



ARTIGO ORIGINAL

Salomão Lima Guimarães^{1*}
Vera Lucia Divan Baldani²

¹Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT,
Rod. Rondonópolis-Guiratinga, km 6, 78735-901,
Rondonópolis, MT, Brasil

²Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia –
CNPAB, Embrapa Agrobiologia, km 47,
23890-000, Seropédica, RJ, Brasil

Autor Correspondente:
*E-mail: siguimaraes@ufmt.br

PALAVRAS-CHAVE

Herbaspirillum seropedicae
Burkholderia sp.
adubação nitrogenada
Oryza sativa

KEYWORDS

Herbaspirillum seropedicae
Burkholderia sp.
Nitrogen fertilization
Oryza sativa

Produção de arroz inoculado com bactérias diazotróficas marcadas com resistência induzida ao antibiótico estreptomicina

Rice production inoculated with diazotrophic bacteria marked with induced resistance to the antibiotic streptomycin

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação de *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. em relação aos componentes de produtividade do arroz. Foram conduzidos dois experimentos: o primeiro, em casa de vegetação, e o segundo, sob condições de campo, com duas cultivares de arroz (IR42 e IAC4440). No experimento em casa de vegetação, para a cv. IR42, foram utilizadas as estirpes ZAE94 e ZALIR42 (*Herbaspirillum seropedicae*), e M130 e M171 (*Burkholderia* spp.). Na cultivar IAC4440: ZAE94 e Z3 (*H. seropedicae*), M130 e M209 (*Burkholderia* spp.), com quatro repetições. Como controle, foram utilizadas plantas sem inoculação. As bactérias foram marcadas para resistência ao antibiótico estreptomicina, sendo que *Herbaspirillum* spp. apresentou resistência a 100 mg kg⁻¹ de estreptomicina, enquanto *Burkholderia* spp., até 150 mg kg⁻¹. A inoculação das sementes ocorreu por meio da peletização, com a turfa contendo as bactérias multiplicadas em meio Dygs. Foram plantadas quatro sementes por vaso, sendo realizada uma coleta no final do ciclo das cultivares. Já no campo, as coletas foram realizadas de acordo com o estágio fenológico das cultivares, avaliando-se: população de bactérias diazotróficas nas plantas, matéria seca, N-total da parte aérea e produção de grãos. Em casa de vegetação, de maneira geral, a inoculação teve efeito positivo, variando de acordo com cada estirpe e cultivar utilizadas. No campo, os resultados mais promissores apontaram para a cultivar IAC4440, com incrementos de até 54% na produção de grãos, em função da inoculação com bactérias diazotróficas.

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effects of inoculation with strains of *Herbaspirillum* spp. and *Burkholderia* spp. on yield characteristics of rice cultivars. Two experiments were conducted: the first in a greenhouse and the second in a field with two cultivars (IR42 and IAC4440). The diazotrophs used were previously selected. In the greenhouse experiment, the following strains were used for cv. IR42: ZAE94 and ZALIR42 (*Herbaspirillum seropedicae*), M130 and M171 (*Burkholderia* spp.). For cv. IAC 4440, the strains ZAE94 and Z3 (*H. seropedicae*), M130 and M209 (*Burkholderia* spp.) were used with four replications. Non-inoculated plants were used as control. Bacteria were marked for resistance to the antibiotic streptomycin in order to study its permanence in plant and soil. *Herbaspirillum* spp. showed resistance to 100 mg kg⁻¹ of streptomycin and *Burkholderia* spp. presented resistance up to 150 mg kg⁻¹ of the antibiotic. Seed inoculation was performed through pelleting with peats containing bacteria grown in Dygs medium. Four seeds were planted in each pot and collection occurred at the end of the cultivar cycle. In the field experiment, samples were collected according to the developmental stage of each cultivar and the following were evaluated: population of diazotrophic bacteria in plants, dry matter, total N of shoots and grain production. In general, in the greenhouse experiment, inoculation presented positive effects, varying according to each strain and cultivar used. In the field experiment, the most promising results pointed to the IAC4440 cultivar, with increases of up to 54% in grain production due to inoculation of diazotrophic bacteria.

Recebido: 05/04/2012
Aceito: 24/01/2013

1 Introdução

O arroz é um cereal que está presente em grande parte do mundo, principalmente nos países asiáticos e em desenvolvimento, desempenhando um papel estratégico em níveis econômico e social. É considerado como um dos alimentos que apresentam um excelente balanço nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína necessárias ao homem. Por ser uma cultura que tem fácil adaptação a diferentes condições de solo e clima, é considerada a espécie com maior potencial para o aumento da produção e para o combate da fome no mundo (AZAMBUJA et al., 2004).

A ampla adaptabilidade do arroz, aliada à sua habilidade de produzir nas mais diversas regiões e ao continuado esforço da pesquisa em todo o mundo, assegura que o seu grão continue sendo o mais importante produto de consumo pelo homem (TERRES et al., 2004). A produção de arroz depende, sobretudo, da disponibilidade do nitrogênio, pois este é um dos principais nutrientes responsáveis pelo aumento do valor dos componentes de produção e a sua ausência torna-se um fator limitante ao seu cultivo (FAGERIA; STONE, 2003).

Para a obtenção de altas produtividades de grãos, a maioria dos países produtores aplica doses elevadas de fertilizantes nitrogenados nas plantações de arroz. Nos cultivos de arroz irrigado, a China, maior produtor de grãos desse cereal, aplica doses que variam de 100 a 150 kg ha⁻¹ de N para cultivares de ciclo médio (em torno de 135 dias) e dosagens de até 200 kg ha⁻¹ de N para as cultivares de ciclo precoce. Nas Filipinas, as melhores respostas à aplicação de nitrogênio ocorreram quando as dosagens foram de 150 kg ha⁻¹ de N (DOBERMANN et al., 2000). As plantações de arroz irrigado no Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul, recebem em média doses de 90 a 120 kg ha⁻¹ de N (VAHL, 1999). Para o arroz de sequeiro ou terras altas, as pesquisas têm apontado doses variando de até 140 kg ha⁻¹ de N (FAGERIA, 1999). O arroz, juntamente com as culturas de milho e trigo, consome cerca de 60% de todo o nitrogênio utilizado no mundo (LADHA et al., 2005).

O nitrogênio mineral é um insumo caro e a sua utilização de forma errônea pode causar danos ao meio ambiente, como, por exemplo, a contaminação dos mananciais d'água (REEVES et al., 2002). É importante que o manejo do arroz não somente reduza os custos de produção, mas também diminua os níveis de poluição ambiental causados pelo uso desse fertilizante.

A introdução de tecnologias alternativas aos fertilizantes nitrogenados na cultura do arroz inclui a sua inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas. Essas bactérias são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico, tornando-o assimilável pelas plantas, processo este também conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN). Outra característica interessante é que apresentam grande sensibilidade e também resistência à presença de antibióticos, podendo ser utilizada no processo de isolamento e reisolamento, assim como na descrição de espécies de diazotróficos (LIU et al., 2008, HAN et al., 2008; CHEN et al., 2008, PENG et al., 2008).

O sucesso da FBN já foi elucidado principalmente em leguminosas, como a soja, em que o uso de inoculantes contendo estirpes selecionadas de rizóbio vem substituindo

as aplicações de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA et al., 1994). Por isso, uma solução promissora para a diminuição nas aplicações dos fertilizantes nitrogenados nos cultivos de arroz seria a ampliação dos estudos de interação planta-bactéria diazotrófica, visando à seleção de estirpes de bactérias diazotróficas capazes de suprir parcial ou totalmente as necessidades de N pela cultura do arroz (GUIMARÃES et al., 2010).

Objetivou-se avaliar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas marcadas com resistência induzida ao antibiótico estreptomicina, sobre características produtivas de duas cultivares de arroz.

2 Material e Métodos

Em casa de vegetação e campo foram realizados os experimentos de inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas, pré-selecionadas em estudos anteriores por Guimarães, Baldani e Baldani (2003).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e 12 tratamentos em arranjo fatorial 2 × 5 + 2 (2 cultivares, 5 estirpes de bactérias por cultivar e 2 controles, sendo uma para cada cultivar). Para a cv. IR42, foram utilizadas as estirpes ZAE94 e ZALIR42 (*Herbaspirillum seropedicae*), M130 e M171 (*Burkholderia* spp.), e para cv IAC4440, as estirpes ZAE94 e Z3 (*H. seropedicae*), M130 e M209 (*Burkholderia* spp.). O tratamento controle para cada cultivar consistiu apenas no cultivo das plantas, sem a inoculação das bactérias diazotróficas. O quinto tratamento correspondeu à mistura de duas estirpes (ZAE94 e M130), as quais se apresentaram promissoras em estudos realizados por Baldani, Baldani e Döbereiner (2000).

As estirpes foram marcadas para resistência induzida ao antibiótico estreptomicina, visando ao estudo do seu estabelecimento na planta e no solo. O processo de marcação das bactérias consistiu na inoculação de doses crescentes do antibiótico estreptomicina (15 a 200 mg kg⁻¹) nos meios de cultura semissólidos JNFb, semiespecífico para *Herbaspirillum* spp., e JMV, semiespecífico para *Burkholderia* spp. (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). As estirpes de *Herbaspirillum* spp. apresentaram resistência a 100 mg kg⁻¹ de estreptomicina, enquanto que as estirpes de *Burkholderia* spp. apresentaram resistência a até 150 mg kg⁻¹ deste antibiótico.

O experimento foi conduzido em vasos com capacidade para 4 dm³ de solo do tipo Argissolo Vermelho-Amarelo (EMBRAPA, 2006), cuja calagem e adubação foram feitas mediante análise de solo. O inoculante foi composto de turfa com pH corrigido para 7,0 com carbonato de cálcio, esterilizada em autoclave a 120 °C durante 20 min, com um intervalo de 24 h entre cada esterilização. As estirpes foram multiplicadas em Erlenmeyer contendo 50 mL do meio DIGS (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999), com pH 6,0 para *H. seropedicae* e pH 5,0 para *Burkholderia* spp.

O inoculante foi preparado em sacos de polipropileno contendo 35 g de turfa e 15 mL do caldo bacteriano contendo 10⁸ células mL⁻¹ de cada estirpe, incubados a 30 °C (fase de maturação) por 24 h.

Para a inoculação, as sementes das duas cultivares de arroz foram imersas em uma solução goma arábica (3%) e, em seguida, foi adicionado o inoculante; após a homogeneização, as sementes foram colocadas para secar à sombra.

Foram plantadas quatro sementes por vaso, sendo quatro vasos por tratamento. Após as coletas, realizadas no estádio de maturação dos grãos, as seguintes variáveis foram analisadas: população de bactérias diazotróficas presentes nas plantas; matéria seca e N-total da parte aérea, e a produção de grãos.

A contagem da população de bactérias diazotróficas presentes nas plantas de arroz foi feita conforme descrito por Döbereiner, Baldani e Baldani (1995). De cada cultivar, foram pesados 10 g de raiz e parte aérea (folha e colmo), lavados com água destilada, cortados em pequenos pedaços e, em seguida, macerados separadamente num liquidificador com 90 mL de solução salina. A partir dessa suspensão, foi retirado 1 mL para a realização das diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-6} em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina. De cada concentração, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e adicionada em frasco contendo 6 mL dos meios semissólidos JNFb (semisseletivo de *Herbaspirillum* spp.) e JMV (semisseletivo de *Burkholderia* sp.). Os frascos foram incubados a 30 °C por um período de 5-10 dias, para o desenvolvimento de uma película em forma de véu ou espessa na subsuperfície do meio, característica dos micro-organismos diazotróficos microaerofílicos. A determinação do número de bactérias foi feita utilizando-se a Tabela de Mc Crady para três diluições.

As estirpes que apresentaram um maior potencial para a FBN no experimento de vasos em casa de vegetação foram utilizadas em um experimento de campo. O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições e seis tratamentos (2 cultivares de arroz + 2 estirpes de bactérias + 2 controles, uma para cada cultivar). Para a cv IR42, foram utilizadas as estirpes ZALIR42 e M171, e para a cv IAC4440, as estirpes ZAE94 e M209. O tratamento controle foi constituído de um para cada cultivar inoculado com água + adubação nitrogenada de 10 kg ha⁻¹. A inoculação foi feita por meio da peletização das sementes com turfa contendo 10⁸ células semente⁻¹, multiplicadas em meio de cultura Digs (DÖBEREINER; ANDRADE;

BALDANI, 1999), acrescido do antibiótico estreptomicina (mesmas concentrações utilizadas no experimento em casa de vegetação). Cada parcela foi composta de seis linhas de 5 m de comprimento, espaçadas em 0,3 m e densidade de semeadura de 65 sementes por metro. O período de coleta variou de acordo com o ciclo de cada cultivar. As variáveis avaliadas foram: a população de bactérias diazotróficas presentes nas plantas, a matéria seca e o N-total da parte aérea, e a produção de grãos, colhidos em uma área útil de 1 m² no centro de cada parcela.

Foi realizada a análise de variância para todos os parâmetros e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste LSD ($p < 0,05$).

3 Resultados e Discussão

A contagem do número de bactérias nos meios JNFb e JMV, resistentes ao antibiótico estreptomicina, apresentou, na cultivar IR42, uma população inferior àquela obtida no tratamento controle sem a adição do antibiótico. Entretanto, para a cultivar IAC4440, principalmente nos tratamentos contendo as estirpes M130 e M171 de *Burkholderia* spp., a população de diazotróficos da parte aérea foi inferior à população presente no controle contendo o antibiótico, indicando que possivelmente algumas bactérias do solo tenham resistência intrínseca às concentrações do antibiótico utilizado neste estudo (Tabela 1).

Esses resultados estão de acordo com Döbereiner (1992), cujo estudo com estirpes de *Azospirillum* spp. marcadas com 20 mg kg⁻¹ de estreptomicina e inoculadas em milho e trigo, mostrou que houve a recuperação das mesmas nas raízes dessas plantas. Também foram encontradas, em parcelas não inoculadas, estirpes de *Azospirillum* resistentes a 20 mg kg⁻¹ de estreptomicina, o que pode ser explicado, segundo os autores, se dentro da planta houver uma concentração equivalente deste antibiótico.

Em adição, o trabalho realizado por Donato et al. (2005) com plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos, demonstrou que o uso dos antibióticos amoxicilina e cefatoxima sódica, no meio de cultura e nas concentrações empregadas (300, 600 e 1.000 mg kg⁻¹), não foi eficiente

Tabela 1. Número de bactérias diazotróficas (Log.) presentes em raiz e parte aérea de arroz.

| Tratamentos | IR42 | | | IAC4440 | | | |
|--------------------------|-----------------|------|-------------|--------------------------|-----------------|------|-------------|
| | Meio de cultura | Raiz | Parte aérea | Tratamentos | Meio de cultura | Raiz | Parte aérea |
| ZAE94 | JNFb | 5,65 | 4,39 | ZAE94 | JNFb | 4,39 | 4,39 |
| M130 | JMV | 5,65 | 3,39 | M130 | JMV | 4,65 | 3,39 |
| ZAE94 + M130 | JNFb | 5,04 | 5,04 | ZAE94 + M130 | JNFb | 5,04 | 3,39 |
| | JMV | 4,65 | 3,39 | | JMV | 3,17 | 3,39 |
| ZALIR42 | JNFb | 4,65 | 5,04 | Z3 | JNFb | 5,04 | 4,39 |
| M171 | JMV | 4,65 | 4,39 | M209 | JMV | 5,65 | 3,39 |
| Controle sem antibiótico | JNFb | 4,39 | 3,97 | Controle sem antibiótico | JNFb | 7,04 | 3,39 |
| | JMV | 5,04 | 3,39 | | JMV | 5,04 | 3,39 |
| Controle com antibiótico | JNFb | 4,39 | 4,39 | Controle com antibiótico | JNFb | 5,65 | 4,39 |
| | JMV | 3,39 | 4,39 | | JMV | 4,39 | 4,39 |

ZAE94, ZALIR42, Z3: *H. seropedicae*; M130, M171: *Burkholderia* spp.; JNFb: meio de cultura semisseletivo para *Herbaspirillum* spp.; JMV: meio de cultura semisseletivo para *Burkholderia* spp.

para eliminar a bactéria endofítica *Herbaspirillum* spp. – que também forma associação com plantas de arroz – em plantas de cana-de-açúcar, quando se utilizaram tanto propágulos quanto ápices caulinares como fonte de explantes, indicando resistência dessa espécie às aplicações de antibióticos.

Em relação às demais variáveis analisadas, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com respostas positivas à inoculação das bactérias diazotróficas. Os resultados mostraram que, na cultivar IR42, houve um incremento na matéria seca da parte aérea de até 52 e 19%, nos tratamentos inoculados com as estirpes M130 e M171, respectivamente, de *Burkholderia* sp. Foi observado que a estirpe homóloga ZALIR42 apresentou resposta similar, com incrementos de até 20% na fase final do ciclo da cultura. Já a estirpe ZAE94 contribuiu com incrementos de 50% na massa seca das plantas (Tabela 2).

Quanto ao N-total, referente ao acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas, houve diferenças significativas entre os tratamentos. A estirpe ZAE94 foi a que determinou maior acúmulo desse nutriente, com valores 38% acima do controle. No tratamento com ZAE94+M130, verificou-se redução do acúmulo de nitrogênio em relação ao controle (não inoculado), enquanto os demais tratamentos não diferiram desta. Os tratamentos com inoculação apresentaram uma menor produção de grãos em relação ao controle – exceto aqueles inoculados com a estirpe M130 –, porém sem diferir da mesma (Tabela 2).

Ao estudar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas e da adubação nitrogenada em plantas de arroz, Guimarães et al. (2010) observaram que as plantas inoculadas com *Burkholderia* sp. apresentaram acúmulo de N em torno de 12% acima do controle (sem inoculação).

A inoculação também promoveu efeitos positivos na cultivar IAC4440. Aumentos de 16% foram verificados na massa seca da parte aérea no tratamento contendo a estirpe M130, a qual também proporcionou o maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea (33,8%). Com relação à variável produção de grãos, o tratamento com maior incremento de grãos foi o inoculado com a estirpe Z3 de *H. seropedicae*, proporcionando um aumento de 99% quando comparado ao controle. As estirpes ZAE94, M209 e M130 contribuíram com aumentos na produção de grãos de 50, 55 e 70%, respectivamente (Tabela 3).

Em experimentos realizados por Baldani, Baldani e Döbereiner (2000) sob condições de vasos em casa de

vegetação, as estirpes M130, ZAE94 e M209 contribuíram respectivamente com 20, 17 e 11% do nitrogênio derivado da FBN. Esses autores observaram que não houve diferença significativa entre os tratamentos no aumento da produção dos grãos e que a contribuição da FBN por estas bactérias foi inferior a 5%.

Em experimentos de inoculação em trigo, Sala et al. (2005) verificaram que não houve diferenças significativas no acúmulo de massa seca entre os tratamentos testados. Porém, respostas positivas no acúmulo de nitrogênio da parte aérea foram encontradas no genótipo ITD - 19. Outros experimentos de inoculação com estirpes de *Azospirillum* spp. nesta cultura também foram realizados por Rodrigues et al. (2000). Estes autores observaram que não houve efeito da inoculação sobre a produção de grãos. No entanto, o teor de nitrogênio nos grãos aumentou significativamente nos tratamentos com bactérias e sem a adição de nitrogênio. Além disso, cerca de 70% do nitrogênio acumulado tinha sido translocado das partes vegetativas para os grãos.

As estirpes que apresentaram maior potencial para a FBN nos experimentos em casa de vegetação foram utilizadas no experimento de campo, por se tratar de um ambiente que retrata melhor a realidade agrônômica das culturas. As estirpes também foram marcadas com resistência induzida ao antibiótico estreptomicina.

Em casa de vegetação e no campo, as cultivares utilizadas apresentaram comportamento diferenciado quanto à resposta à inoculação, sugerindo que uma determinada estirpe, quando é inoculada em cultivares diferentes, o potencial para fixar nitrogênio pode se manifestar apenas em uma cultivar, tornando, assim, a seleção de estirpes mais específica.

A inoculação, sob condições de campo trouxe benefícios às cultivares estudadas em todas as variáveis analisadas. Para a cultivar IR42, as estirpes ZALIR42 e M171 contribuíram, respectivamente, com 22 e 12,7% na matéria seca da parte aérea no estádio correspondente ao enchimento de grãos, não sendo observadas diferenças significativas nos estádios de florescimento e maturação dos grãos. O mesmo comportamento foi observado nas demais variáveis, com valores de 72 e 47% no teor de nitrogênio, e de 16,8 e 68% no nitrogênio total, oriundos da inoculação com estirpes ZALIR42 e M171, respectivamente (Tabela 4).

Em relação às variáveis produção e nitrogênio total dos grãos, houve diferença significativa somente para o nitrogênio

Tabela 2. Massa seca, N-total e produção de grãos de arroz em casa de vegetação, da cultivar IR42, inoculada com bactérias diazotróficas.

| Tratamentos | Massa seca (g/vaso) | N-total (mg/vaso) | Produção de grãos (g/vaso) |
|-------------|---------------------|-------------------|----------------------------|
| ZAE94 | 8,67 ab | 32,70 a | 1,55 b |
| M130 | 9,32 a | 19,10 bc | 2,75 a |
| ZAE94+M130 | 7,65 b | 16,30 c | 1,05 bc |
| ZALIR42 | 7,40 bc | 22,27 bc | 0,55 c |
| M171 | 7,30 bc | 20,63 bc | 1,22 b |
| Controle | 6,12 c | 23,68 b | 3,20 a |

Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD no nível de significância 0,05.

Tabela 3. Massa seca, N-total e produção de grãos de arroz em casa de vegetação, cultivar IAC4440, inoculada com bactérias diazotróficas.

| Tratamentos | Massa seca (g/vaso) | N-total (mg/vaso) | Produção de grãos (g/vaso) |
|-------------|---------------------|-------------------|----------------------------|
| ZAE94 | 6,65 bc | 44,33 bc | 3,35 ab |
| M130 | 8,92 a | 75,65 a | 2,37 b |
| ZAE94+M130 | 5,85 c | 53,03 bc | 3,80 ab |
| Z3 | 6,72 bc | 43,30 c | 4,42 a |
| M209 | 7,07 bc | 40,27 c | 3,45 ab |
| Controle | 7,65 ab | 56, 53 b | 2,22 b |

Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD no nível de significância 0,05.

Tabela 4. Massa seca, teor e acúmulo de nitrogênio, e produção de grãos em plantas de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas endofíticas, cultivar IR42.

| Tratamentos | Massa seca da parte aérea (g m ⁻¹) | | |
|-------------|--|---|----------------------|
| | Florescimento | Enchimento dos grãos | Maturação dos grãos |
| ZALIR42 | 68,00 ^{ns} | 125,00 a | 138,60 ^{ns} |
| M171 | 74,60 | 115,00 ab | 148,20 |
| Controle | 60,03 | 102,00 b | 153,20 |
| | Teor de N da parte aérea (g kg ⁻¹) | | |
| ZALIR42 | 12,6 ^{ns} | 16,0 b | 7,9 ^{ns} |
| M171 | 12,8 | 13,7 a | 7,3 |
| Controle | 12,0 | 9,3 c | 7,7 |
| | Acúmulo de N-total da parte aérea (g m ⁻¹) | | |
| ZALIR42 | 0,76 ^{ns} | 1,18 b | 1,19 ^{ns} |
| M171 | 0,76 | 1,70 a | 1,00 |
| Controle | 0,65 | 1,01 b | 1,05 |
| | Produção de grãos (g m ⁻¹) | Acúmulo de N-total dos grãos (g m ⁻¹) | |
| ZALIR42 | 82,25 ^{ns} | 1,01 a | |
| M171 | 78,05 | 0,95 a | |
| Controle | 79,53 | 0,78 b | |

Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD no nível de significância 0,05. ns: Tratamentos não diferiram significativamente.

total. Contudo, a estirpe ZALIR42 contribuiu com um aumento de 3,4% na produção de grãos e com 29% no N-total, mas não diferiu da estirpe M171 para esta variável, que apresentou um acúmulo de 21% em relação ao controle (Tabela 4).

Ao se considerar que a produtividade média nacional está em torno de 2,6 t ha⁻¹, este aumento de apenas 3,4% na produção de grãos, corresponde a aproximadamente 88 kg de grãos a mais por hectare. Faz-se necessário, dessa forma, produzir um inoculante eficiente para o mercado brasileiro, cuja tecnologia seja de baixo custo e acessível, principalmente, ao pequeno produtor.

Estudo realizado com a inoculação de bactérias diazotróficas na cultivar de arroz IR42 demonstrou que houve aumento na produção de grãos quando as plantas foram inoculadas com *Burkholderia* sp. e *Herbaspirillum seropedicae* (GUIMARÃES et al., 2007; FERREIRA; GUIMARÃES; BALDANI, 2011).

De acordo com Campos et al. (2003), dentre as cultivares mais eficientes quanto ao índice de colheita de nitrogênio, a IR42 contribuiu com aumentos em torno de 60%. Estes autores ressaltaram que quanto maior o índice de colheita de N, maior é a proporção de nitrogênio acumulado nos grãos em relação à parte aérea.

A cultivar IAC4440, apesar de ser considerada com baixo potencial de associação com bactérias diazotróficas, apresentou respostas positivas à inoculação sob condições de campo. Foram observadas diferenças significativas em todas as variáveis analisadas, exceto para a matéria seca da parte aérea nos estádios de florescimento e maturação dos grãos. Para esta variável, foram observados aumentos de até 90% na matéria seca da parte aérea no estágio de enchimento dos grãos, quando inoculados com estirpe M209. Esta estirpe, juntamente com a ZAE94, contribuiu com aumentos de até

60% no nitrogênio acumulado e 23% no teor de nitrogênio da parte aérea (Tabela 5).

Para as variáveis produção de grãos e nitrogênio total dos grãos, efeitos bastante expressivos foram observados. Aumentos de 54 e 47% na produção de grãos foram obtidos nos tratamentos inoculados com as estirpes M29 e ZAE94, respectivamente, em relação ao controle. Estes percentuais de aumento equivalem, respectivamente, a 1404 e 1222 kg ha⁻¹ a mais de grãos, quando comparados com a produtividade média nacional de 2600 kg ha⁻¹. Além disso, o acúmulo de nitrogênio nos grãos foi de 68% com a estirpe ZAE 94 e de 90% com a estirpe M209, indicando que as plantas inoculadas com estas bactérias apresentaram grãos de melhor qualidade (Tabela 5).

Aumentos na produção de grãos e no conteúdo de nitrogênio dos grãos na cultivar IAC4440 também foram observados em experimentos realizados por Ferreira, Baldani e Baldani (2010), em que contribuições variaram de 13 a 19% em plantas que foram inoculadas com a estirpe ZAE94 de *H. seropedicae*.

Resultados similares foram obtidos em experimentos de inoculação com *Azospirillum* spp. na cultura do milho, apresentando incrementos de 17% na produção de grãos (CAVALLET et al., 2000). Estes autores observaram que a inoculação contribuiu para o aumento na produção dos grãos, independentemente do manejo da adubação nitrogenada. A adubação com N, isoladamente, não aumentou a produtividade dos grãos de milho, sugerindo que os efeitos da bactéria podem ser outros além da fixação biológica de nitrogênio, como, por exemplo, efeitos hormonais que promovem o aumento do volume radicular.

Por meio da contagem do número de bactérias, pôde-se observar a presença desses microrganismos em todas as coletas realizadas e em todos os tratamentos. A presença do antibiótico nos meios semisseletivos JNFb e JMV não provocou diminuição na população das bactérias diazotróficas;

Tabela 5. Massa seca, teor e acúmulo de nitrogênio, e produção de grãos em plantas de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas endofíticas, cultivar IAC4440.

| Tratamentos | Massa seca da parte aérea (g m ⁻¹) | | |
|---|--|---|----------------------|
| | Florescimento | Enchimento dos grãos | Maturação dos grãos |
| ZAE94 | 62,22 ^{ns} | 123,80 a | 168,40 ^{ns} |
| M209 | 60,75 | 135,60 a | 160,20 |
| Controle | 63,58 | 71,30 b | 147,40 |
| Teor de N da parte aérea (g kg ⁻¹) | | | |
| ZAE94 | 0,99 b | 0,87 c | 0,82 a |
| M209 | 1,66 a | 1,23 a | 0,86 a |
| Controle | 1,15 b | 0,99 b | 0,74 b |
| Acúmulo de N-total parte aérea (g m ⁻¹) | | | |
| ZAE94 | 0,67 c | 1,04 a | 1,31 a |
| M209 | 1,31 a | 1,17 a | 1,43 a |
| Controle | 0,87 b | 0,69 b | 1,06 b |
| Produção de grãos (g m ⁻¹) | | Acúmulo de N-total nos grãos (g m ⁻¹) | |
| ZAE94 | 90,90 a | 1,06 a | |
| M209 | 95,50 a | 1,20 a | |
| Controle | 61,80 b | 0,63 b | |

Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD no nível de significância 0,05. ns: Tratamentos não diferiram significativamente.

Tabela 6. Número de bactérias diazotróficas (Log.) presentes em raiz e parte aérea de arroz.

| Tratamentos | IR42 | | | IAC4440 | | | |
|--------------------------|-----------------|------|-------------|--------------------------|-----------------|------|-------------|
| | Meio de cultura | Raiz | Parte aérea | Tratamentos | Meio de cultura | Raiz | Parte aérea |
| ZALIR42 | JNFb | 4,39 | 4,39 | ZAE94 | JNFb | 4,39 | 3,39 |
| M171 | JMV | 4,65 | 4,39 | M209 | JMV | 4,39 | 4,39 |
| Controle sem antibiótico | JNFb | 4,39 | 4,97 | Controle sem antibiótico | JNFb | 3,39 | 3,39 |
| | JMV | 4,39 | 3,39 | | JMV | 4,39 | 3,97 |
| Controle com antibiótico | JNFb | 5,14 | 4,65 | Controle com antibiótico | JNFb | 5,14 | 5,14 |
| | JMV | 5,14 | 4,39 | | JMV | 5,14 | 5,14 |

ZALIR42, ZAE94: *H. seropedicae*; M171, M209: *Burkholderia* spp. JNFb: meio de cultura semisseletivo para *Herbaspirillum* spp.; JMV: meio de cultura semisseletivo para *Burkholderia* spp.

ao contrário, foi verificado um número maior de diazotróficos nas raízes da cultivar IR42 nos meios de cultivo utilizados. Somente na parte aérea dessa cultivar, não houve variação na população dos micro-organismos em todos os tratamentos analisados. Entretanto, na cultivar IAC4440, tanto as raízes quanto a parte aérea apresentaram uma população maior do que a do controle, que continha doses do antibiótico estreptomicina; foi também observada uma queda do número de células nos demais tratamentos, principalmente na parte aérea (Tabela 6).

Foram isoladas estirpes de *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. resistentes às concentrações utilizadas do antibiótico estreptomicina, que foram, respectivamente, de 100 e 150 mg kg⁻¹. Os isolados foram oriundos não só dos tratamentos inoculados, como também do controle sem o antibiótico. Vale ressaltar que resultados semelhantes foram obtidos nos experimentos de vasos em casa de vegetação, o que pode ser explicado, segundo Döbereiner (1992), se dentro da planta ou na superfície das raízes houver uma concentração equivalente deste antibiótico.

A resistência dos micro-organismos a determinado antibiótico pode ser utilizada como um indicador de sobrevivência e competitividade, uma vez que muitos micro-organismos da rizosfera apresentam a capacidade de produzir estas substâncias (LEVY, 2006). Assim, Donato et al. (2005) confirmaram, em experimento com cana-de-açúcar, que bactérias diazotróficas, como o *Herbaspirillum* spp., podem ser resistentes a antibióticos, como amoxicilina a 1.000 mg kg⁻¹ e cefatoxina sódica a 300 mg kg⁻¹.

Em experimentos de inoculação com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz, Guimarães et al. (2010) observaram, no estágio de florescimento, maiores acúmulos de massa seca nos tratamentos adubados com nitrogênio mineral nas doses de 50 e 100 kg ha⁻¹. Ainda no estágio de florescimento, os tratamentos inoculados com *H. seropedicae* e que receberam 100 kg ha⁻¹ N apresentaram maiores acúmulos de massa seca.

Estes 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. Os resultados também se confirmaram para o acúmulo de nitrogênio, pois as plantas adubadas com 50 kg ha⁻¹ de N, juntamente com a inoculação de *Burkholderia* sp., obtiveram acúmulo de nitrogênio igual aos tratamentos com doses de 100 kg ha⁻¹ de N. Tendência similar foi observada com *H. seropedicae*, uma vez que os maiores valores de nitrogênio foram encontrados nos tratamentos contendo esta estirpe.

4 Conclusões

Os efeitos da inoculação das estirpes de *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. sobre todas as variáveis agrônomicas analisadas variaram de acordo com a cultivar utilizada, mostrando especificidade entre estirpe e cultivar.

A cultivar IAC4440 apresentou respostas mais expressivas à inoculação em casa de vegetação e campo, principalmente na produção de grãos, destacando-se, como mais promissoras, as estirpes M209 (*Burkholderia* sp.) e ZAE94 (*H. seropedicae*).

A cultivar IR42 apresentou baixa resposta à inoculação na produção de grãos sob condições de campo.

Referências

AZAMBUJA, I. H. V.; VERNETTI JUNIOR, F. J.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M. Aspectos socioeconômicos da produção do arroz. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. (Eds.). *Arroz irrigado no Sul do Brasil*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 23-44.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, 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. <http://dx.doi.org/10.1007/s003740050027>

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

CAVALLET, L. E.; PESSOA, A. C. 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. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-4366200000100024>

CHEN, W.-M.; FARIA, S. M.; CHOU, J.-H.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J. P. W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp. nov.; isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, n. 9, p. 2174-2179, Sept 2008. <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.65816-0>

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. *Microbiologia do solo*. Campinas: SBCS, 1992. p. 173-180.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas*. Brasília: Embrapa-SPI; Itaguaí: Embrapa-CNPAB, 1995. p. 60.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. *Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia; 1999. 38 p.

DOBERMANN, C. M.; DAWE, D.; ROETTER, R. P.; CASSMAN, K. G. Reserval of rice yield decline in a long-term continuous cropping experiment. *Agronomy Journal*, v. 92, n. 4, p. 633-643, 2000.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; TAKAKI, G. M. C.; MARIANO, R. L. R.; MACIEL, G. A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, n. 1, p. 134-141, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542005000100017>

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

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

FAGERIA, N. K. Adubação e calagem. In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. (Eds.). *A cultura do arroz no Brasil*. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e feijão, 1999. 633 p.

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*, v. 32, n. 1, p. 179-185, 2010. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagr.v32i1.732>

FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D. Produção de grãos de arroz em função da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. *Enciclopédia Biosfera*, v. 7, n. 13, p. 826-833, 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.

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.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 3, p. 393-398, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000300013>

HAN, T. X.; HAN, L. L.; WU, L. J.; CHEN, W. F.; SUI, X. H.; GU, J. G.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov.; isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, part. 11, p. 2610-2618, 2008. <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.2008/000125-0>

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds.). *Micro-organismos de importância agrícola*. Brasília: Embrapa, 1994. p. 9-89.

LADHA, J. K.; PATHAK, H.; KRUPNIK, T. J.; SIX, J.; VAN KESSEL, C. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: Retrospects and prospects. *Advances in Agronomy*, v. 87, p. 85-156, 2005. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)87003-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113(05)87003-8)

LEVY, S. B. Mechanisms for resistance in soil. *Science*, v. 312, n. 5773, p. 529, 2006. <http://dx.doi.org/10.1126/science.312.5773.529a>

LIU, R.; LIU, H.; FENG, H.; WANG, X.; ZHANG, C.-X.; ZHANG, K.-Y.; LAI, R. *Pseudomonas duriflava* sp. nov.; isolated from a desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 1404-1408, 2008. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.65716-0>

PENG, G.; YUAN, Q.; LI, H.; ZHANG, W.; TAN, Z. *Rhizobium oryzae* sp. nov.; isolated from the wild rice *Oryza alta*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 2158-2163, 2008. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.65632-0>

REEVES, T. G.; WADDINGTON, S. R.; ORTIZ-MONASTERIO, I.; BÄNZIGER, M.; CASSADAY, K. Removing nutritional limits to maize and wheat production: A developing country perspective. In: KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. (Eds.). *Biofertilizers in action*. Camberra: Rural industries. Research and development Corporation, 2002. p. 11-36.

RODRIGUES, O.; DIDONET, A. D.; GOUVEIA, J. A.; SOARES, R. C. Nitrogen translocation en wheat inoculated with *Azospirillum* and fertilized with nitrogen. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 7, p. 1473-1481, 2000. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2000000700023>

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 29, n. 3 p. 345-352, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832005000300004>

TERRES, A. L. S.; FAGUNDES, P. R. R.; MACHADO, M. O.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M.; NUNE, D. D. M. Melhoramento genético e cultivares de arroz irrigado. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M. (Eds.). *Arroz irrigado no sul do Brasil*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 161-226.

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