.

Lavras: Editora UFLA, 729 p.2006.

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

MYLONA, P., PAWLOWSKI, K. and BISSELING T. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell**, v. 7, p. 869-885, July 1995.

OMETTO, J. C. Bioclimatologia vegetal. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 1981. 440p.

OLIVEIRA, E. **Estudo da associação entre bactérias diazotróficas e arroz irrigado**.1992. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.Itaguaí, 96 p., 1992.

OLIVEIRA, P. P. A.; OLIVEIRA, W. S.; BARIONI, W. J.; Produção de forragem e qualidade de *Brachiaria brizantha*cv. Marandu com *Azospirillum brasilense* fertilizada com nitrogênio. **Embrapa Pecuária Sudeste**, São Carlos, SP, 2007.

PEDRINHO, E.A.N.; GALDIANO JÚNIOR, R.F.; CAMPANHARO, J.C.; ALVES, L.M.C.; LEMOS, E.G. M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010.

PEREIRA, J. A. R. & BALDANI, J. I. Selection of *Azospirillum* spp.. and *Herbaspirillum seropedicae* strains to inoculate rice and maize plants. In: **International symposium on sustainable agriculture for the tropics: the role biological nitrogen fixation**. Angra dos reis, RJ, Brazil, 1995. p. 220-221.

RAIJ, B. VAN. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba: **Ceres / Potafos**, 343p., 1991.

RAMOS, A. S.; SANTOS, T. M. C.; SANTANA, T. M.; GUEDES, E. L. F; MONTALDO, Y. C. Ação do *Azospirillum lipoferum* no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Verde**, Mossoró, v.5, n.4, p.113 - 117 out/dez de 2010.

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

REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T.: Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus* sensu lato and description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictus* gen. nov., sp. nov., *Azospira oryzae* gen. nov., sp. nov. and *Azonexus fungiphilus* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.50, p.649–659, 2000.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n.3, p. 227-247. 2000.

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

REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S. Fixação biológica de nitrogênio - estado de arte. *In*: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável. **Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, 2005. p. 151- 180.

RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ, V.H.; Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – **5ª Aproximação. Viçosa, MG**, 1999.

RIGGS, P. J.; CHELIUS, M. K.; INIGUEZ, A. L.; KAEPLER, S. M.; TRIPLETT, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n.9, p. 829-836, 2001.

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

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* sp. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**. Campinas, v. 12, nº 1-2, p. 16, 1986.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Genetic

diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus* azotofixans strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2770 – 2779, 1998.

SABINO, D. C. C. **Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas**. 2003. 75p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

SABINO, D. C. C. **Interação planta-bactéria diazotrófica na cultura do arroz**. 2007. 71 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciências do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, MG, v.32:1099-1106, 2008.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.6, p.833-842, jun. 2007.

SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; COLAÇO, W. Fixação simbiótica do N₂ em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microorganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Agrolivros, cap.1, p. 17-43, 2008.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v. 172, n. 2, p. 261 – 269, 1995.

SCIVITTARO, V.B.; MACHADO, M.O. Adubação e calagem para a cultura do arroz irrigado. In: GOMES, A.S.; MAGALHÃES JR, A.M. (eds). **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2004. Cap.9, p.259-303.

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

SOARES, A. A.; CORNÉLIO, V. M. de O.; SOARES, P. C.; SANTOS, P. G.; SOUSA, M. A. 'BRS MG Curinga': cultivares de arroz para o plantio em terras altas e várzea. **Revista Ceres**, v. LII, nº 304, p. 867-974.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms**. London: Chapman and Hall, 2 ed., 256p, 1990.

STORCK, C.R. **Variação na composição química em grãos de arroz submetidos a diferentes beneficiamentos**. 2004. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria.

TOU, C. & ZHOU, F. Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice. **Canadian Journal of Microbiology**, v.35, p.403–408, 1989.

USDA. United States Department of Agriculture. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=681&hidReportRetrievalTemplateID=7>. Acessado em 15 de julho de 2012.

VAHL, L.C. Fertilidade de solos de várzea. In: GOMES, A. da S.; PAULETTO, E.A. (Ed.). Manejo de solo e da água em áreas de várzeas. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, 1999. p.119-162.

VAN DOMMELEN, A., KEIJERS, V., VANDERLEYDEN, J., DE ZAMAROCZY, M. (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **Journal Bacteriology**. v.180, n. 10, p. 2652-2659, 1998.

VIDEIRA, S.S. **Taxonomia polifásica de bactérias diazotróficas do gênero *Sphingomonas* spp. e efeito da inoculação em plantas de arroz**. 2008. 140 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

WADA, G.S., SHOJI, S., MAE, T. Relation between nitrogen absorption and growth and yield of rice plants. **JARQ.**, v 20, p. 135-144, 1986.

XIE, C. H. & YOKOTA, A. *Pleomorphomonas oryzaegen. nov., sp. nov.*, a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.55, p. 1233 - 1237, 2005a.

XIE, C. H. & YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1435-1438, 2005b.

XIE, C. H. & YOKOTA, A. *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 889-893, 2006.

ZHANG, G. X.; PENG, G. X.; WANG, E. T.; YAN, H.; YU AN, Q. H.; ZHANG, W.; LOU, X.; WU, H.; TAN, Z. Y. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. **Archives of Microbiology**, v.188, n°5, 2007.

APÊNDICES

Apêndice A - Análise de Variância da altura de plantas, número de perfilhos, matéria fresca e acúmulo de matéria seca na cultivar BRS Tropical.

Fonte de Variação	Altura de Plantas (cm)	Número de Perfilhos	Matéria Fresca (g)	Matéria Seca (g)
	P>F			
Inoculação	0,1273	0,0000	0,0000	0,0000
Nitrogênio	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
I x N	0,2982	0,0025	0,0000	0,0000
C.V (%)	5,86	4,43	4,28	7,23

Apêndice B - Análise de Variância da altura de plantas, número de perfilhos, matéria fresca e seca de plantas na cultivar MG Curinga.

Fonte de Variação	Altura de Plantas (cm)	Número de Perfilhos	Matéria Fresca (g)	Matéria Seca (g)
	P>F			
Inoculação	0,0000	0,0000	0,1668	0,2922
Nitrogênio	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
I x N	0,0000	0,2037	0,0535	0,1753
C.V (%)	3,21	6,89	26,31	35,8400

Apêndice C - Análise de Variância de altura de plantas aos 60 DAE, número de perfilhos aos 60 DAE, altura final de plantas, acúmulo de massa fresca e seca de plantas e acúmulo de massa fresca e seca de grãos.

Fonte de Variação	Altura de Plantas aos 60 DAE (cm)	Número de Perfilhos aos 60 DAE	Altura final de Plantas	Massa Fresca de Plantas	Massa Fresca de Grãos	Massa Seca de Plantas	Massa Seca de Grãos
Inoculação	0,0000	0,0090	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Nitrogênio	0,0026	0,0345	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
I x N	0,0000	0,0055	0,0000	0,0000	0,0086	0,0000	0,0000
CV%	2,07	8,16	1,98	3,83	6,12	6,50	7,88

ANEXOS

Anexo A - Meios de Cultivo

- Meio JMV (BALDANI V. L. D., 1996. Tese (Doutorado) –

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro)

Manitol		5 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10 %	6ml
KH ₂ PO ₄	sol. 10 %	18ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10 %	2ml
NaCl	sol. 10 %	1ml
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 10 %	2ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	2ml
FeEDTA	Sol. 1,64%	4ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2ml
Vitamina para meio de cultura		1ml
Extrato de levedura		100mg

Ajustar o pH para 5,0 – 5,4.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 1,6 g l⁻¹ de agar para semi-sólido e 25 g l⁻¹ para sólido.

- Meio DYGS (RODRIGUEZ NETO, Summa Phytopathologica,

Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.)

Glicose	2g
Ácido málico	2g
Peptona bacteriológica	1,5g
Extrato de levedura	2g
KH ₂ PO ₄	0, g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
Ácido glutâmico	1,5g

Ajustar o pH com solução de KOH a 10%:

pH 6,0 para Herbaspirillum.

pH 6,0 para Gluconacetobacter(menos ácido málico).

pH 6,8 para Azospirillum.

Completar para 1000 ml com H₂O destilada.

- Meio JNFb (DÖBEREINER e outros, Embrapa-SPI, Brasília, 1995)

Ácido málico		5 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10 %	6ml
KH ₂ PO ₄	sol. 10 %	18ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10 %	2ml
NaCl	sol. 10 %	1ml
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 10 %	2ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de	2ml
	KOH	
FeEDTA	Sol. 1,64%	4ml
KOH		4,5
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2ml
Vitamina para meio de cultura		1ml
Extrato de levedura		20mg

Ajustar o pH para 5,8 com solução de KOH a 1%.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 1,7 g l⁻¹ de agar para semi-sólido e 17 g l⁻¹ para sólido.

- Meio NFb (BALDANI & DÖBEREINER, Soil Biology & Biochemistry. Oxford, v. 12,n. 4, p. 433-439, 1980)

Ácido málico		5 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10 %	5ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10 %	2ml
NaCl	sol. 10 %	1ml

CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 10 %	2ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	2ml
FeEDTA	Sol. 1,64%	4ml
KOH		4,5
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2ml
Vitamina para meio de cultura		1ml
Extrato de levedura		50mg

Ajustar o pH para 6,5 com solução de KOH a 1%.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 1,3 g l⁻¹ de ágar para semi-sólido e 15 g l⁻¹ para sólido .

- Meio Batata (BALDANI & DÖBEREINER, Soil Biology & Biochemistry. Oxford, v.12, n. 4, p. 433-439, 1980).

Batata cozida	200g
Ácido málico	2,5g
Açúcar	2,5g
Sol. de micronutrientes para meio de cultura	2ml
Vitamina para meio de cultura	1ml

Pesar os 200 g de batata e cozinhar em água destilada durante 30 minutos.

Paralelamente, adicionar o ácido málico em 50 ml de água destilada com 2 gotas de azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2 N de KOH. Adicionar o açúcar cristal, a solução de micronutrientes e a vitamina, ajustar o pH com KOH ate atingir pH 6,8 – 7,0.

Filtrar a batata em algodão e juntar a solução preparada anteriormente ao filtrado. Completar o volume para 1000 ml.

Adicionar 1,84 g l⁻¹ de agar para semi-sólido e 15 g l⁻¹ de agar para sólido.

Anexo B- Soluções

- Solução salina para diluição seriada

KH ₂ PO ₄	sol. 10 %	1ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10 %	0,5ml
NaCl	sol. 10 %	0,2ml
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 10 %	0,5ml
FeEDTA	Sol. 1,64%	1ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		0,5ml

Ajustar o pH para 6,5 com solução de H₂SO₄ a 5 %,

Completar com água destilada para 1000 ml.