

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO EM ADESMIAS E MACIEIRA UTILIZANDO  
RIZÓBIOS DE *Adesmia latifolia***

**Aleksander Westphal Muniz**  
Engenheiro Agrônomo (UFSC)  
Mestre em Engenharia de Produção e Sistemas (UFSC)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor na Área de Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

**Porto Alegre, RS, Brasil, Janeiro, 2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO EM ADESMIAS E MACIEIRA UTILIZANDO  
RIZÓBIOS DE *Adesmia latifolia***

**Aleksander Westphal Muniz**  
Engenheiro Agrônomo (UFSC)

**Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá**  
Orientador

**Porto Alegre, RS, Brasil, Janeiro, 2011**

## Catlogação na publicação

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por tornar essa caminhada possível em um período de tempo tão curto.

Agradeço aos professores do PPGMAA e da UDESC pela amizade e ensinamentos.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente por me aceitar como aluno.

Agradeço ao meu orientador pelo incentivo, críticas e sugestões, que possibilitaram meu amadurecimento como pesquisador.

Aos amigos do doutorado Marcus, Fritz, Fernanda Viana, Marília, Luciana, Sandra, Michele, Tiane, Raquel, Manuela, Leandro e Priscila pela amizade e companheirismo durante todo o curso.

A Embrapa pela bolsa durante o doutorado.

A Epagri pela infra-estrutura dispensada.

Aos amigos Edson, Wordell, Zaffari, Murilo, Aparecida, Fernanda Grimaldi, Rech, Geovani e Gilberto pela ajuda nos trabalhos no laboratório e viabilização de recursos materiais no desenvolvimento desta pesquisa.

A minha esposa Cynthia pela paciência e apoio durante esse período.

A todos que de uma forma ou de outra tornaram esse trabalho possível.

# PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO EM ADESMIAS E MACIEIRA UTILIZANDO RIZÓBIOS DE *Adesmia latifolia*

Autor: Aleksander Westphal Muniz

Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá

Co-orientador: João Américo Wordell Filho

## <sup>1</sup>RESUMO

A leguminosa *Adesmia latifolia* encontrada nos campos do Rio Grande do Sul e Santa Catarina apresenta alta qualidade forrageira e pode ser utilizada em programas de melhoramento de campos nativos. Essa espécie apresenta simbiose com rizóbios do solo. Tais rizóbios podem ser utilizados na promoção do crescimento de *A. latifolia* e outras espécies vegetais. Assim, os objetivos deste trabalho foram estudar e selecionar rizóbios nativos, isolados de *A. latifolia*, para a promoção de crescimento de plantas de espécies de *Adesmia* e do porta-enxerto micropropagado de macieira cv Marubakaido (*Malus prunifolia* Bork). Para atingir estes objetivos foram realizados três estudos. O primeiro estudo avaliou a promoção de crescimento em espécies de *Adesmia* por rizóbios produtores de ácido indolacético. O segundo estudo caracterizou e avaliou a eficiência simbiótica dos rizóbios de *A. latifolia*. O terceiro avaliou a utilização dos rizóbios de *A. latifolia* para o enraizamento *in vitro* e a aclimatização do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido. Os resultados do primeiro estudo mostraram que os isolados apresentaram variação na produção de AIA. A promoção do crescimento vegetal variou nas diferentes espécies de *Adesmia*. No segundo estudo os resultados revelaram que os isolados testados apresentaram características fenotípicas dos gêneros *Mesorhizobium* e *Rhizobium*. Esses resultados demonstraram que os isolados EEL47310, EEL45910, EEL37910 e EEL45810 induziram uma maior produção de massa seca da parte aérea de *A. latifolia*. Tais isolados foram caracterizados geneticamente como *Mesorhizobium* sp. No terceiro estudo observou-se que o isolado EEL16010B induziu o maior crescimento no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido. Os rizóbios produtores de AIA isolados de *A. latifolia* podem promover o crescimento em plântulas outras espécies do mesmo gênero. Foi testado a viabilidade do uso da utilização de caldo contendo AIA produzido pelo rizóbio EEL16010B em substituição ao AIA sintético no enraizamento *in vitro* do porta enxerto de macieira cv. Marubakaido.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (85 p) Janeiro, 2011. Trabalho realizado com o apoio financeiro da Epagri e da EMBRAPA.

## **GROWTH PROMOTING IN ADESMIAS AND APPLE USING RHIZOBIA OF *Adesmia latifolia***

Author: Aleksander Westphal Muniz

Advisor: Enilson Luiz Saccol de Sá

Co-advisor: João Américo Wordell Filho

### **<sup>2</sup>ABSTRACT**

The legume *A. latifolia* found in the fields of Rio Grande do Sul and Santa Catarina has a high nutritional quality and can be used in breeding programs of native grasslands. This species presents a symbiosis with rhizobia soil. These rhizobia may be used in promoting the growth of *A. latifolia* and other species. The objectives of this study were selected and rhizobia isolated from *A. latifolia* promotion for plant growth *Adesmia* species and rootstock cv Marubakaido micropropagated apple (*Malus prunifolia* Bork). To achieve these objectives were conducted three studies. The first study evaluated the promotion of growth by rhizobacteria species *Adesmia* nodules producing IAA. The second study characterized and evaluated the efficiency of symbiotic rhizobia from *A. latifolia*. The third study examined the use of rhizobia of *A. latifolia* for *in vitro* rooting and acclimatization of micropropagated rootstock of apple cv. Marubakaido. The results of the first study showed that the isolates showed variation in the production of IAA. The promotion of growth varied in different species of *Adesmia*. In the second study the results showed that the isolates tested showed phenotypic characteristics of the genera *Mesorhizobium* and *Rhizobium* and that these results showed that the isolates EEL47310, EEL45910, EEL37910, EEL45810 and were more effective in inducing the production of dry matter of aerial part of *A. latifolia*. These isolates were genetically characterized as *Mesorhizobium*. In the third study showed that the strain EEL16010B induced the highest growth *in vitro* rooting of micropropagated rootstock of apple cv. Marubakaido. The producers of IAA rhizobia isolated from *A. latifolia* can promote the growth of seedlings of other species of this genus. It is feasible to use broth containing IAA produced by rhizobia strain EEL16010B to replace synthetic IAA *in vitro* rooting of apple rootstock cv. Marubakaido

---

<sup>2</sup> Doctoral thesis in Agricultural Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (85 p) Janeiro, 2011. Work performed with financial support from Epagri and EMBRAPA.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>X</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
<b>3. ESTUDOS REALIZADOS.....</b>	<b>15</b>
3.1. ESTUDO 1 : PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE ESPÉCIES DE <i>ADESMIA</i> POR RIZÓBIOS PRODUTORES DE ÁCIDO INDOLACÉTICO .....	15
3.2. ESTUDO 2: CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS DE <i>ADESMIA LATIFOLIA</i> .....	30
3.3. ESTUDO 3: ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO DO PORTA-ENXERTO MICROPROPAGADO DE MACIEIRA CV. MARUBAKAIDO UTILIZANDO-SE RIZÓBIOS DE <i>ADESMIA LATIFOLIA</i> .....	52
<b>4. DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>69</b>
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>72</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>
<b>7. RESUMO BIOGRÁFICO.....</b>	<b>85</b>

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1 : **Promoção do crescimento de espécies de *Adesmia* por rizóbios produtores de ácido indolacético**

Tabela 1 – Número de nódulos (NNOD), comprimento da raiz principal (CRP), número de raízes secundárias (NRS), biomassa fresca de raízes (BFR), biomassa fresca da parte aérea (BFPA), número de folhas bifoliadas (NFB) e comprimento de brotos (CB) de <i>Adesmia latifolia</i> .....	28
Tabela 2 – Número de nódulos (NNOD), comprimento da raiz principal (CRP), número de raízes secundárias (NRS), biomassa fresca de raízes (BFR), biomassa fresca da parte aérea (BFPA), número de folhas bifoliadas (NFB) e comprimento de brotos (CB) de <i>Adesmia psoraleoides</i> .....	28
Tabela 3 – Número de nódulos (NNOD), comprimento da raiz principal (CRP), número de raízes secundárias (NRS), biomassa fresca de raízes (BFR), biomassa fresca da parte aérea (BFPA), número de folhas bifoliadas (NFB) e comprimento de brotos (CB) de <i>Adesmia riograndensis</i> .....	29
Tabela 4 – Número de nódulos (NNOD), comprimento da raiz principal (CRP), número de raízes secundárias (NRS), biomassa fresca de raízes (BFR), biomassa fresca da parte aérea (BFPA), número de folhas bifoliadas (NFB) e comprimento de brotos (CB) de <i>Adesmia tristis</i> .....	29

### Artigo 2 – **Caracterização e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios de *Adesmia latifolia***

Tabela 1 – Locais de coleta dos rizóbios isolados de <i>Adesmia latifolia</i> .....	49
Tabela 2 – Produção de massa seca da parte aérea (MPSA), número de nódulos (NNOD), massa seca de nódulos (MNOD), de plantas de <i>Adesmia latifolia</i> inoculadas com isolados de rizóbios.....	50
Tabela 3 – Sequências gênicas obtidas dos isolados mais eficientes na indução da produção de massa seca da parte aérea de <i>A. latifolia</i> .....	51

### Artigo 3 – **Enraizamento e aclimatização do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido utilizando-se rizóbios de *Adesmia latifolia***

Tabela 1– Comprimento de brotos (CB), número de raízes primárias (NPR), número de raízes secundárias (NRS), comprimento radicular (CR), biomassa fresca da parte aérea (BFPA) e de raízes (BFR) do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido no enraizamento <i>in vitro</i> .....	68
---	----



## LISTA DE FIGURAS

### **Artigo 1 : Promoção do crescimento de espécies de *Adesmia* por rizóbios produtores de ácido indolacético**

Figura 1 – Produção de ácido indolacético de bactérias de nódulos de *A. latifolia*..... 27

### **Artigo 2 – Caracterização e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios de *Adesmia latifolia***

Figura 1 – Dendrograma de similaridade das características fenotípicas utilizando o coeficiente de Sokal e Sneath (1963) e o algoritmo UPGMA.. 48

### **Artigo 3 – Enraizamento e aclimatização do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido utilizando-se rizóbios de *Adesmia latifolia***

Figura 1 – Produção de AIA por isolados de bactérias de nódulos de *A. latifolia*..... 67

Figura 2 – Taxa de enraizamento do porta-enxerto de macieira micropropagado cv. Marubakaido utilizando suspensões de bactérias de nódulos de *A. latifolia*..... 67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIA – ácido indolacético

AIB – ácido indolbutírico

°C – graus Celsius

EEL – Estação Experimental da Epagri de Lages

L - litro

mg – miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

µg - micrograma

µl – microlitro

PCR – reação em cadeia da polimerase

rpm – rotações por minuto

UPGMA – *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A leguminosa *Adesmia latifolia*, espécie nativa dos campos do Rio Grande do Sul e Santa Catarina apresenta alta qualidade forrageira e pode ser utilizada em programas de melhoramento de campos nativos explorados com pecuária. Essa espécie apresenta simbiose com rizóbios do solo. Nesse mutualismo as bactérias fornecem o nitrogênio a leguminosa após o processo de fixação biológica. Em contrapartida a planta fornece carbono para o desenvolvimento bacteriano.

Os rizóbios são utilizados há mais de um século para promover o crescimento em diversas culturas agrícolas para alimentação humana e animal como a soja, feijão, trevos e cornichões. Essas leguminosas utilizam o potencial dos rizóbios como biofertilizantes. O uso da inoculação com rizóbios, recomendados para cada planta, tem despertado cada vez mais atenção dos agricultores, pois reduz consideravelmente os custos de produção devido à redução e, até mesmo, a suspensão da aplicação de adubação nitrogenada. Outra grande vantagem da fixação biológica de nitrogênio está relacionada com a questão ambiental. A redução da aplicação de nitrogênio no solo também diminui a poluição dos recursos hídricos, principalmente com nitrato. Além disso, a fabricação de fertilizantes nitrogenados industriais é energeticamente muito dispendiosa, pois depende da queima de combustíveis fósseis, para a obtenção de níveis elevados de pressão e temperatura.

O nitrogênio atmosférico fixado pelas bactérias, após ser translocado pela planta hospedeira, fará parte de aminoácidos, proteínas e outros compostos nitrogenados dos vegetais e, uma vez consumido pelos herbívoros,

seguirá na cadeia trófica. A produção animal é, de forma indireta, beneficiada pela ação dos microorganismos diazotróficos, entre os quais se destacam os rizóbios. Leguminosas forrageiras são importantes fontes de proteínas para os animais, e o nitrogênio destas plantas pode ser totalmente oriundo da fixação biológica, ao invés de aplicações de fertilizantes.

Na última década, em diferentes partes do mundo, surgiram alguns estudos mostrando que os rizóbios podem também se associar com plantas de outras famílias, como as gramíneas e algumas espécies arbóreas. Neste tipo de associação, muitas vezes endofítica, não há formação de nódulos nem ocorre a fixação de nitrogênio, entretanto, outros mecanismos de promoção de crescimento permitem que a planta seja estimulada por estas bactérias. Os rizóbios são capazes de se desenvolver na rizosfera da gramínea, penetrando por fissuras radiculares, colonizando o interior da raiz e até mesmo, ascender para a parte aérea das plantas. No interior dos tecidos vegetais, estas bactérias secretam reguladores de crescimento vegetal, do tipo auxinas, que estimulam o crescimento de raízes, caules e folhas. Em consequência deste aumento de vigor da planta, são verificados aumentos nas taxas de absorção de nutrientes, na fotossíntese e no rendimento de grãos.

Atualmente, os rizóbios também começaram a ser utilizados como fitoestimulantes em culturas como arroz irrigado com e trigo no continente africano. No entanto o potencial dos rizóbios de leguminosas nativas na promoção do crescimento foi pouco explorado. Os mecanismos bacterianos que estimulam o crescimento vegetal, como a produção de hormônios, precisam ser mais bem estudados. Necessita-se saber quais e em que

proporções estas substâncias são produzidas e como atuam no metabolismo vegetal.

No sul do Brasil, os rizóbios de *Adesmia latifolia* ainda não foram estudados suficientemente quanto a sua capacidade de promover o crescimento vegetal como biofertilizantes e fitoestimulantes. Assim, os trabalhos foram conduzidos sob a hipótese de que os rizóbios isolados de *A. latifolia* promovem o crescimento vegetal em outras espécies de *Adesmia*. E que o ácido indolacético (AIA) produzido por estes rizóbios pode ser utilizado como substituto no enraizamento e aclimatização de macieira.

Deste modo, a fim de comprovar esta hipótese foram realizados três estudos com objetivos de avaliar e selecionar rizóbios nativos isolados de *A. latifolia* quanto à promoção do crescimento de quatro espécies de *Adesmia* (*Adesmia latifolia*, *A. psoraleoides*, *A. riograndensis* e *A. tristis*) e avaliar o uso de rizóbios produtores de ácido indol acético(AIA) em substituição ao AIA sintético no enraizamento e na aclimatização do porta-enxerto micropropagado de macieira cv Marubakaido (*Malus prunifolia* Bork).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Revisão bibliográfica: **Promoção de crescimento vegetal por rizóbios**

Revisão submetida para publicação como informe técnico na “Revista Agropecuária Catarinense”.

## **Promoção de crescimento vegetal por rizóbios**

Aleksander Westphal Muniz, João Américo Wordell Filho e Enilson Luiz Saccol  
de Sá

Os rizóbios são bactérias gram negativas pertencentes à divisão Proteobacteria. Essa divisão apresenta duas classes: alfa e beta. Os gêneros de rizóbio encontrados na classe alfa são: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum* e *Phyllobacterium*. Os gêneros da classe beta são *Burkholderia* e *Cuproavidus* (Zakhia & De Lajudie, 2001; Willens, 2006). Essas bactérias estabelecem simbiose e promovem o crescimento de leguminosas. No entanto, os rizóbios podem promover o crescimento de outras espécies vegetais como milho, trigo e arroz (Rothballer et al., 2009).

A promoção do crescimento vegetal por rizóbios pode ocorrer por três mecanismos: biofertilização, fitoestimulação e controle biológico. A biofertilização consiste na atuação dos microrganismos como fertilizante e visa melhorar o estado nutricional da planta hospedeira (Vessey, 2003). A fitoestimulação consiste na produção de substâncias que induzem ao crescimento vegetal na ausência de patógenos. O controle biológico consiste na supressão de patógenos vegetais pela presença de rizóbios.

A seguir são abordados os mecanismos de promoção de crescimento vegetal por rizóbios em espécies de leguminosas e não leguminosas.

## **Promoção de crescimento vegetal por rizóbios em espécies de leguminosas**

O mecanismo de biofertilização utilizado por rizóbios em leguminosas denomina-se fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN é resultante da simbiose rizóbio-leguminosa, que ocorre da seguinte maneira: o rizóbio invade o tecido vegetal por meio de mecanismos de infecção, que resultam em nódulos. Os nódulos permitem que o rizóbio sobreviva dentro do hospedeiro sob a forma de bacterióides, onde fixam nitrogênio gasoso sob a forma de amônia para fornecer a planta hospedeira. Por sua vez, a planta hospedeira fornece aminoácidos e carbono à bactéria (Heath & Tiffin, 2009). Na agricultura a FBN permitiu a diminuição drástica da adubação nitrogenada, especialmente na cultura da soja no Brasil, onde 90 % da área cultivada utilizam inoculantes com rizóbios (Hungria et al., 2005).

A fitoestimulação de rizóbios foi observada na cultura do feijão, onde a presença de citocinas provocou alterações na arquitetura radicular e na formação de nódulos (Puppo & Rigaud, 1978). Camerini et al. (2008) observaram que a produção bacteriana de auxinas promoveu o crescimento de *Vigna hirsuta* através da diminuição da senescência vegetal e bacteriana durante o processo de desenvolvimento dos nódulos. A produção de auxinas por alguns isolados de *Sinorhizobium meliloti* induziram o crescimento vegetal de *Medicago trunculata* através do aumento da resistência a altos teores de salinidade (Bianco & Defez, 2009).

O controle biológico por rizóbios foi observado em *Vicia faba*, onde a bacterização das sementes permitiu a indução de resistência sistêmica ao vírus do mosaico amarelo (2006). A utilização de sementes tratadas com rizóbios também permitiu o controle da murcha bacteriana e podridão radicular



causadas por *Curtobacterium* e *Fusarium* na cultura do feijão, respectivamente (Dar et al., 1997; Huang et al., 2007<sup>a</sup>). O tratamento de sementes com rizóbio também permitiu o controle de tombamento de mudas causado por *Pythium* nas culturas de ervilha e lentilha (Huang et al., 2007<sup>b</sup>). E ainda, a utilização de sementes inoculadas permitiu o controle da podridão radicular causada por *Phytophthora clandestina* em trevo subterrâneo (Simpfendorfer et al., 1999).

### **Promoção de crescimento vegetal por rizóbios em espécies não leguminosas**

A fitoestimulação pôde ser observada na produção de ácido indolacético (AIA) por rizóbios na cultura de alface, onde ocorreram incrementos no vigor e germinação das sementes (Schlindwein et al., 2008). A produção de AIA por rizóbios também proporcionou aumento no crescimento vegetal na cultura do arroz (Chi et al., 2005). Na cultura do algodão, a produção de AIA por rizóbios aumentou a absorção de nutrientes do solo (Hafeez et al., 2004). Outro exemplo de fitoestimulação é a produção de giberilina por rizóbios na cultura do arroz, resultando em aumento no crescimento radicular e produção de grãos (Yanni et al., 2001).

O controle biológico por rizóbios foi eficiente na cultura do girassol, constatado pela inibição do crescimento dos patógenos *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* (Ehteshamul-Haque & Ghaffar, 1993).

### **Promoção de crescimento por rizóbios em espécies de leguminosas forrageiras e não leguminosas no sul do Brasil**

A pesquisa com rizóbios em leguminosas forrageiras no sul do Brasil concentrou-se em espécies exóticas como os trevos e cornichões. Nesses trabalhos foram selecionados isolados eficientes na promoção de crescimento vegetal em diferentes condições de solo. Nas seleções de rizóbios para trevo branco foram observadas a acidez e os teores de alumínio do solo (Brose, 1991; 1994). Em trevo vermelho foi determinada as melhores estirpes para produção de inoculantes (Santillana et al., 1998). As espécies de cornichões foram selecionadas também para estresse salino (Martins, 2010).

A pesquisa com rizóbios em espécies nativas ainda é incipiente com trabalhos restritos principalmente aos gêneros de *Adesmia* e *Desmodium*. Um dos poucos trabalhos realizados com *Adesmia latifolia* visava comparar a eficiência simbiótica com *Lotus corniculatus* (Scheffer-Basso et al., 2001). Outros trabalhos com *A. latifolia* foram destinados a seleção de estirpes eficientes na promoção do crescimento vegetal (Voss et al., 2000; Muniz et al., 2009). Em *Adesmia arujoi* e *Adesmia tristis* foram estudadas a nodulação e feita a seleção de isolados promotores de crescimento (Scheffer-Basso et al., 2000; Muniz et al., 2009). O trabalho com *Desmodium* confirmou que os rizóbios autóctones apresentam baixa especificidade hospedeira (Granada, 2010).

A pesquisa com promoção de crescimento por rizóbios em não leguminosas encontra-se na fase inicial no sul do Brasil. Porém, o grupo de pesquisa em interações mutualísticas plantas e microrganismos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul desenvolveu trabalhos de destaque com a cultura do arroz. Destes pode-se destacar a eficiência de isolados na promoção do crescimento de arroz (Osório Filho, 2009).

## **Utilização atual e perspectivas futuras do uso de rizóbios como promotores de crescimento em rizóbios em leguminosas e não leguminosas**

A utilização da inoculação de bactérias benéficas para promover o crescimento vegetal ocorre há séculos. No final do século 19, os benefícios da inoculação de sementes de leguminosas com rizóbio era conhecida e tornou-se uma prática comum. Em seguida, no ano de 1898 os pesquisadores Nobbe e Hiltner registraram a primeira patente para inoculação de leguminosas com *Rhizobium* sp (Hartmann et al., 2009). No Brasil a cultura da soja utiliza apenas a inoculação com rizóbio e dispensa a fertilização nitrogenada (Hungria et al., 2005). Em todo o mundo a utilização de rizóbios como promotores de crescimento concentra-se na biofertilização pela fixação biológica de nitrogênio.

O cenário da pesquisa com rizóbios começou a mudar com trabalhos com as culturas do arroz irrigado e trigo, que fazem parte das culturas agrícolas denominadas de commodities. Assim, a partir das pesquisas realizadas com a indução de crescimento por fitoestimulação em arroz no Egito, pode-se observar incrementos de produtividade da cultura (Yanni et al., 2001), fato esse comprovado na cultura do trigo (Hilali et al., 2001). Isso, permite a abertura de novas possibilidades de utilização de rizóbios como inoculantes em gramíneas. Além disso, tais bactérias são conhecidas por produzir fitormônios e podem ser utilizadas em outras espécies vegetais.

### Literatura citada

ARORA, N. K.; KANG, S. C.; MAHESHWARI, D.K. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. **Current Science**, v. 81, n. 6, 2001.

BIANCO, C.; DEFEZ, R. *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 11, pp. 3097–3107, 2009.

BROSE, E. Seleção de rizóbio tolerante a Al e a baixo pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n.1, p. 126-135, 1991.

BROSE, E. Seleção de rizóbio para trevo branco em solo ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 29:281-285, 1994.

CAMERINI, S.; SENATORE, B.; LONARDO, E.; IMPERLINI, E.; BIANCO, C.; MOSCHETTI, G.; ROTINO, G. L.; CAMPION, B.; DEFEZ, R. Introduction of a novel pathway for IAA biosynthesis to rhizobia alters vetch root nodule development. **Arch Microbiol**, v.190, pp.67–77, 2008.

CHI, F.; SHEN, S-H.; CHENG, H-P.; JING, Y-X. YANNI, Y. G.; DAZZO, F. B. Ascending Migration of Endophytic Rhizobia, from Roots to Leaves, inside Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p. 7271–7278, 2005.

DAR, G.H.; ZAGAR, M.Y.; BLEIGHT, G.M. Biocontrol of *Fusarium* root rot in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. **Microbial Ecology**, v.34, pp.74–80, 1997.

ELBADRY, M., TAHA, R.M., ELDOUGDOUG, K.A., GAMAL ELDIN, H. Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow

mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.113, pp.247–251, 2006.

EHTESHAMUL-HAQUE, S. AND GHAFAR, A. Use of Rhizobia in the Control of Root Rot Diseases of Sunflower, Okra, Soybean and Mungbean. **Journal of Phytopathology**, 138: 157–163, 1993.

GRANADA, C. E. **Seleção de rizóbios e estudo da compatibilidade simbiótica em *Desmodium incanum* e *Lotus spp.*** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e Ambiental, pp. 70, 2010.

HAFEEZ, F. Y., SAFDAR, M. E., CHAUDHRY, A. U., MALIK, K. A. Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 44:617-622, 2004.

HEATH, K. D.; TIFFIN, P. Stabilizing mechanisms in a legume–rhizobium mutualism. **Evolution**, v.63, n.3,pp. 652–662, 2009.

HILALI, .; PRÉVOST, D.; BROUGHTON, W. J.; ANTOUN, H. Effets de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, n.6, p. 590-593, 2001.

HUANG, H.C.; ERICKSON, R.S.; HSIEH, T.F. Control of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) by seed treatment with *Rhizobium leguminosarum*. **Crop Protection**, v.26, pp. 1055–1061, 2007<sup>a</sup>.

HUANG, H.C.; ERICKSON, R. S. Effect of Seed Treatment with *Rhizobium leguminosarum* on *Pythium* Damping-off, Seedling Height, Root Nodulation,

Root Biomass, Shoot Biomass, and Seed Yield of Pea and Lentil. **Journal of Phytopathology**, v.155, n.1, pp.31-37, 2007<sup>b</sup>.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in south America. **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress**, v.4, p.25-42, 2005.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, pp.541–556, 2009.

MUNIZ, A. W. ; DALLA COSTA, M. ; SÁ, E. L. S. ; OLIVEIRA, V. A. F. .Selection of rhizobia strains for *Adesmia latifolia*. In: **1st International INCT Symposium on Biological Nitrogen Fixation**, 2009, Curitiba-PR. , 2009. v. Único. p. 40-40.

OSÓRIO FILHO, B. D. **Rizóbios eficientes em lotus como promotores de crescimento em arroz irrigado**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, *Tese de Doutorado*, 114 p., 2009.

PUPPO, A.; RIGAUD, J. Cytokinins and morphological aspects of French-bean roots in the presence of *Rhizobium*. **Physiol. Plant.**, v.42, pp. 202-206, 1978.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Diazotrophic Bacterial Endophytes in *Gramineae* and Other Plants. **Microbiol Monogr.**, v.8, pp. 273–302, 2009.

SANTILLANA, N.; FREIRE, J. R. J.; de SÁ, E. L. S.; SATO, M. Avaliação de estirpes de rizóbio para a produção de inoculantes para trevo vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 22:231-237, 1998.

SCHEFFER-BASSO, S.M.; CARNEIRO, C. M. ; VOSS, M. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio em *Adesmia araujo* Bur.. **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v. 6, n. 1, p. 16-18, 2000.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; JACQUES, A. V. A.; DALL'AGNOL, M.; RIBOLDI, J.; CASTRO, S. M. J. Disponibilidade e Valor Nutritivo de Forragem de Leguminosas Nativas (*Adesmia* DC.) e Exóticas (*Lotus* L.). **Rev. bras. zootec.**, 30(3):975-982, 2001.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alfaca. **Ciência Rural**, v.38, n.3, pp.658-664, 2008.

SIMPFENDORFER, S.; HARDEN, T.J.; MURRY, G.M. The *in vitro* inhibition of *Phytophthora clandestina* by some rhizobia and the possible role of *Rhizobium trifolii* in biological control of Phytophthora root rot of subterranean clover. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.50, pp.1469–1474, 1999.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v. 255, pp.571-586, 2003.

VOSS, M.; BROSE, E.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; JACQUES, A.V.A. Recomendação de estirpes de rizóbio para *Adesmia latifolia*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 4p.html. 1 ilustr. (Embrapa Trigo. **Comunicado Técnico Online**, 52). Disponível: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_co52.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co52.htm)

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

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; ABD EL-FATTAH, F.K. et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Funct Plant Biol**, 28:845–870, 2001.

ZAKHIA, F., DE LAJUDIE, P. Taxonomy of Rhizobia. Minireview. **Agronomie**, v.21, pp. 569–576, 2001.



### 3. ESTUDOS REALIZADOS

#### 3.1. Estudo 1 : Promoção do crescimento de espécies de *Adesmia* por rizóbios produtores de ácido indolacético

Aleksander Westphal Muniz<sup>1</sup>; Gilberto Luíz Dalagnol<sup>2</sup>; João Américo Wordell

Filho<sup>3</sup>; Enilson Luiz Saccol de Sá<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Eng. Agr., Doutorando UFRGS, Epagri, C.P. 181, CEP 88502-970 Lages, SC, e-mail: [aleks@epagri.sc.gov.br](mailto:aleks@epagri.sc.gov.br)

<sup>2</sup> Eng. Agr., Dr., Epagri, Epagri, C.P. 181, CEP 88502-970 Lages, SC, e-mail: [gldalagnol@epagri.sc.gov.br](mailto:gldalagnol@epagri.sc.gov.br)

<sup>3</sup> Eng. Agr., Dr., Epagri, CEPAF, Chapecó, SC, e-mail: [wordell@epagri.sc.gov.br](mailto:wordell@epagri.sc.gov.br)

<sup>4</sup> Eng. Agr., Dr., UFRGS, Laboratório de Microbiologia do Solo, e-mail: [enilson.sa@ufrgs.br](mailto:enilson.sa@ufrgs.br)

Artigo aceito para publicação na “Revista Agropecuária Catarinense”.

**Promoção do crescimento de espécies de *Adesmia* por rizóbios  
produtores de ácido indolacético**

Aleksander Westphal Muniz; Gilberto Luíz Dalagnol; João Américo Wordell  
Filho; Enilson Luiz Saccol de Sá

**RESUMO:** As espécies de *Adesmia* encontradas no Rio Grande do Sul e Santa Catarina apresentam alta qualidade forrageira e podem ser utilizadas em programas de melhoramento de campos nativos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a promoção do crescimento em espécies de *Adesmia* por rizóbios produtores de ácido indolacético (AIA). Foram utilizados sete isolados de bactérias de nódulos de *Adesmia latifolia* e pertencentes à coleção de rizobactérias da Epagri. Avaliaram-se a produção de ácido indolacético *in vitro* e a promoção de crescimento vegetal pelos isolados em *A. latifolia*, *A. psoraleoides*, *A. riograndensis* e *A. tristis*. Os resultados obtidos demonstraram uma produção variável de AIA pelos diferentes isolados. Os efeitos dos isolados de rizóbio na promoção do crescimento variaram devido a interação com as diferentes espécies de *Adesmia*. Rizóbios produtores de AIA isolados de uma leguminosa podem promover o crescimento em outras espécies do mesmo gênero. Estes microrganismos de AIA induzem o crescimento sobre as raízes primárias, número de raízes secundárias, produção de biomassa fresca de raízes e parte aérea.

Termos de indexação: *Adesmia latifolia*, *A. psoraleoides*, *A. riograndensis*, *A. tristis*, auxinas

## **Rhizobia in *Adesmia* species by indol-acetic-acid production**

**ABSTRACT:** The *Adesmia* species found in Rio Grande do Sul and Santa Catarina have high nutritional quality and may be used in breeding programs of native grasslands. The aim of this study was to evaluate the promotion in *Adesmia* species by rhizobia producing indole acetic acid (IAA). We used seven isolates of bacteria from nodules of *A. latifolia* of the Collection Epagri rhizobacteria. These were analyzed for production of indole acetic acid and promoting plant growth in *A. latifolia*, *A. psoraleoides*, *A. riograndensis* and *A. tristis*. The results showed a variable production of IAA by different isolates used. The isolates produced different effects in promoting the growth of different species of *Adesmia*. The effects of rhizobia strains in promoting growth varied depending on the interaction with the different species of *Adesmia*. IAA-producing rhizobia isolated from a leguminous plant can promote growth in other species of the same genus. IAA-producing rhizobia induce growth by acting on the primary root, secondary root number, fresh biomass production of roots and shoots.

Index terms: *Adesmia latifolia*, *Adesmia psoraleoides*, *Adesmia riograndensis*, *Adesmia tristis*, auxins

### **Introdução**

As leguminosas nativas se caracterizam por sua qualidade forrageira, capacidade de adaptação e de fixação de nitrogênio em simbiose com rizóbio. Isso lhes confere uma função importante de aporte de nitrogênio ao ecossistema e de contribuição na dieta de ruminantes. Nos campos nativos do Rio Grande do Sul e Santa Catarina podem ser encontradas 13 espécies de leguminosas do gênero *Adesmia*. Essas espécies de *Adesmia* apresentaram

grande potencial na produção de forragem para ruminantes e são adaptadas a temperaturas baixas e geadas que ocorrem na Região Sul (Miotto & Leitão Filho, 1993).

As espécies de *Adesmia* vêm sendo estudadas quanto a seu potencial de uso forrageiro. Dessas espécies, *A. latifolia* e *A. tristis* apresentaram níveis consideráveis de proteína bruta e digestibilidade. A espécie *A. punctata* apresentou, junto com *A. latifolia*, boa partição da biomassa nas folhas e acúmulo de forragem (Dias, 2003; Scheffer-Basso et al., 2001; Scheffer-Basso et al., 2002). Outros trabalhos com *A. latifolia* e *A. araujo* também foram conduzidos para avaliar os efeitos da inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio na produção de forragem (Scheffer-Basso et al., 2000; 2001). Em Santa Catarina, os estudos ainda são incipientes em relação à seleção de isolados eficientes na fixação biológica de nitrogênio, limitados a experimentos em condições *in vitro* e de casa de vegetação (Muniz et al., 2009<sup>a, b</sup>)

A maioria dos estudos, como os citados acima, relaciona a promoção de crescimento em *Adesmia* à fixação de nitrogênio por rizobactérias. Outros mecanismos de promoção de crescimento das plantas pelas rizobactérias, como a produção de reguladores de crescimento do tipo auxina, não vem sendo pesquisados. Sendo por esta razão, o primeiro trabalho a investigar a promoção de crescimento em *Adesmias* por rizóbios produtores de ácido indolacético.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a promoção do crescimento em espécies de *Adesmia* por rizóbios produtores de ácido indolacético (AIA).

## **Materiais e Métodos**

Isolados de rizóbios provenientes de nódulos radiculares de *Adesmia latifolia* pertencentes à coleção do Laboratório de Biotecnologia da Epagri foram testados quanto a produção de AIA *in vitro* e na nodulação e promoção de crescimento de *Adesmia latifolia*, *A. psoraleoides*, *A. riograndensis* e *A. tristis*.

A avaliação da produção da auxina AIA foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Asghar et al. (2002). Os isolados de rizobactérias EEL0710, EEL1210, EEL1710A, EEL1810, EEL1910, EEL2210 e a estirpes SEMIA6437 foram cultivados em meio de cultura AML (agar-manitol-levedura) acrescido com triptofano ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) por 72 horas a  $28^\circ\text{C}$  e sob agitação a 120 rpm. Após esse período, uma alíquota de  $50 \mu\text{L}$  da suspensão bacteriana foi adicionada em microplacas de poliestireno com 96 poços. Em seguida, foi adicionado o reativo de Salkovski e a suspensão foi incubada a temperatura ambiente por uma hora. As reações que mudaram de coloração de amarelo para rosa indicaram a produção de AIA. A mudança de coloração ocorreu através da oxidação dos compostos indólicos por sais férricos. A concentração de AIA dos isolados foi estimada a partir do ajuste à curva de regressão obtida a partir da incubação de meio AML com quantidades conhecidas de AIA sintético (0, 25, 50, 100 e  $150 \mu\text{g L}^{-1}$ ). A concentração de AIA foi determinada utilizando o comprimento de onda de 492 nm em leitora de microplacas modelo Thermoplate. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado com 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

No experimento seguinte, os isolados testados quanto à produção de AIA foram inoculados em quatro espécies do gênero *Adesmia* para avaliação da formação de nódulos e promoção de crescimento vegetal. Meio de cultura de Jensen (0,1%) (Jensen, 1942) foi preparado e acondicionado em tubos de ensaio de 25 x 200 mm com um retângulo de papel-filtro de 15 x 25 mm. Sementes das espécies *Adesmia latifolia*, *A. psoraleoides*, *A. riograndensis* e *A. tristis* foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (3%) por cinco minutos sob agitação de 120 rpm e postas para germinar sob papel-filtro em placas de Petri. As sementes pré-germinadas com radícula de aproximadamente 1 centímetro foram alocadas nos tubos com meio de Jensen e inoculadas com 100 µL do caldo bacteriano crescido em meio AML sem triptofano. A avaliação ocorreu 25 dias após a transferência das plântulas para os tubos. As variáveis analisadas foram número de nódulos (NNOD), comprimento da raiz primária (CRP), número de raízes secundárias (NRS), comprimento dos brotos (CB), número de folhas bifoliadas (NFB), biomassa fresca da parte aérea (BFPA) e da raiz (BFR). O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado com dois fatores e seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **Resultados e discussão**

Os isolados EEL1210 e EEL1810 produziram mais AIA que os demais isolados e a estirpe SEMIA6437. Já os isolados EEL 2210, EEL1710, EEL0710 e EEL1910 produziram mais AIA que a estirpe SEMIA6437 (Figura 1). A produção de AIA também diferiu entre isolados de rizóbios de soja com uma variação entre 1,0 a 130,3 mg AIA. mL<sup>-1</sup> (Chen et al., 2002). A variação na

produção de AIA também foi constatada em isolados de rizóbio de acácia negra e trevo vesiculoso utilizados na germinação de alface com uma produção entre 1,2 a 171,1 mg AIA. mL<sup>-1</sup> (Schlindwein et al, 2008).

Os isolados testados formaram nódulos apenas na espécie *A. latifolia*, mas essa nodulação não foi significativa (Tabelas 1). A ocorrência de nódulos somente nessa espécie demonstra que existe especificidade entre os isolados e a planta hospedeira. Esse resultado diverge do encontrado no trabalho de Mayans et al. (2006), onde foi observado que as bactérias formadoras de nódulos em espécies de *Adesmia* não apresentaram especificidade em relação a planta hospedeira.

Os isolados que promoveram o maior crescimento em *A. latifolia* foram EEL1710A, EEL1210 e EEL0710 (Tabela 1). Os efeitos significativos ocorreram sobre o crescimento das raízes primárias (EEL1710A, EEL1210), produção da biomassa fresca de raízes e parte aérea (EEL1710A, EEL0710). Na espécie *A. psoraleoides* o maior crescimento foi promovido pelos isolados EEL1710A, EEL1810, EEL1210, e EEL0710 (Tabela 2). Tais isolados atuaram efetivamente sobre o comprimento das raízes primárias (EEL1810, EEL1210), número de raízes secundárias (EEL1710A, EEL1810, EEL1210, e EEL0710), biomassa fresca da parte aérea (EEL1810, EEL1210, EEL0710). Na espécie *A. riograndensis* o maior crescimento foi induzido pelos isolados EEL1710A, EEL1810 e EEL1210 (Tabela 3). Os efeitos destes isolados foram positivos sobre o crescimento de raízes primárias (EEL1210), número de raízes secundárias (EEL1810), biomassa fresca de raízes e da parte aérea (EEL1710A). Na espécie *A. tristis* a indução de crescimento foi maior com os isolados EEL1710A, EEL1810, EEL1210, EEL1910 e EEL0710 (Tabela 4). A

indução ocorreu sobre o número de raízes secundárias (EEL0710) e na produção da biomassa da parte aérea (EEL1710A, EEL1810, EEL1210, EEL1910 e EEL0710).

A variação nos efeitos dos isolados sobre o crescimento radicular primário e número de raízes secundárias ocorreu nas espécies de *Adesmia*, porque depende da interação entre o genótipo da planta e o microrganismo inoculado (Dodd et al., 2010). Tal variação foi comprovada em estudos na cultura do arroz com inoculação de *Azospirillum* e *Klebsiella*, onde diferentes concentrações de AIA induziram o desenvolvimento de raízes laterais (Glick, 1995; El-Khavas & Adachi, 1999). Desse modo, AIA produzido por rizobactérias pode aumentar ou diminuir a elongação radicular primária como observado em genótipos de feijão (Remans et al., 2008). A variação obtida nos efeitos dos isolados sobre a biomassa fresca de raízes também foi relatada em trabalhos com diferentes isolados de *Enterobacter* utilizados em cana-de-açúcar cultivada *in vitro* (Mirza et al., 2001). A variação demonstrada na indução da produção de biomassa fresca da parte aérea foi semelhante a de trabalhos com *Vigna radiata*, onde o efeito dos isolados dos *Bacillus* diferiu em sua interação com o hospedeiro (Ali et al., 2009a). O efeito da interação do genótipo vegetal e microbiano também afetou a produção da parte aérea em trigo, onde os isolados de *Pseudomonas* e *Bacillus* obtiveram diferentes desempenhos na cultura de trigo (Ali et al, 2009 b).

Os isolados não promoveram nenhum efeito significativo sobre o número de folhas bifoliadas e comprimento de brotos nas espécies de *Adesmia*.



## Conclusões

1. Rizóbios produtores de AIA isolados de nódulos de *Adesmia latifolia* podem promover o crescimento de plântulas de outras espécies do mesmo gênero, mesmo sem formar nódulos.
2. Rizóbios produtores de AIA estimularam o desenvolvimento das raízes primárias, número de raízes secundárias, produção de biomassa fresca de raízes e parte aérea de plântulas de *Adesmia*.

## Literatura citada

ALI, B.; SABRI, A. N.; LJUNG, K.; HASNAIN, S. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phyto-stimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). **World J Microbiol Biotechnol**, 25:519–526, 2009 <sup>a</sup>.

ALI, B.; SABRI, A. N.; LJUNG, K.; HASNAIN, S. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. **Letters in Applied Microbiology**, 48, 542–547, 2009 <sup>b</sup>.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.231-237, 2002.

CHEN, L. S.; FIGUEREDO, A.; VILLANI, H.; MICHAJLUK, J.; HUNGRIA, M. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. **Biol Fertil Soils**, v. 35, pp.448–457, 2002.

DIAS, P. B. M. **Caracterização de espécies brasileiras de *Adesmia* DC. por RAPD**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, pp. 101, 2003.

DODD, I.C.; ZINOVKINA, N. Y.; SAFRONOVA, V. I.; BELIMOV, A. A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals of Applied Biology**, 157 (3):361-379, 2010.

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

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, n.2, p.109-117, 1995.

JENSEN, H.L. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, 67: 98 –108, 1942: 109–117,1995.

MAYANS, M.; LARGUERO, S.; JAURENA, M.; GONZÁLEZ, F.; REYNO, R.; PUNSCHKE, K.; LABANDERA, C. Evaluación simbiótica en especies Del género *Adesmia*. In: **XXI Reunião do Grupo Técnico em Forrageiras do Cone Sul – Grupo Campos -Desafios e Oportunidades do Bioma Campos Frente a Expansão e Intensificação Agrícola**, Pelotas, RS, vol.único. p.1-2, 2006.

MIOTTO, S.T.S.; LEITÃO FILHO, H.F. Leguminosae-Faboideae- Gênero *Adesmia* DC. **Boletim do Instituto de Biociências**, n.52, p.1-157, 1993.

MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, 237: 47–54, 2001.

MUNIZ, A. W.; DALLA COSTA, M. ; SÁ, E. L. S. ; OLIVEIRA, V. A. F. .Selection of rhizobia strains for *Adesmia latifolia*. In: **1st International INCT Symposium on Biological Nitrogen Fixation**, Curitiba-PR. , Único. p. 40-40, 2009.

MUNIZ, A. W. ; BROSE, Edemar ; SÁ, E. L. S. *In Vitro* Selection of Rhizobia Strains for *Adesmia tristis* Vogel. In: **1st International INCT Symposium on Biological Nitrogen Fixation**, Curitiba-PR. , 2009. v. Único. p. 39-39.

PATTEN, C.; B. R. GLICK. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. **Applied and Environmental Microbiology**, 68 (8): 3795–3801, 2002.

REMANS, R.; BEEBE, S.; BLAIR, M.; MANRIQUE, G.; TOVAR, E.; RAO, I.; CROONENBORGHS, A.; TORRES-GUTIERREZ, R.; EL-HOWEITY, M.; MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, 302:149–161, 2008.

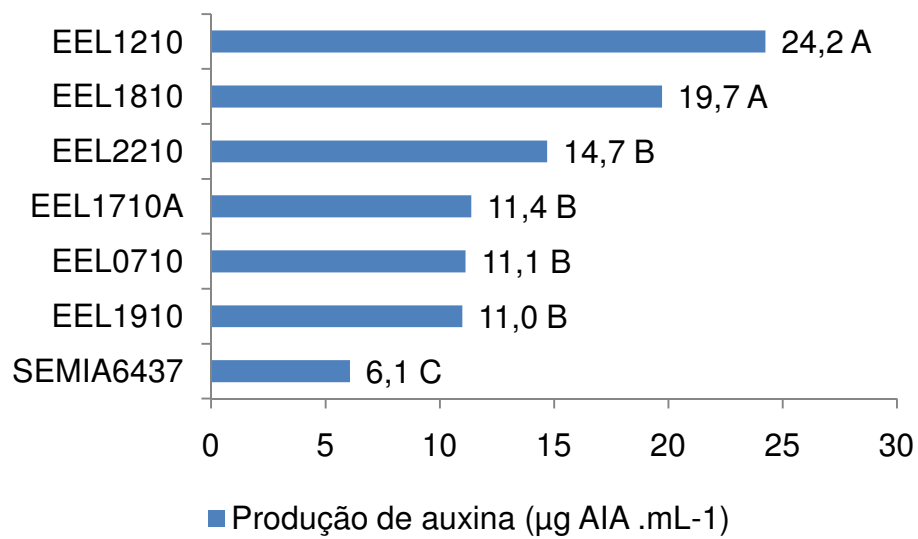
SCHEFFER-BASSO, S.M.; CARNEIRO, C. M. ; VOSS, M. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio em *Adesmia araujoii* Bur. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 6, n. 1, p. 16-18, 2000.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; JACQUES, A. V. A.; DALL'AGNOL, M.; RIBOLDI, J.; CASTRO, S. M. J. Disponibilidade e Valor Nutritivo de Forragem de

Leguminosas Nativas (*Adesmia* DC.) e Exóticas (*Lotus* L.). **Revista brasileira de zootecnia**, 30(3):975-982, 2001.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; VENDRÚSCULO, M. C.; BARÉA, K.; BENINCÁ, R. C.; LUBENOW, R.; CECCHETTI, D. Comportamento de leguminosas (*Adesmia*, *Lotus*, *Trifolium*) em mistura com festuca. **Revista brasileira de zootecnia**, v.31, n.6, pp. 2197-2203, 2002.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v.38, n.3, pp.658-664, 2008.



**Figura 1** – Produção de ácido indolacético de bactérias de nódulos de *A. latifolia* (médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).

Tabela 24 – Número de nódulos (NNOD), comprimento da raiz principal (CRP), número de raízes secundárias (NRS), biomassa fresca de raízes (BFR), biomassa fresca da parte aérea (BFPA), número de folhas bifoliadas (NFB) e comprimento de brotos (CB) de *Adesmia latifolia*. Médias de 6 repetições.

Isolado	NNOD	CRP (mm)	NRS	BFR (mg)	BFPA (mg)	NFB	CB (mm)
EEL1710A	2,5 ns	64,8 A	6,8 A	16,0 AB	50,5 AB	4,8 ns	39,0 ns
EEL1810	1,7 ns	49,2 B	6,8 A	12,0 C	44,0 BC	3,7 ns	22,3 ns
EEL1210	4,5 ns	68,3 A	5,7 A	14,5 BC	45,5 B	4,5 ns	31,2 ns
SEMIA6437	1,7 ns	53,3 B	5,7 A	5,6 C	41,4 BC	2,9 ns	28,5 ns
EEL2210	0,5 ns	30,7 D	4,2 A	14,9 D	34,0 C	3,4 ns	33,8 ns
EEL1910	1,6 ns	40,2 C	3,5 A	9,5 BC	44,5 B	4,7 ns	41,2 ns
NI**	0,0 ns	42,8 BC	3,0 A	14,7 CD	37,8 C	1,5 ns	32,5 ns
EEL0710	0,5 ns	27,2 D	1,2 B	17,6 A	53,7 A	3,3 ns	37,0 ns

\*Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*\*Testemunha não inoculada. ns= não significativo.

Tabela 2 – Número de nódulos (NNOD), comprimento da raiz principal (CRP), número de raízes secundárias (NRS), biomassa fresca de raízes (BFR), biomassa fresca da parte aérea (BFPA), número de folhas bifoliadas (NFB) e comprimento de brotos (CB) de *Adesmia psoraleoides*. Médias de 6 repetições.

Isolado	NNOD	CRP (mm)	NRS	BFR (mg)	BFPA (mg)	NFB	CB (mm)
EEL1710A	0,0 ns	87,2 B	15,8 A	4,2 D	8,8 D	3,2 ns	37,0 ns
EEL1810	0,0 ns	103,5 A	15,2 A	17,3 BC	38,2 A	2,7 ns	26,7 ns
EEL1210	0,0 ns	103,8 A	14,0 A	15,5 C	41,2 A	5,0 ns	31,2 ns
SEMIA6437	0,0 ns	71,0 C	5,7 B	13,8 C	21,8 C	1,8 ns	28,5 ns
EEL2210	0,0 ns	23,3 E	2,3 C	18,8 B	28,2 B	1,9 ns	33,8 ns
EEL1910	0,0 ns	45,5 D	1,0 C	9,5 D	31,0 B	1,2 ns	41,2 ns
NI**	0,0 ns	68,2 C	2,2 C	21,7 A	33,0 B	2,7 ns	32,5 ns
EEL0710	0,0 ns	93,8 B	10,3 A	21,2 A	39,8 A	3,3 ns	37,0 ns

\*Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*\*Testemunha não inoculada. ns= não significativo.

Tabela 3 – Número de nódulos (NNOD), comprimento da raiz principal (CRP), número de raízes secundárias (NRS), biomassa fresca de raízes (BFR), biomassa fresca da parte aérea (BFPA), número de folhas bifoliadas (NFB) e comprimento de brotos (CB) de *Adesmia riograndensis*. Médias de 6 repetições.

Isolado	NNOD	CRP (mm)	NRS	BFR (mg)	BFPA (mg)	NFB	CB (mm)
EEL1710A	0,0 ns	38,3 CD	3,7 BC	23,6 A	46,0 A	3,3 ns	25,0 ns
EEL1810	0,0 ns	49,3 B	12,3 A	16,8 B	14,0 B	3,8 ns	22,5 ns
EEL1210	0,0 ns	64,7 A	5,7 B	9,8 C	14,3 B	4,0 ns	21,3 ns
SEMIA6437	0,0 ns	40,7 C	5,7 B	5,6 D	11,5 BC	3,8 ns	19,7 ns
EEL2210	0,0 ns	23,2 E	0,0 D	9,0 C	10,8 C	3,0 ns	30,2 ns
EEL1910	0,0 ns	33,0 D	1,5 C	11,0 C	13,0 BC	4,6 ns	29,6 ns
NI**	0,0 ns	43,0 BC	0,0 D	5,6 D	10,0 C	2,2 ns	18,7 ns
EEL0710	0,0 ns	42,2 C	1,5 C	11,9 C	13,5 B	3,8 ns	32,5 ns

\*Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*\*Testemunha não inoculada. ns= não significativo.

Tabela 4 – Número de nódulos (NNOD), comprimento da raiz principal (CRP), número de raízes secundárias (NRS), biomassa fresca de raízes (BFR), biomassa fresca da parte aérea (BFPA), número de folhas bifoliadas (NFB) e comprimento de brotos (CB) de *Adesmia tristis*. Médias de 6 repetições.

Isolado	NNOD	CRP (mm)	NRS	BFR (mg)	BFPA (mg)	NFB	CB (mm)
EEL1710A	0,0 ns	68,2 A	19,8 A	16,0 B	19,5 A	3,0 ns	37,8 ns
EEL1810	0,0 ns	54,0 B	15,3 B	12,8 C	20,5 A	6,3 ns	33,0 ns
EEL1210	0,0 ns	39,8 D	7,5 D	13,7 B	21,0 A	4,0 ns	29,0 ns
SEMIA6437	0,0 ns	53,3 BC	5,7 D	5,6 D	14,8 B	3,8 ns	33,0 ns
EEL2210	0,0 ns	30,5 E	0,0 D	11,2 C	14,2 B	5,0 ns	36,3 ns
EEL1910	0,0 ns	48,2 C	1,5 C	14,2 B	19,0 A	4,5 ns	33,2 ns
NI**	0,0 ns	68,2 A	0,0 D	13,3 B	15,0 B	3,8 ns	39,0 ns
EEL0710	0,0 ns	53,8 BC	1,5 C	19,3 A	20,8 A	4,7 ns	40,8 ns

\*Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*\*Testemunha não inoculada. ns= não significativo.

### **3.2. Estudo 2: Caracterização e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios de *Adesmia latifolia***

Aleksander Westphal Muniz<sup>1</sup>; Gilberto Luíz Dalagnol<sup>2</sup>; Tiane Martin de Moura<sup>3</sup>;

João Américo Wordell Filho<sup>4</sup>; Enilson Luiz Saccol de Sá<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Eng. Agr., Doutorando UFRGS, Epagri, C.P. 181, CEP 88502-970 Lages, SC, e-mail: [aleks@epagri.sc.gov.br](mailto:aleks@epagri.sc.gov.br)

<sup>2</sup> Eng. Agr., Dr., Epagri, Epagri, C.P. 181, CEP 88502-970 Lages, SC, e-mail: [gldalagnol@epagri.sc.gov.br](mailto:gldalagnol@epagri.sc.gov.br)

<sup>3</sup>, Bach. em Nutrição MSc, UFRGS, Laboratório de microbiologia, e-mail: [tianedemoura@gmail.com](mailto:tianedemoura@gmail.com)

<sup>4</sup> Eng. Agr., Dr, Epagri, CEPAF, Chapecó, SC, e-mail: [wordell@epagri.sc.gov.br](mailto:wordell@epagri.sc.gov.br)

<sup>5</sup> Eng. Agr., Dr., UFRGS, Laboratório de Microbiologia do Solo, e-mail: [enilson.sa@ufrgs.br](mailto:enilson.sa@ufrgs.br)

Artigo submetido para publicação na “Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira”.



## **Caracterização e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios de *Adesmia latifolia***

Aleksander Westphal Muniz; Gilberto Luíz Dalagnol, Tiane Martin de Souza,  
João Américo Wordell Filho e Enilson Luiz Saccol de Sá

**Resumo** – A leguminosa *Adesmia latifolia* apresenta alta qualidade nutricional e produtividade como planta forrageira. O objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotípica e geneticamente os isolados de rizóbios e avaliar a sua eficiência simbiótica em *Adesmia latifolia*. A caracterização fenotípica utilizou dados referentes à morfologia e fisiologia dos isolados e das estirpes de referência. A eficiência simbiótica foi determinada com base na produção de massa seca da parte aérea, número e massa seca de nódulos, e eficiência relativa. Os isolados mais eficientes foram seqüenciados geneticamente. O dendrograma resultante da caracterização fenotípica dos 38 isolados apresentou dois grupos com 84 % de similaridade. O grupo I continha 94,7 % dos isolados e a estirpe SEMIA6437 recomendada para produção de inoculantes dessa espécie. Os isolados mais eficientes na indução da produção de massa seca da parte aérea foram EEL47310, EEL45910, EEL37910 e EEL45810. Tais isolados foram caracterizados geneticamente como *Mesorhizobium* sp. A maioria dos isolados testados apresentaram características fenotípicas dos gêneros *Mesorhizobium* e *Rhizobium*. Os isolados EEL47310, EEL45910, EEL37910 e EEL45810 são mais eficientes que a estirpe SEMIA6437 na indução da produção de massa seca da parte aérea. Esses isolados são do gênero *Mesorhizobium*.

Termos de Indexação: nodulação, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, planta forrageira

**Abstract** – The legume *Adesmia latifolia* has high nutritional quality and productivity as forage. The objective of this study was to characterize and evaluate the symbiotic efficiency of rhizobacteria isolates from nodules of *Adesmia latifolia*. The phenotypic characterization was based on morphology and physiology data of isolates and reference strains. The symbiotic effectiveness was based on dry matter production of shoots, number and dry matter of nodules, and relative efficiency. The most efficient isolates were genetically sequenced. Dendogram resulting from the phenotypic characterization of 38 isolates forming two groups with 84 % of similarity. Group I contained the strain SEMIA6437 recommend for inoculation production of this species. The more efficient strains were EEL47310, EEL45910, EEL37910 and EEL45810. These strains were genetically characterized as *Mesorhizobium*. Most strains tested showed phenotypic characteristics of *Rhizobium* and *Mesorhizobium* genera. Strains EEL47310, EEL45910, EEL37910 and EEL45810 are more efficient in inducing shoot dry matter production than strain SEMIA6437. These strains are *Mesorhizobium*.

Index terms: nodulation; *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, forage.

### Introdução

O gênero *Adesmia* é nativo da América do Sul e apresenta cerca de 230 espécies, das quais 17 são encontradas no Brasil. Nos campos nativos da Região Sul podem ser encontradas as espécies *Adesmia araujoii*, *Adesmia*

*latifolia*, *Adesmia punctata* e *Adesmia tristis*. Dentre essas destacam-se *Adesmia arujoi* e *Adesmia latifolia* como ótimas forrageiras (Miotto & Leitão Filho, 1993).

A espécie *Adesmia latifolia* apresenta a vantagem de ser estolonífera e acumular maior quantidade de forragem do que as demais espécies herbáceas do gênero (Scheffer-Basso et al., 2005). Além disso, essa espécie produz forragem durante a estação fria, possibilitando a alimentação animal durante um período de escassez de alimento. A *Adesmia latifolia* também apresenta desempenho similar a espécies exóticas como *Lotus corniculatus* no que se refere à qualidade nutricional para ruminantes (Scheffer-Basso et al., 2001).

Em plantas do gênero *Adesmia* também se verifica a simbiose com rizobactérias diazotróficas do solo (Broughton et al., 2000). Essas bactérias são responsáveis pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), que reduz a necessidade de nitrogênio mineral do solo e, em consequência, leva à redução na adubação nitrogenada no plantio de pastagens. No entanto, a simbiose das plantas com diferentes bactérias diazotróficas autóctones do solo pode apresentar diferentes níveis de eficiência na FBN. Deste modo, em função de seu potencial de utilização, se faz necessária a realização de trabalhos visando selecionar estirpes com maior capacidade para FBN em simbiose com plantas de *Adesmia*, a fim de melhorar seu desempenho em cultivos. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotípica e geneticamente os isolados de rizóbios e avaliar a sua eficiência simbiótica em *Adesmia latifolia*.

## Material e Métodos

Isolados de bactérias de nódulos provenientes do sistema radicular de *Adesmia latifolia* e pertencentes à coleção do Laboratório de Biotecnologia da Epagri foram caracterizados fenotipicamente e avaliados quanto a sua eficiência simbiótica. Os isolados mais eficientes também foram caracterizados geneticamente. Os nódulos foram coletados de plantas de *Adesmia latifolia* nos municípios de Lages, Paineira, Urupema e São Joaquim, conforme as coordenadas geográficas da tabela 1. As avaliações foram realizadas de julho a dezembro de 2010.

A caracterização fenotípica utilizou dados referentes à morfologia e fisiologia dos isolados e das estirpes de referência. Como estirpes de referência foram utilizadas: SEMIA103 (*Mesorhizobium meliloti*); SEMIA658 (*Methylobacterium nodulans*), SEMIA2082 (*Rhizobium leguminosarum*), SEMIA3424 (*Mesorhizobium ciceri*), SEMIA5087 (*Bradyrhizobium elkanii*), SEMIA6437 (*Rhizobium spp*) e SEMIA6452 (*Azorhizobium caulinodans*).

A caracterização dos isolados foi efetuada em placas de petri contendo meio 79 com vermelho congo e em meio 79 com azul de bromotimol (Hungria, 1994). As placas foram incubadas por um período de incubação de até 16 dias a 28 °C (Vincent, 1970). Foram feitas observações do diâmetro, forma, elevação, aparência, bordas, transparência e coloração das colônias; formação, tipo e elasticidade da goma e modificação do pH do meio (HUNGRIA et al., 2001). O diâmetro das colônias foi mensurado após o terceiro, quinto, sétimo e décimo dia após a inoculação dos isolados em placas de petri. Os aspectos fisiológicos observados foram a capacidade de sintetizar ácido indolacético (AIA), tempo de crescimento e crescimento utilizando

diferentes fontes de carbono. A avaliação da produção da auxina AIA foi realizada usando-se o método colorimétrico de Asghar et al. (2002). O tempo de crescimento foi observado diariamente durante um período de 16 dias. A inoculação para avaliação do crescimento em diferentes fontes de carbono foi efetuada com um replicador para 25 isolados.

Os dados fenotípicos observados foram transformados em código binário (0 e 1) para análise de agrupamentos. Foram consideradas 10 características morfológicas e quatro fisiológicas. As variáveis utilizadas para avaliação das características morfológicas foram: diâmetro da colônia no isolamento e na avaliação do crescimento ( $\leq 1$  mm, 1-3 mm,  $\geq 3$  mm); forma da colônia (puntiforme, circular, filamentososa, irregular, rizóide, haste); elevação da colônia (plana, elevada, convexa, pulvinada, protuberante); bordas da colônia (inteiras, onduladas, lobadas, desiguais, filamentosas, enroladas); consistência da colônia (seca, aquosa, gomosa, viscosa, butírica); detalhes óticos da colônia (transparente, translúcido, opaco, brilhante); cor da colônia em meio 79 com vermelho congo (incolor, branco, rosado, rosa, avermelhado, vermelho); cor da colônia em meio 79 com azul de bromotimol (incolor, branco, creme, amarelo, rosa); produção de goma (pequena, grande). As variáveis para avaliação das características fisiológicas foram: tempo de crescimento (rápido = 5 dias, intermediário= 8 dias, lento= 12 dias, muito lento= 15 dias ); variação no diâmetro das colônias (aos 3, 5, 7 e 10 dias); pH do meio (ácido, neutro, alcalino); produção de AIA (0-13, 13-26, 26-39,  $>39 \mu\text{g AIA} \cdot \text{L}^{-1}$ ); utilização de D-arabinose, D-frutose, D-glicose, D-maltose, D-sorbitol, galactose, glicerol, manitol, mio-inositol e rafinose.

Foi construído um dendrograma de agrupamento com base nas características avaliadas. Esse dendrograma utilizou o algoritmo UPGMA e a matriz de similaridade com o coeficiente de Sokal & Sneath (1963). A análise de cluster aglomerativa hierárquica foi realizada com o auxílio do programa estatístico XLSTAT versão 5.02 (ADDINSOFT, 2010).

A eficiência simbiótica dos isolados foi avaliada nas plantas hospedeiras de *Adesmia latifolia* cultivadas em vasos com areia e vermiculita estéril (2:1 v/v) e solução nutritiva de Norris (Norris & Date, 1976). As plantas foram cultivadas em salas climatizadas com um fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Cada vaso foi regado semanalmente com 200 mL desta solução nutritiva. Para a inoculação das plantas, as bactérias foram multiplicadas no meio 79 líquido em tubos de ensaio de 25 x 200 mm a uma temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 120 rpm por três dias (Vincent, 1975). Deste meio foi inoculado um mL por vaso contendo três plantas germinadas com altura aproximada de 10 cm. Os 38 isolados da coleção foram testados com relação à produção de massa seca da parte aérea, número de nódulos e massa seca de nódulos. O experimento foi conduzido com delineamento completamente casualizado com quatro repetições e avaliado após 45 dias de sua implantação. Foram utilizados três tratamentos como testemunhas: um não inoculado com adição de nitrogênio (TESTCN), outro não inoculado sem adição de nitrogênio (TESTSN) e a estirpe SEMIA6437 recomendada para produção de inoculantes (BRASIL, 2009). O tratamento com nitrogênio recebeu  $700\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de nitrato de amônio, que foi parcelado semanalmente (BRASIL, 2009). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de médias de Scott-Knott (Scott & Knott,

1974). Os dados foram transformados através da função Box-Cox, que utiliza valores entre -1 e 1. A eficiência (E) foi determinada de acordo com a fórmula de Date e Norris (1979):

$$E = (\text{MSPA tratamento inoculado} / \text{MSPA tratamento com N}) \times 100$$

A caracterização genética dos isolados mais eficientes foi realizada por meio de sequenciamento gênico. O DNA dos isolados foi obtido por meio do kit ZR Fungal/Bacterial RNA MicroPrep™ (ZymoResearch, 2010). Os procedimentos de extração de DNA foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, o gene 16S rRNA foi amplificado das amostras de DNA por PCR.

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol dos *primers* FC27 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e R530 5'-CCGCGGCTGCTGGCAGTA-3' (Gontang, 2007) e 2 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol 75% e lavagem com etanol 60 %. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µl de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados

no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection* v1.0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set* "Z"; *Mobility File* "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"; *BioLIMS Project* "3100\_Project1"; *Run Module 1* "StdSeq50\_POP6\_50cm\_cfv\_100"; e *Analysis Module 1* "BC-3100SR\_Seq\_FASTA.saz".

As sequências obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos por meio do programa Blastn ("Basic Local Alignment Search Tool") (Altschul et al., 1997). Essas sequências foram comparadas com sequências homólogas depositadas no banco de dados público mundial GenBank (National Center for Biotechnology Information – (NCBI) – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## **Resultados e Discussão**

Os isolados apresentaram variação na morfologia de suas colônias, sendo que 5,3 % dos isolados formaram pequenas colônias ( $\leq 1$  mm), enquanto 50,0 % apresentaram colônias com diâmetros entre 1 e 3 mm . E ainda, uma grande parte com 44,7% dos isolados apresentou colônias com diâmetros  $> 3$  mm. O diâmetro das colônias e a produção de goma foram correlacionados com a habilidade de isolados de *Rhizobium* spp. em fixar simbioticamente nitrogênio, onde colônias grandes com grande produção de goma foram ineficientes e colônias pequenas e com pouca produção de goma foram eficientes (Herridge & Rougley, 1975). Por sua vez, Fuhrmann (1990) identificou isolados formadores de grandes colônias e simbioticamente eficientes em fixar nitrogênio na cultura da soja. Vários estudos indicaram que



a produção de goma em rizóbios está relacionada com a proteção contra estresses ambientais, capacidade de aderir a superfícies e no processo de osmoregulação (Spaink, 2000). Outros trabalhos indicaram que a goma está envolvida no processo de reconhecimento da bactéria pela planta hospedeira durante o processo de infecção radicular (Dazzo et al., 1991; Reuhs et al., 1998; Spaink, 2000).

A forma circular foi dominante em 84,21% dos isolados, enquanto a elevação convexa foi detectada em 89,47%. Todos os isolados apresentaram bordas inteiras com superfície lisa e aspecto brilhante. A consistência das colônias foi gomosa em 71,05% dos isolados. A maioria absoluta (94,74%) dos isolados apresentou grande produção de goma. A maior produção de goma foi associada a isolados de rizóbio de crescimento rápido (Martins et al., 1997).

O crescimento de 44,7% dos isolados foi rápida, 50% intermediária e 5,3% lenta. A grande maioria (94,7%) dos isolados apresentou reação ácida em azul de bromotimol, e o restante (5,3%) apresentou reação neutra. O crescimento rápido pode ser uma vantagem competitiva com outros microrganismos na rizosfera (Martins et al., 1997).

A produção de AIA de 39,4% dos isolados foi de 0 a 13  $\mu\text{g AIA.L}^{-1}$ ; de 18,4% foi de 13 a 26  $\mu\text{g AIA.L}^{-1}$ ; de 28,9% foi de 26 a 39  $\mu\text{g AIA.L}^{-1}$  e de 13,2% foi maior que 39  $\mu\text{g AIA.L}^{-1}$ . A produção de AIA também foi utilizada em outros trabalhos na caracterização de isolados de rizóbios nas culturas da soja e feijão -caupi (Chen et al., 2002; Chagas Junior et al., 2010). O crescimento dos isolados variou de acordo com a fonte de carbono, 78,9% cresceram em D-arabinose, 55,3% em D-frutose, 86,8% em D-glicose, 92,1% em D-maltose,

86,8% em D-sorbitol, 84,8% em galactose, 94,7% em glicerol, 84,2% em manitol, 76,3% em mio-inositol e 92,1% em rafinose.

Com base nas características morfofisiológicas os isolados formaram dois grupos com similaridade de 84,0% (Figura 1). O grupo I foi formado pelos isolados EEL0210, EEL0310, EEL0410, EEL14910, EEL15710, EEL16010B, EEL34010, EEL34110, EEL34310, EEL36010, EEL36110, EEL36210, EEL37810, EEL37910, EEL38110, EEL38210, EEL43210, EEL43310, EEL43410, EEL43510, EEL44710, EEL44810, EEL44910, EEL45010, EEL45810, EEL45910, EEL46110, EEL47310, EEL47910, EEL48110, EEL47010A, EEL47110A e as estirpes SEMIA103, SEMIA2082, SEMIA3024 e SEMIA6437. O grupo II pelos isolados EEL46010 e 48210 e as estirpes SEMIA658, SEMIA5087 e SEMIA6452. Quatro isolados não se agruparam visualmente com os demais grupos.

Os isolados que mais promoveram a produção de massa seca da parte aérea foram EEL47310, EEL45910, EEL37910 e EEL45810. Esses foram superiores na produção de massa seca da parte aérea do que a estirpe SEMIA6437 e a testemunha sem nitrogênio. Os isolados EEL48210, EEL47210, EEL15710, EEL44810, EEL46110, EEL34010, EEL37810, EEL36110, EEL0210, EEL16010, EEL47010, EEL47910, EEL44710, EEL38210, EEL46010, EEL36210, EEL45010, EEL48110, EEL38110 e EEL34110 apresentaram maior produção de massa seca da parte aérea do que a testemunha sem nitrogênio, mas não diferiram da estirpe SEMIA6437. Os isolados EEL14610, EEL43510, EEL47110, EEL43310 e EEL36010 apresentaram menor produção de massa seca da parte aérea do que a testemunha sem nitrogênio. Nenhum dos isolados testados apresentou maior

produção de massa seca da parte aérea do que a testemunha com nitrogênio (Tabela 2). Os resultados obtidos nesse trabalho pelos isolados EEL47310, EEL45910, EEL37910 e EEL45810 foram inferiores aos observados com a inoculação da estirpe E-226 e superiores a estirpe SEMIA6437 em ensaios de casa de vegetação (Voss et al., 2000; Scheffer-Basso et al., 2001).

Os isolados que induziram o maior número de nódulos do que a estirpe SEMIA6437 foram EEL37910, EEL45910, EEL34110, EEL15710, EEL38110, EEL44810, EEL48010, EEL34310, EEL47010, e EEL46110. Os isolados EEL47310, EEL0210, EEL16010B, EEL36210, EEL45010, EEL48210, EEL47210, EEL0410, EEL43410, EEL43210 e EEL36010 não apresentaram diferenças significativas no número de nódulos com relação a estirpe SEMIA6437. Os demais isolados induziram a um número de nódulos inferior ao observado pela estirpe SEMIA6437. As testemunhas com e sem nitrogênio não apresentaram a formação de nódulos (Tabela 2). Os isolados utilizados nesse trabalho induziram a formação de uma quantidade menor de nódulos do que o observado na utilização das estirpes E-226 e SEMIA6437 em ensaios de casa de vegetação (Voss et al., 2000; Scheffer-Basso et al., 2001).

A produção de massa seca de nódulos induzida pelos isolados EEL47310, EEL45910, EEL37910, EEL45810, EEL48210, EEL47210, EEL15710, EEL44810, EEL46110, EEL37810, EEL47010, EEL47910, EEL44710, EEL38210, EEL16010B, EEL45010, EEL38110, EEL34110, EEL34310, EEL48010, EEL0410 não diferiu da produção da massa seca de nódulos induzida pela estirpe SEMIA6437. Os demais isolados induziram a uma produção de massa seca de nódulos inferior à produzida pela SEMIA6437 (Tabela 2). Os isolados que induziram a produção de massa seca de nódulos

similar a induzido pela estirpe SEMIA6437 apresentaram valores superiores aos observados por Voss et al. (2000) e Scheffer-Basso et al. (2001) com a utilização das estirpes E-226 e SEMIA6437 em ensaios de casa-de-vegetação.

Os isolados EEL47310, EEL45910, EEL37910 e EEL45810 apresentaram maior eficiência na promoção da produção de massa seca da parte aérea do que a estirpe SEMIA6437. Nenhum dos isolados testados promoveu eficiência similar a da testemunha com adição de nitrogênio (Tabela 2). A eficiência simbiótica pelo isolado EEL47310, com valor igual a 37%, foi similar ao da estirpe E-226 utilizada em *Adesmia latifolia* por Scheffer-Basso (2001). No entanto, a eficiência promovida pelo isolado EEL47310 foi menor quando comparado com a promovida pela estirpe SEMIA6437 com 55,6% em ensaio de seleção em casa-de-vegetação (Voss et al., 2000).

As sequências parciais obtidas permitiram caracterizar os isolados mais eficientes (Tabela 3). Os isolados EEL47310, EEL45910, EEL45810 e EEL37910 foram classificados como *Mesorhizobium* sp. Destes isolados, apenas o isolado EEL47310 apresentou similaridade de 85% para sequência as sequências *forward* e reversa. Os demais apresentaram identidade máxima de 99% para as duas sequências utilizadas. O isolado EEL36010 foi classificado como *Rhizobium* sp. Este isolado apresentou similaridade de 99% para a para sequência *forward* e 92% para sequência reversa. No entanto, o número de *primers* utilizados neste estudo limita a amplificação a uma parte do gene 16S. Em estudos de filogenia de estirpes de rizóbio utilizadas como inoculantes no Brasil foram utilizados dez *primers* para o sequenciamento do gene 16S (Menna et al., 2006). Na classificação de *Rhizobium yanglingense* como espécie nova foram utilizadas cinco *primers* para sequenciar o gene 16S

(Tan et al., 2001). Tan et al. (1997) utilizou seis *primers* em estudos filogenéticos com *Mesorhizobium*. A utilização de um maior número de *primers* nestes trabalhos visou cobrir toda a extensão do gene 16S com 1550 pb (Clarridge III, 2004). O sequenciamento completo do gene 16S faz-se necessário na distinção entre isolados e na descrição de novas espécies. Tal sequenciamento é requerido na descrição de novas espécies, pois permite determinar a heterogeneidade dentro de uma mesma espécie e diferenciação entre espécies (Imhoff & Calmette, 2004).

### **Conclusões**

1. A maioria dos isolados testados apresenta características fenotípicas dos gêneros *Mesorhizobium sp.* e *Rhizobium sp.*
2. Todos os rizóbios estudados apresentam baixa eficiência simbiótica na fixação de nitrogênio, inclusive a estirpe SEMIA 6437.
3. Os isolados EEL47310, EEL45910, EEL37910 e EEL45810 são mais eficientes na indução da produção de massa seca da parte aérea de *A. latifolia* que a estirpe SEMIA6437.
4. Os isolados EEL47310, EEL45910, EEL37910 e EEL45810 pertencem ao gênero *Mesorrhizobium sp.*

### **Agradecimentos**

Ao apoio financeiro da Epagri e Embrapa no desenvolvimento deste trabalho.

### **Referências**

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new

generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

ADDINSOFT. XLStat versão 5.02. 2010.

BRASIL. Portaria n° 325, de 14 de setembro de 2009. **Diário Oficial da União**, 178, p.4-9. 2009.

CLARRIDGE III, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.4, p. 840-862, 2004.

CHEN, L. S.; FIGUEREDO, A.; VILLANI, H.; MICHAJLUK, J.; HUNGRIA, M. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. **Biol Fertil Soils**, v. 35, pp.448–457, 2002.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum**, v.32, n.1, pp.161-169, 2010.

DATE, R. A.; NORRIS, D. O. *Rhizobium* screening of *Stylosanthes* species for effectiveness in nitrogen fixation. **Australian Journal Agricultural Research**, v.30, p. 85-104, 1979.

DAZZO, F.B.; TRUCHET, G.L.; HOLLINGSWORTH, R.I.; HRABAK, E.M.; PANKRATZ, H.S. et al. *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection thread development in white clover root hairs. **J. Bacteriol.**, v.173, pp.5371–5384, 1991.

FUHRMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean Bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.224-229, 1990.

GONTANG, E. A.; FENICAL, W.; JENSEN P. R. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, 73, 3272-3282, 2007.

HERRIDGE, D. F.; ROUGHLEY, R. J. Variation in colony characteristics and symbiotic effectiveness of *Rhizobium*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.38. p19-27, 1975.

HUNGRIA, M. Coleta de Nódulos e Isolamento de Rizóbios. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S.(Ed.). **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. EMBRAPA: Brasília, pp.157-170, 1994.

IMHOFF. J. F.; CAUMETTE, P. Recommended standards for the description of new species of anoxygenic phototrophic bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, pp. 1415-1421, 2004.

MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G.. *Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "rizóbio"*. Seropédica. Embrapa Agrobiologia. 14p. (Embrapa-CNPAB. **Comunicado Técnico** no 19), 1997.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Syst. Appl. Microbiol.**, 29:315-332, 2006.

MIOTTO, S.T.S.; LEITÃO FILHO, H.F. Leguminosae-Faboideae- Gênero *Adesmia* DC. **Boletim do Instituto de Biociências**, n.52, p.1-157, 1993.

NORRIS, D.O., DATE, R.A. Legume bacteriology. In: SHAW, NJL, BRYAN, W.W. ed.. **Tropical pasture research, principles and methods**. Hurley: CAB, pp. 234-274, 1976.

REUHS, B.L.; GELLER, D.P.; KIM J.S.; FOX, J.E.; KOLLI, V.S.; PUEPPKE, S.G. *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, pp.4930–38, 1998.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; JACQUES, A. V. A.; DALL'AGNOL, M.; RIBOLDI, J.; CASTRO, S. M. J. Disponibilidade e Valor Nutritivo de Forragem de Leguminosas Nativas (*Adesmia* DC.) e Exóticas (*Lotus* L.). **Revista Brasileira de zootecnia**, v.30, n.3, p.975-982, 2001.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; VENDRUSCOLO, M. C.; CECCHETTI, D.. Desempenho de leguminosas nativas (*Adesmia*) e exóticas (*Lotus*, *Trifolium*), em função do estágio fenológico no primeiro corte **Revista Brasileira de zootecnia**,v.34, n.6, p.1871-1880, 2005.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M .A. Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance. **Biometrics**, Vol. 30, No. 3, (Sep., 1974), pp. 507-512.

SOKAL, R.R. ; SNEATH, P.H.A. Principles of Numeric Taxonomy. W.H. Freeman & Co., San Francisco and London, 359 p., 1963.

TAN, I. K .P.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes—XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 13, n. 5, p. 389-393, 1981.

TAN, Z.Y.; XU, X. D.; WANG, E. T.; GAO, J.L.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CHEN, W. X. Phylogenetic and Genetic Relationships of *Mesorhizobium*



*tianshanense* and Related Rhizobia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, pp. 874-879, 1997.

TAN, Z.Y.; KAN, F. L.; PENG, G. X.; WANG, E. T.; REINHOLD-HUREK, B.; CHEN, W. X. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, pp. 909-914, 2001.

VINCENT, J. M. **Manual practico de rizobiologia**. 1º ed. Buenos Aires, Argentina, Hemisferio Sur, 1975, 200p.

VOSS, M.; BROSE, E.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; JACQUES, A.V.A. Recomendação de estirpes de rizóbio para *Adesmia latifolia*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 4p.html. 1 ilustr. (Embrapa Trigo. **Comunicado Técnico Online**, 52). Disponível: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_co52.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co52.htm)

ZYMORESEARCH. ZR Fungal/ Bacterial DNA midprep. **Instruction Manual**, pp.1-7, 2010.

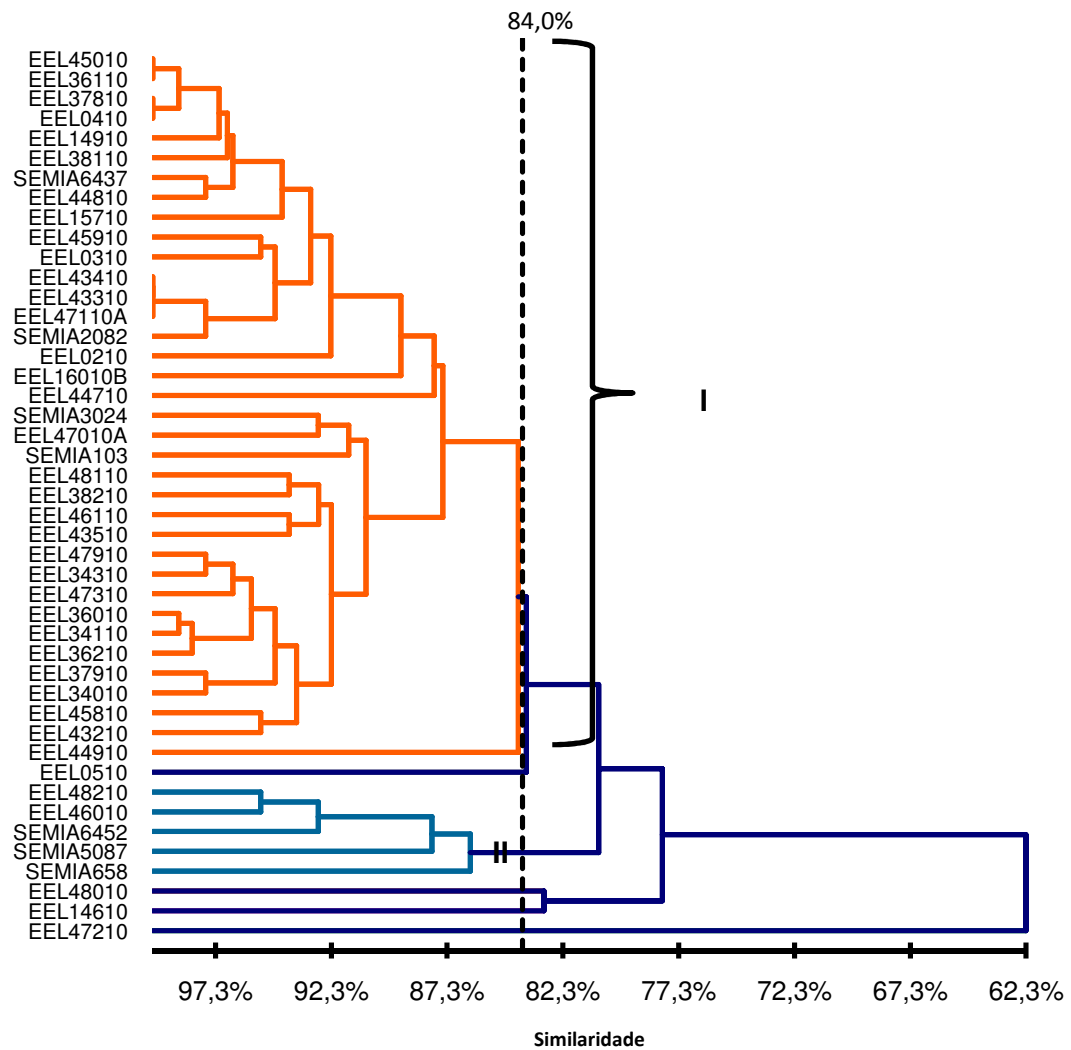


Figura 1 – Dendrograma de similaridade das características fenotípicas utilizando o coeficiente de Sokal e Sneath (1963) e o algoritmo UPGMA.

Tabela 1 – Locais de coleta dos rizóbios isolados de *Adesmia latifolia*.

Município	Altitude (m)	Latitude (S)	Longitude (WO)	Isolados
Urupema	1220	27°55.221´	49°59.700´	EEL0210 EEL0310 EEL0410 EEL0510
Urupema	1299	27°55.581´	49°58.773´	EEL34010 EEL34110 EEL34310
Painel	1177	27°56.757´	50°05.725´	EEL37810 EEL37910 EEL38110 EEL38210
São Joaquim	1191	28°15.351´	47°57.951´	EEL36010 EEL36110 EEL36210
Urupema	1312	28°55.903´	49°58.241´	EEL43210 EEL43310 EEL43410 EEL43510
Lages	906	27°47.812´	50°19.512´	EEL14610 EEL14910 EEL15710 EEL16010B
Lages	945	27°46.857´	50°06.190´	EEL44710 EEL44810 EEL44910 EEL45010
Lages	960	27°46.934´	50°06.480´	EEL47010 EEL47110 EEL47210 EEL47310
Lages	885	27°47.020	50°07.323´	EEL47910 EEL48010 EEL48110 EEL48210
Lages	950	27°46.845´	50°06.282´	EEL45810 EEL45910 EEL46010 EEL46110

Tabela 2 – Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NNOD), massa seca de nódulos (MNOD), de plantas de *Adesmia latifolia* inoculadas com isolados de rizóbios. Médias de 4 repetições.

Isolado	MSPA (mg/ vaso)	NNOD (N° vaso)	MNOD (mg/ vaso)	E (%)
TESTCN	1236,8 a	-	-	100,0
SEMIA6437	236,5 c	29,0 b	27,1 a	19,1
EEL47310	452,5 b	26,8 b	27,7 a	36,6
EEL45910	401,8 b	43,3 a	37,0 a	32,5
EEL37910	393,8 b	44,3 a	18,0 a	31,8
EEL45810	381,5 b	18,8 c	20,2 a	30,8
EEL48210	314,0 c	25,0 b	48,7 a	25,4
EEL47210	307,5 c	26,3 b	23,6 a	24,9
EEL15710	293,8 c	38,8 a	24,6 a	23,8
EEL44810	280,0 c	36,8 a	35,1 a	22,6
EEL46110	272,3 c	24,8 a	22,9 a	22,0
EEL34010	266,5 c	19,0 c	14,4 b	21,6
EEL37810	258,3 c	18,0 c	20,4 a	20,9
EEL36110	253,8 c	26,0 b	16,8 b	20,5
EEL0210	252,0 c	24,8 b	15,9 b	20,4
EEL16010B	248,5 c	25,0 b	31, a	20,1
EEL47010	248,3 c	33,8 a	27,7 a	20,1
EEL47910	246,5 c	18,0 c	23,3 a	19,9
EEL44710	246,0 c	31,8 c	23,0 a	19,9
EEL38210	244,8 c	13,0 c	18,7 a	19,8
EEL46010	243,8 c	20,0 c	16,0 b	19,7
EEL36210	237,8 c	22,5 b	11,8 b	19,2
EEL45010	237,3 c	22,8 b	30,5 a	19,2
EEL48110	236,0 c	17,0 c	13,5 b	19,1
EEL38110	210,5 c	37,8 a	27,4 a	17,0
EEL34110	203,5 c	41,0 a	20,8 a	16,5
EEL34310	198,3 d	35,0 a	20,1 a	16,0
EEL48010	194,5 d	36,0 a	33,4 a	15,7
EEL44910	177,5 d	6,8 d	12,5 b	14,4
EEL14910	164,3 d	15,3 c	7,2 c	13,3
EEL0310	164,0 d	19,3 c	19,3 b	13,3
EEL0410	146,8 d	25,8 b	20,9 a	11,9
EEL43410	140,0 d	17,3 b	14,0 b	11,3
EEL43210	131,0 d	24,3 b	15,7 b	10,6
EEL0510	130,8 d	14,3 c	14,0 b	10,6
EEL14610	126,0 e	10,3 c	13,1 b	10,2
EEL43510	116,0 e	5,7 d	6,3 c	9,4
EEL47110	106,0 e	1,7 d	1,9 c	8,6
EEL43310	98,3 e	16,5 c	10,8 b	7,9
EEL36010	87,3 e	26,8 b	6,0 c	7,0
TESTSN	152,3 d	-	-	12,3

\*Médias seguidas com a mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3 – Tamanho das sequências gênicas obtidas dos isolados mais eficientes na indução da produção de massa seca da parte aérea de *A. latifolia*

Isolado	Sequência <i>forward</i> (Número de bases)	Sequência reversa	Acesso GenBank	Espécie
EEL47310	748	491	EU874894	<i>Mesorhizobium</i> sp. W39
EEL45910	730	512	EU874894	<i>Mesorhizobium</i> sp. W39
EEL45810	752	512	EU874894	<i>Mesorhizobium</i> sp. W39
EEL37910	746	517	EU874894	<i>Mesorhizobium</i> sp. W39
EEL36010	594	448	AM691584 AM403621 AM403614	<i>Rhizobium</i> sp. R-32539

### **3.3. Estudo 3: Enraizamento e aclimatização do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido utilizando-se rizóbios de *Adesmia latifolia***

Aleksander Westphal Muniz<sup>1</sup>; Gilberto Luíz Dalagnol<sup>2</sup>; João Américo Wordell

Filho<sup>3</sup>; Enilson Luiz Saccol de Sá<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Eng. Agr., Doutorando UFRGS, Epagri, C.P. 181, CEP 88502-970 Lages, SC, e-mail: [aleks@epagri.sc.gov.br](mailto:aleks@epagri.sc.gov.br)

<sup>2</sup> Eng. Agr., Dr., Epagri, Epagri, C.P. 181, CEP 88502-970 Lages, SC, e-mail: [gldalagnol@epagri.sc.gov.br](mailto:gldalagnol@epagri.sc.gov.br)

<sup>3</sup> Eng. Agr., Dr., Epagri, CEPAF, Chapecó, SC, e-mail: [wordell@epagri.sc.gov.br](mailto:wordell@epagri.sc.gov.br)

<sup>4</sup> Eng. Agr., Dr., UFRGS, Laboratório de Microbiologia do Solo, e-mail: [enilson.sa@ufrgs.br](mailto:enilson.sa@ufrgs.br)

Artigo a ser submetido para publicação na “Revista Plant Cell Reports”.

**Enraizamento e aclimatização do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido utilizando-se rizóbios de *Adesmia latifolia***

Aleksander Westphal Muniz, Gilberto Luíz Dalagnol, João Américo Wordell

Filho e Enilson Luiz Saccol de Sá

**Resumo** – O enraizamento *in vitro* e a aclimatização são fases essenciais para o bom desenvolvimento a campo de porta-enxertos micropropagados de macieira. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de rizóbios de *Adesmia latifolia*, produtores de ácido indol acético (AIA), na promoção do enraizamento e na aclimatização do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido em substituição ao uso de AIA sintético. Os experimentos de enraizamento *in vitro* e aclimatização foram realizados utilizando-se tratamentos inoculados com quatro isolados de rizóbio e um controle com adição de AIA sintético. Nos tratamentos inoculados foram utilizados inóculos com caldo esterilizado e caldo contendo rizóbios vivos. A quantidade auxinas em todos os tratamentos foi padronizada para 1 mg.L<sup>-1</sup>. Observaram-se resultados significativos na taxa de enraizamento, comprimento de raízes primárias, número de raízes, comprimento radicular, biomassa fresca da parte aérea e biomassa fresca da raiz com a inoculação do isolado EEL16010B e no tratamento com adição de ácido indolacético sintético. Não foram obtidos resultados significativos para nenhum tratamento no experimento de aclimatização. O isolado EEL16010B pode ser utilizado na indução do enraizamento *in vitro* do porta enxerto cv. Marubakaido e substituir o uso de ácido indolacético sintético no enraizamento desse cultivar.

Termos de indexação: auxinas, micropropagação, maçã

**Abstract** – The *in vitro* rooting and acclimatization of micropropagated rootstocks of apple trees are essential stages to plant development in the field. The objective of this study was to promote rooting and acclimatization of the micropropagated apple rootstock cv. Marubakaido using rhizobia of *Adesmia latifolia*. The experiments of *in vitro* rooting and acclimatization were performed with four strains of *Rhizobium* and a treatment with synthetic indol acetic acid. In the rooting experiment was used sterile inoculum and alive. The amount of auxins in all treatments was even to 1 mg.L<sup>-1</sup>. The most significant effects on rooting rate, length of primary roots, root length, fresh weight of shoot and root were obtained by the isolate EEL16010B and the treatment with synthetic indol acetic acid. There were no significant results for any treatment in the acclimatization experiment. The isolated EEL16010B can be used to induce *in vitro* rooting of rootstock cv. Marubakaido and replace the use of synthetic indol acetic acid on this cultivar rooting.

Index terms: auxins, micropropagation, apple

## **Introdução**

A cultura da macieira destaca-se como uma das principais espécies frutícolas no mundo com uma produção de 64,3 milhão de t/ ano (Dobránski et al., 2010). No Brasil, a produção em 2009 foi de 1,22 milhão de toneladas em uma área cultivada de aproximadamente 39 mil hectares (IBGE, 2010). Em função da grande importância desse agronegócio se faz necessária a produção de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária por meio de metodologias eficientes como a micropropagação (Abreu & Pedrotti, 2003).



A micropropagação apresenta como principal vantagem, a capacidade de produzir clones de plantas livres de doenças durante o ano todo. A micropropagação apresenta quatro etapas: estabelecimento *in vitro*, multiplicação de brotos, enraizamento *in vitro* de microestacas e aclimatização (George & Debergh, 2008).

O enraizamento *in vitro* é uma fase crítica da micropropagação, pois depende do genótipo e de sua condição fisiológica no momento de indução ao enraizamento (Martins & Pedrotti, 2001). A fase posterior ao enraizamento *in vitro* é denominada de aclimatização. Essa fase faz-se necessária, pois no cultivo *in vitro* as plantas crescem em condições heterotróficas (Hazarika, 2003). Nesse processo podem ocorrer anomalias do tipo morfológicas como estômatos não funcionais e do tipo fisiológicas como a diminuição da fotossíntese (Rogalski et. al.; 2003). Essas anomalias causam dificuldades de sobrevivência das plantas em casa-de-vegetação ou no campo. Assim, a aclimatização é fundamental para a passagem das plantas micropropagadas da condição *in vitro* para a *ex vitro*.

A maioria dos trabalhos de enraizamento de macieira *in vitro* utilizou a adição de auxinas sintéticas, como o ácido indolbutírico (AIB) e ácido indolacético (AIA), em diferentes porta-enxertos e cultivares- copa. Já os trabalhos de aclimatização destacaram-se na utilização de diferentes substratos como turfa e areia (3:1) para o porta-enxerto M9 e turfa, perlita e vermiculita (4:1:1) para os cultivares-copa Golden Delicious e Royal Gala (Dobránski et al., 2010).

O enraizamento *in vitro* de plantas utilizando rizobactérias já foi estudado anteriormente na micropropagação de oliveira e pínus utilizando

*Pseudomonas* e *Agrobacterium rhizogenes*, respectivamente (Peyvandi et al., 2010, Villalobos-Amador et al., 2002). A aclimatização com inoculação de microrganismos também vem sendo desenvolvida com sucesso pela utilização de fungos micorrízicos arbusculares (Locatelli & Lovato, 2002; Cavallazzi et al., 2007). Até o momento, e dentro da abrangência da revisão realizada, não foram encontrados relatos na literatura sobre a utilização de microrganismos no enraizamento *in vitro* e aclimatização de macieira. Assim, este é o primeiro trabalho a investigar a promoção do crescimento por rizóbios no enraizamento *in vitro* e na aclimatização de porta-enxertos micropropagados de macieira. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de rizóbios de *Adesmia latifolia*, em substituição ao uso de AIA sintético, na promoção do enraizamento e na aclimatização do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh) .

## **Material e Métodos**

Vinte isolados de bactérias de nódulos radiculares de *Adesmia latifolia* pertencentes à coleção do Laboratório de Biotecnologia da Epagri foram avaliados quanto à produção da auxina AIA utilizando-se o método colorimétrico de Asghar et al. (2002). Os isolados de rizobactérias foram cultivados em meio de cultura AML (agar-manitol-levedura) com triptofano (50 mg L<sup>-1</sup>) por 72 horas a 28 °C e agitação a 120 rpm. Após esse período, uma alíquota de 50 µL da suspensão bacteriana foi adicionada em microplacas de poliestireno com 96 poços. Em seguida, foi adicionado o reativo de Salkovski e a suspensão foi incubada a temperatura ambiente por uma hora. As reações que mudaram de coloração de amarelo para rosa indicaram a produção de

AIA. A mudança de coloração ocorreu através da oxidação dos compostos indólicos por sais férricos. A concentração de AIA produzida pelas bactérias foi estimada a partir do ajuste à curva de regressão obtida a partir da incubação de meio AML com quantidades conhecidas de AIA sintético (0, 25, 50, 100 e 150  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). A concentração de AIA foi determinada utilizando o comprimento de onda de 492 nm em leitora de microplacas modelo Thermoplate. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado com quatro repetições. Os isolados que apresentaram maior produção de AIA foram utilizados nos experimentos de enraizamento *in vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira cv Marubakaido. As avaliações foram realizadas durante os meses de outubro e novembro de 2010. Tanto o experimento de enraizamento quanto o de aclimatização tiveram duração de 30 dias.

O experimento de enraizamento *in vitro* utilizou explantes do porta-enxerto de macieira cv Marubakaido multiplicados conforme o protocolo de Giacobbo et al. (2003). Dessa forma, a multiplicação foi realizada em meio MS (Murashige & Skooge, 1962) com redução na concentração de nitrato de amônio em 25% e de nitrato de potássio em 33%. Assim, o meio utilizado foi composto dos seguintes sais: fosfato de potássio (0,17 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ ), sulfato de magnésio (0,37 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1}$ ), sulfato de cobre (0,025 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1}$ ), sulfato de ferro (27,8 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1}$ ), sulfato de manganês (22,3 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1}$ ), sulfato de zinco (8,6 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1}$ ), molibdato de sódio (0,25 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1}$ ), nitrato de amônio (1,24 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ ), nitrato de potássio (1,27 g de  $\text{KNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ ), cloreto de cálcio (0,44 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1}$ ), sódio-EDTA (37,3 mg de  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot \text{L}^{-1}$ ), cloreto de cobalto (0,025 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e iodeto de

potássio ( 0,83 mg de KI.L<sup>-1</sup>). Por sua vez, nesse meio foram utilizada a sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>) e mio-inositol (0,1 g. L<sup>-1</sup>) como fontes de carbono, enquanto as vitaminas adicionadas foram o ácido nicotínico (0,5 mg. L<sup>-1</sup>), tiamina (0,1 mg.L<sup>-1</sup>), piridoxina (0,5 mg.L<sup>-1</sup>), glicina (2,0 mg.L<sup>-1</sup>). Como agente geleificante utilizou-se ágar (6 g.L<sup>-1</sup>) e como regulador de crescimento foi usada a benzilaminopurina (0,8 mg de BAP. L<sup>-1</sup>). Os tratamentos constituíram-se de explantes inoculados com os isolados EEL0210, EEL16110, EEL16010B, EEL37810 e EEL16010B crescidos em meio AML líquido com triptofano. Após determinação da concentração de AIA produzida, foi retirada alíquota do meio de cultura correspondente a concentração final de 1 mg de AIA.L<sup>-1</sup>. Esta alíquota foi adicionada ao meio de cultura antes e após a esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após a esterilização o caldo foi adicionado ao meio de cultura estéril a temperatura de 50 C para evitar a morte dos microrganismos. Desse modo, foram utilizados meios de cultura para enraizamento com rizóbios mortos (E) e vivos (V). Além, disso foram utilizados dois tratamentos controle sem inoculação: um com adição de 1 mg de AIA sintético.L<sup>-1</sup> e outro sem AIA. O delineamento utilizado foi completamente casualizado com seis repetições de cinco plantas.

O experimento de aclimatização utilizou explantes enraizados *in vitro* em meio MS modificado por Giacobbo et al. (2003) sem benzilaminopurina e com adição de 1 mg de AIA.L<sup>-1</sup>. De maneira semelhante ao experimento anterior, os tratamentos foram inoculados com a suspensão diluída dos isolados EEL0210, EEL16110, EEL16010B, EEL37810 e EEL16010B até a concentração de 1 mg de AIA.L<sup>-1</sup> no substrato. O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso com cinco repetições de oito plantas.

As variáveis analisadas nos dois experimentos foram comprimento de brotos (CB), comprimento radicular (CR), número de raízes primárias (NRP), número de raízes secundárias (NRP), número total de raízes (NTR), biomassa fresca da parte aérea (BFPA) e biomassa fresca da raiz (BFR). No experimento de enraizamento *in vitro* foi determinada a taxa de enraizamento e no de aclimatização a taxa de sobrevivência dos explantes do porta-enxerto micropropagado de macieira Marubakaido. O comprimento radicular foi mensurado utilizando-se o método de Tennant (1975), com uma placa de petri dividida em quadrículas de 1 cm. As raízes foram dispostas ao acaso na placa e contados o número de interseções com as linhas das quadrículas. O valor obtido foi aplicado na fórmula:

$CR = N \times L \times 11/14$  , onde CR= comprimento radicular em cm; N= número de interseções; L= comprimento lateral da quadrícula.

Os dados obtidos na avaliação da produção de AIA, no experimento de enraizamento *in vitro* e no de aclimatização foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

## **Resultados e Discussão**

Os isolados EEL16110, EEL0210, EEL37810 e EEL16010B apresentaram maior produção de AIA *in vitro* com valores entre 38,4 a 50,6 mg de AIA.mL<sup>-1</sup> e foram selecionados para os experimentos de enraizamento *in vitro* e aclimatização . A produção de AIA dos isolados EEL44910, EEL36010, EEL0510, EEL34210, EEL37910, EEL44810, EEL14910, EEL36210, EEL0410 e EEL38110 foi intermediária, sendo superior a dos isolados EEL36110, EEL0310, EEL34310, EEL34110, EEL34010 e EEL14610. A produção de AIA

pelos isolados EEL36110, EEL0310 e EEL34310 variou entre 18,9 e 24,1 mg AIA.mL<sup>-1</sup> e foi maior que a dos isolados EEL34110, EEL34010 e EEL14610 (Figura 1). A produção de AIA por rizóbios também foi observada em isolados de rizóbios de soja com uma variação entre 1,0 a 130,3 mg AIA. mL<sup>-1</sup> (Chen et al., 2002).

Os explantes que foram inoculados com o caldo contendo os isolados EEL37810 (E e V), EEL16010B (E e V), EEL0210 (E), EEL16110 (E) e os que receberam AIA sintético apresentaram maiores taxas de enraizamento *in vitro* do que os demais tratamentos (Figura 2). As taxas de enraizamento foram similares às aquelas encontradas por Lima-Nishimura et al.(2003), que utilizaram diferentes doses de ácido indolbutírico.

Os explantes inoculados com os isolados de rizóbios e os que receberam AIA sintético *in vitro* não apresentaram aumento no comprimento dos brotos do porta-enxerto de macieira cv Marubakaido (Tabela 1). Provavelmente, isso ocorreu porque o alongamento vegetal é decorrente da ação de giberilinas (Teiz & Zeiger, 2009) e, talvez, as bactérias estudadas não tivessem a capacidade para produzir tal regulador de crescimento. Esse efeito ocorreu porque o mecanismo de regulação na produção de AIA em bactérias não envolve o regulador de crescimento giberilina. A regulação na produção de AIA em rizobactérias ocorre através das moléculas sinalizadoras acil-homoserina-lactonas (AHLs), que alteram a expressão dos genes de auxinas na planta-hospedeira e aumentam seu conteúdo endógeno (Mathesius et al., 2003). Dessa forma, ocorre uma mudança no balanço hormonal, que altera o desenvolvimento radicular (Mathesius, 2010).

Os isolados EEL16010B (E e V), EEL37810 (E e V), EEL16110 (E), EEL0210 (E) induziram a produção de número de raízes primárias *in vitro* no porta-enxerto cv. Marubakaido semelhante ao AIA sintético. Já a indução na produção de raízes secundárias *in vitro* não foi significativa. Por sua vez, os isolados EEL16010B (E e V), EEL37810 (V), EEL16110 (E), EEL0210 (E) e AIA sintético induziram a produção de um número maior de raízes *in vitro* do que os demais tratamentos testados. O número de raízes obtidas foi similar ao observado por Martins e Pedrotti (2001) no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira Marubakaido e superior aos obtidos por Lima-Nishimura et al. (2003) com diferentes doses de AIB. O menor número de raízes induzidas pelos isolados e EEL0210 (V) e EEL16110 (V) pode ter ocorrido devido à interação com o genótipo de macieira micropropagado (Dodd et al., 2010). Essa interação pode levar a diminuição ou aumento do crescimento radicular (Remans et al., 2008). Nesse caso, os isolados vivos EEL16110 e EEL0210 não promoveram crescimento, pois levaram a diminuição do desenvolvimento radicular do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido.

Os explantes inoculados com o caldo contendo células do isolado EEL16010B (tanto esterilizado como vivas) produziram raízes mais compridas do que os inoculados com os demais rizóbios estudados (Tabela 1). Esse resultado foi muito superior aos valores obtidos nos trabalhos de enraizamento *in vitro* utilizando auxinas sintéticas de Martins e Pedrotti (2001) e Lima-Nishimura et al.(2003) para o porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido, onde o comprimento radicular por planta foi de 3,4 e 1,9 cm de comprimento, respectivamente. Efeito similar foi obtido por meio da inoculação com

*Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens* e *Piriformospora indica* na micropropagação de oliveiras e da planta medicinal *Chlorophytum borivillianum* (Peyvandi et al., 2010; Gosal et al., 2010).

Os isolados EEL0210 (E e V) e EEL16110 (V) induziram a uma menor produção de biomassa fresca da parte aérea, provavelmente porque proporcionaram menor crescimento radicular do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido. O isolado EEL16010B (E e V) e o AIA sintético induziram uma maior produção de biomassa fresca de raízes do que os demais (Tabela 1). Esse efeito positivo na produção da biomassa fresca de raízes também foi observado na micropropagação de *Phoitinia* inoculada com diferentes espécies de *Azospirillum* (Larraburu et al., 2007).

Os isolados testados no experimento de aclimatização não promoveram o crescimento dos explantes do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido, pois os resultados obtidos não apresentaram diferenças entre si para taxa de sobrevivência, comprimento de brotos, número de raízes primárias, número de raízes secundárias, comprimento estimado de raízes, biomassa fresca da parte aérea e biomassa fresca de raízes.

Os resultados demonstraram que as substâncias fitoestimuladoras estavam presentes e ativas no caldo em que ocorreu o crescimento do isolado EEL1610B mesmo após o processo de autoclavagem. Isso indica que estas resistiram ao tratamento térmico e que podem se constituir em fonte de fatores de crescimento para serem usados para o enraizamento de porta enxertos micropropagados.

O estímulo do crescimento radicular pelo isolados foi decorrente da interação entre o genótipo da planta e do microrganismo. Essa interação



regula a resposta da planta a auxina (AIA) e a sua produção pelo microrganismo. Dessa forma o crescimento foi induzido por alterações no alongamento e arquitetura radicular do porta-enxerto de macieira micropropagado cv. Marubakaido (Dodd et al., 2010).

## **Conclusões**

1. O isolado EEL1610B pode ser utilizado na indução do enraizamento *in vitro* do porta enxerto cv. Marubakaido.
2. Os resultados mostraram a utilização de caldo contendo AIA produzido pelo rizóbio EEL1610B em substituição ao ácido indolacético sintético no enraizamento *in vitro* do porta enxerto de macieira cv. Marubakaido

## **Agradecimentos**

Ao apoio financeiro da Epagri e Embrapa no desenvolvimento deste trabalho.

## **Referências**

ABREU, M, F.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação da macieira. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.31, p.100-108, 2003.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.231-237, 2002.

CAVALLAZZI, J. R. P. ; KLAUBERG FILHO, O. ; STURMER, S. L. ; RYGIEWICZ, P. T. ; MENDONÇA, M. M. Screening and selecting arbuscular

mycorrhizal fungi for inoculating micropropagated apple rootstocks in acid soils.. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 117-129, 2007.

DODD, I.C.; ZINOVKINA, N. Y.; SAFRONOVA, V. I.; BELIMOV, A. A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals of Applied Biology**, 157 (3):361-379, 2010.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: George, E. F.; Hall, M. A.; De Klerk, G. J., Editors, . **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht, Netherlands: Springer, p.29-64, 2008

GIACOBBO, C. L.; GOMES, F. R. C.; KROTH, L. L.; CONCEIÇÃO, M. K.; FORTES, G. R. de L. multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* willd, borkh) com diferentes níveis de benzilaminopurina e ácido naftalenacético. **R. bras. Agrobiência**, v. 9, n. 1, p. 31-33, jan-mar, 2003.

GOSAL, S. K.; KARLUPIA, A.; GOSAL, S. S.; CHHIBA, I. M.; VARMA, A. Biotization with *Piriformospora indica* and *Pseudomonas fluorescens* improves survival rate, nutrient acquisition, field performance and saponine content of micropropagated *Chlorophytum* sp. **Indian Journal of Biotechnology**, v.9, p.289-297, 2010.

HAZARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stamford, v.85, n.12, p.1704-1712, 2003.

IBGE. Produção agrícola municipal. [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). 2010.

LIMA-NISHIMURA, N.; QUOIRIN, M.; NADDAF, Y. G.; WILHELM, H. M.; RIBAS, L. L. F; SIERAKOWSKI, M.-R.. A xyloglucan from seeds of the native Brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of Marubakaido and Jonagored apples. **Plant Cell Reports**, v.21, p.402-407, 2003.

LARRABURU, E. E.; CARLETTI, S.M.; CÁCERES, E. A. R.; LLORENTE, B. E. Micropropagation of photinia employing rhizobacteria to promote root development. **Plant Cell Reports**, v.26, p.711-717, 2007.

LOCATELLI, L. M.; LOVATO, P. E. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de macieira micropropagados. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.37, n.2, p.177-184, 2002.

MARTINS, L.; PEDROTTI, E.L. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* dos porta-enxertos de macieira M7, M9 e Marubakaido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1., p.11-16, 2001.

MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiology plant**, Waterbury, v.15, p. 473-497, 1962.

MATHESIUS, U.; MULDER, S.; GAO, M.; TEPLITSKI, M.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; ROLFE, B. G.; BAUER, W. D. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. **PNAS**, v.100, n.3, pp.1444-1449, 2003.

MATHESIUS, U. The role of auxin in root-symbiont and root-pathogen interactions – from development to defense. **Progress in Botany**, v. 71, pp. 185-210, 2010.

NOVAK, J. Benefits of *in vitro* “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.34, p.122-130, 1998.

PEYVANDI, M.; FARAHANI, F.; MAZINANI, M. H.; NOORMOHAMADI, Z.; ATAIL, S.; ASGHARZADE, A. Pseudomonas fluorescent and its ability to promote root formation of olive microshoots. **International Journal of Plant Production**, v.4, n.1, pp. 63-66, 2010.

REMANS, R.; BEEBE, S.; BLAIR, M.; MANRIQUE, G.; TOVAR, E.; RAO, I.; CROONENBORGH, A.; TORRES-GUTIERREZ, R.; EL-HOWEITY, M.; MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, 302:149–161, 2008.

ROGALSKI, M.; MORAES, L.K.A. de.; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M.P.; SILVA, A.L. Aclimatização de portaenxertos de *Prunus* sp. micropropagados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 279-281, 2003.

TEIZ, I.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4ª. Ed., Ed. Artmed, Porto Alegre, RS, Brasil, 848 p., 2009.

TENNANT, D.A. Test of a modified line intersect method of estimating root length. **Journal of Ecology**, Oxford, v.63, n.3, p.995-1001, 1975.

VILLALOBOS-AMADOR, E.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, G.; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. Organogenesis and *Agrobacterium rhizogenes*-induced rooting *Pinus maximartinezii* Rzedowski and *P. pineceana* Gordon. **Plant Cell Reports**, v.20, pp. 779-785, 2002.

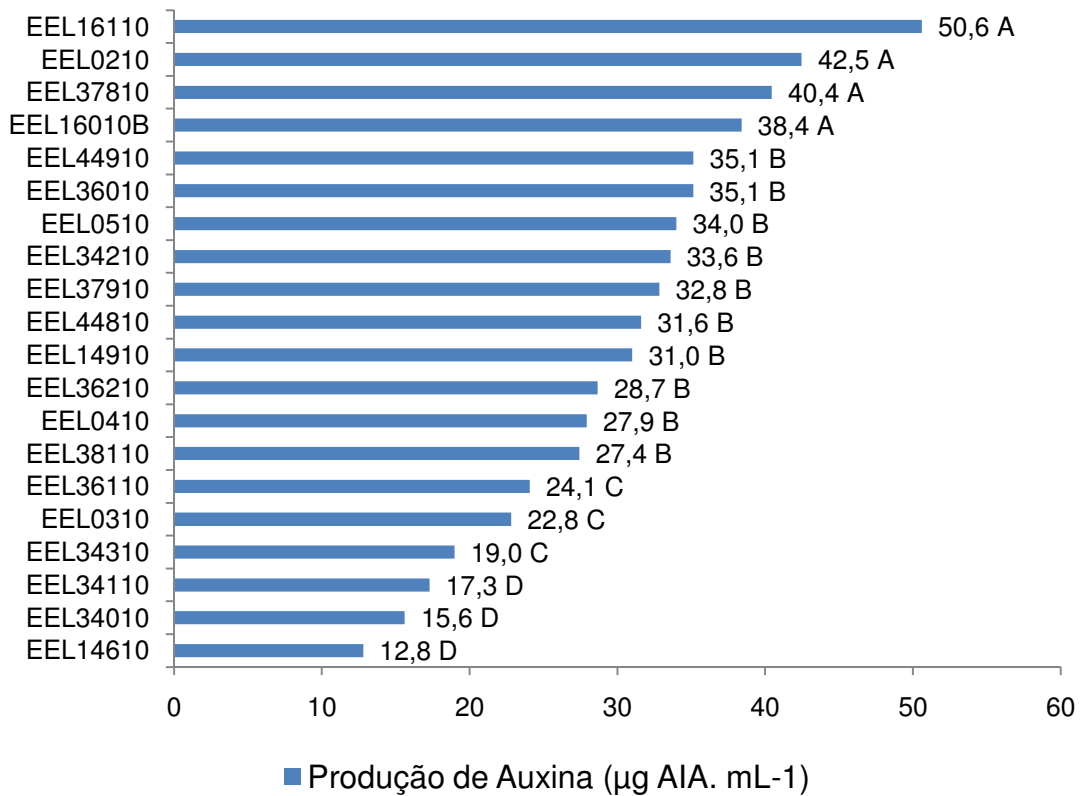


Figura 1 – Produção de AIA por isolados de bactérias de nódulos de *A. latifolia* (tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )).

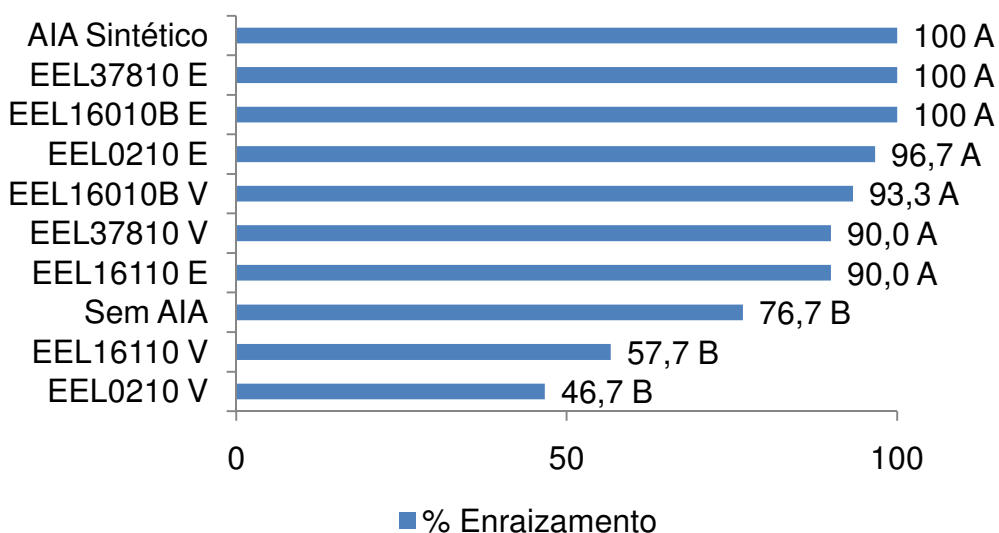


Figura 2 – Taxa de enraizamento do porta-enxerto de macieira micropropagado cv. Marubakaido utilizando rizóbios vivos (V) e mortos (E) de nódulos de *A. latifolia* (tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Qui-quadrado ( $p < 0,05$ )).

Tabela 1– Comprimento de brotos (CB), comprimento radicular (CR), número de raízes primárias (NPR), número de raízes secundárias (NRS), número total de raízes (NTR), biomassa fresca da parte aérea (BFPA) e de raízes (BFR) do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido no enraizamento *in vitro*

Tratamentos	CB	CR	NRP	NRS	NTR	BFPA	BFR
	---(cm/planta)--		----- (N°/planta)-----		----- (mg/planta)-----		
Controle com AIA sintético	2,4 a	10,6 b	5,3 a	3,9 a	9,2 a	88,3 a	31,4 a
Rizóbios mortos							
EEL0210 <sup>E</sup>	2,4 a	7,4 c	4,4 a	4,0 a	8,4 a	72,0 b	19,1 b
EEL16110 <sup>E</sup>	2,5 a	9,0 b	3,6 a	4,2 a	7,7 a	84,7 a	21,8 b
EEL16010B <sup>E</sup>	2,9 a	13,6 a	5,4 a	5,4 a	9,8 a	94,3 a	32,7 a
EEL37810 <sup>E</sup>	2,5 a	9,4 b	4,3 a	2,9 a	7,1 b	89,3 a	18,1 b
Rizóbios vivos							
EEL0210 <sup>V</sup>	2,7 a	3,3 c	1,1 b	2,7 a	3,9 b	58,2 b	7,6 c
EEL16110 <sup>V</sup>	2,6 a	5,7 c	1,9 b	3,2 a	5,1 b	64,1 b	11,0 c
EEL16010B <sup>V</sup>	2,6 a	13,1 a	4,8 a	6,1 a	10,9 a	100,6 a	27,1 a
EEL37810 <sup>V</sup>	2,5 a	10,3 b	4,2 a	4,8 a	9,0 a	91,9 a	17,6 b
Controle Sem AIA	2,6 a	6,7 b	3,0 b	3,6 a	6,6 b	85,7 a	13,0 c

\* médias com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

## 4. DISCUSSÃO GERAL

No primeiro estudo os resultados demonstraram que os rizóbios de nódulos radiculares de *A. latifolia* promoveram o crescimento nas diferentes espécies de *Adesmia*. Foi possível verificar efeitos de fitoestimulação por ácido indolacético (AIA) foram maiores nas raízes das plantas inoculadas. Ficou evidente que os efeitos variaram em função da interação entre os genótipos das plantas e dos microrganismos (Dodd et al., 2010). Essa interação ocorreu provavelmente em decorrência das respostas a regulação das auxinas nas plantas pelos microrganismos. Essa regulação ocorre através de respostas da planta hospedeira a moléculas sinalizadoras como as acil-homoserinas-lactonas das bactérias (Mathesius, 2010). O efeito dessas moléculas promove um efeito significativo no desenvolvimento crescimento radicular e altera o equilíbrio de auxinas na planta (Ortiz-Castro et al., 2008; Mathesius, 2010). Os efeitos observados na indução do crescimento radicular por rizóbios produtores de AIA em *Adesmia* também foram observados em outras culturas como o arroz (Yanni et al., 2001). Nesse trabalho os resultados salientaram que a seleção de rizóbios para a promoção de crescimento em leguminosas deve considerar a sua utilização em espécies do mesmo gênero. E também deve-se considerar a promoção de crescimento por rizóbios por fitoestimulação e não somente como biofertilizantes.

No segundo estudo os resultados demonstraram que os rizóbios de *A. latifolia* apresentaram características fenotípicas dos gêneros *Mesorhizobium* e *Rhizobium*. No entanto, a principal resultado obtido nesse estudo foi a

comprovação da ineficiência da estirpe SEMIA6437 na produção de inoculantes para *A. latifolia*. Outro fator importante foi a seleção de isolados de rizóbios com maior eficiência que essa estirpe e que podem ser utilizados como seus substitutos na produção de inoculantes. Também neste trabalho foi comprovado que nenhum isolado selecionado e a estirpe recomendada induziram a uma maior produção de massa seca da parte aérea do que o tratamento com nitrogênio. A eficiência relativa dos melhores isolados variou entre 31 a 37%. Esse valor foi similar ao obtido em trabalhos de seleção de rizóbios para *A. latifolia* por Scheffer-Basso et al. (2001) com 37 % e inferior ao observado por Voss et al. (2000) com 55 %. Os valores obtidos neste e em outros trabalhos de seleção de rizóbio indicaram que nenhum isolado testado foi eficiente dentro dos critérios de Mullen et al. (1998), onde a eficiência necessária para recomendação de uma estirpe é de no mínimo 80%. Assim, o trabalho indicou a necessidade de um programa de seleção de rizóbios eficientes na indução de crescimento de *A. latifolia* como biofertilizantes e que possam eliminar a necessidade de fertilização no cultivo da espécie.

No terceiro trabalho os resultados obtidos demonstraram que os rizóbios de nódulos de *A. latifolia* promoveram o crescimento *in vitro* no enraizamento do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido. A indução do enraizamento *in vitro* proporcionado por rizóbios foi similar ao observado nas culturas da batata e tomate inoculadas com isolados de *Pseudomonas* (Liu et al., 1995; Novak et al., 1999). Esses rizóbios podem ser utilizados na micropropagação de plantas como substitutos de auxinas sintéticas. A substituição de auxinas sintéticas na micropropagação foi testada com sucesso também na micropropagação de espécies maderáveis como a



sequóia e *Rubia tinctorum* inoculadas com *Agrobacterium rhizogenes* (Mihaljevic et al., 1999; Ercan et al., 1999).

Os resultados obtidos nos três trabalhos destacaram a possibilidade de utilização de rizóbios como promotores de crescimento por mecanismos de biofertilização e fitoestimulação. Também permitiram visualizar alternativas de uso dos rizóbios em leguminosas do mesmo gênero, comprovação de sua eficiência e utilização em não leguminosas.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

1. Rizóbios produtores de AIA isolados de *Adesmia latifolia* podem promover o crescimento de plântulas de outras espécies do mesmo gênero, mesmo sem formar simbiose.
2. As características fenotípicas da maioria dos rizóbios estudados são comuns nos gêneros *Mesorhizobium* e *Rhizobium*, sendo que os isolados EEL47310, EEL45910, EEL37910 e EEL45810 são do gênero *Mesorhizobium*.
3. Os rizóbios produtores de AIA estimularam o desenvolvimento das raízes primárias, número de raízes secundárias, produção de biomassa fresca de raízes e parte aérea de plântulas de *Adesmia*.
4. Todos os rizóbios estudados apresentam baixa eficiência simbiótica na fixação de nitrogênio, inclusive a estirpe SEMIA 6437, porém os isolados EEL47310, EEL45910, EEL37910 e EEL45810 são mais eficientes do que a estirpe SEMIA6437 nas condições de realização deste trabalho.
5. A estirpe SEMIA 6437 não se mostra eficiente e deve ser retirada da recomendação para produção de inoculantes para *Adesmia*.
6. O isolado EEL16010B pode ser utilizado na indução do enraizamento *in vitro* do porta-enxerto cv. Marubakaido.
7. É viável a utilização de caldo contendo AIA produzido pelo rizóbio EEL16010B em substituição ao ácido indolacético sintético no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M, F.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação da macieira. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.31, p.100-108, 2003.

ADDINSOFT. XLStat versão 5.02. 2010.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

ARORA, N. K.; KANG, S. C.; MAHESHWARI, D.K. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. **Current Science**, v. 81, n. 6, 2001.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.231-237, 2002.

BIANCO, C.; DEFEZ, R. *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 11, pp. 3097–3107, 2009.

BROSE, E. Seleção de rizobio tolerante a Al e a baixo pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n.1, p. 126-135, 1991.

BRASIL. Portaria n° 325, de 14 de setembro de 2009. **Diário Oficial da União**, 178, p.4-9. 2009.

BROSE, E. Seleção de rizobio para trevo branco em solo ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 29:281-285, 1994.

CAMERINI, S.; SENATORE, B.; LONARDO, E.; IMPERLINI, E.; BIANCO, C.; MOSCHETTI, G.; ROTINO, G. L.; CAMPION, B.; DEFEZ, R. Introduction of a novel pathway for IAA biosynthesis to rhizobia alters vetch root nodule development. **Arch Microbiol**, v.190, pp.67–77, 2008.

CAVALLAZZI, J. R. P. ; KLAUBERG FILHO, O. ; STURMER, S. L. ; RYGIEWICZ, P. T. ; MENDONÇA, M. M. Screening and selecting arbuscular mycorrhizal fungi for inoculating micropropagated apple rootstocks in acid soils.. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 117-129, 2007.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum**, v.32, n.1, pp.161-169, 2010.

CHEN, L. S.; FIGUEREDO, A.; VILLANI, H.; MICHAJLUK, J.; HUNGRIA, M. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. **Biol Fertil Soils**, v. 35, pp.448–457, 2002.

CHI, F.; SHEN, S-H.; CHENG, H-P.; JING, Y-X. YANNI, Y. G.; DAZZO, F. B. Ascending Migration of Endophytic Rhizobia, from Roots to Leaves, inside Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p. 7271–7278, 2005.

CLARRIDGE III, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.4, p. 840-862, 2004

DATE, R. A.; NORRIS, D. O. *Rhizobium* screening of *Stylosanthes* species for effectiveness in nitrogen fixation. **Australian Journal Agricultural Research**, v.30, p. 85-104, 1979.

DAR, G.H.; ZAGAR, M.Y.; BLEIGHT, G.M. Biocontrol of *Fusarium* root rot in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. **Microbial Ecology**, v.34, pp.74–80, 1997.

DAZZO, F.B.; TRUCHET, G.L.; HOLLINGSWORTH, R.I.; HRABAK, E.M.; PANKRATZ, H.S. et al. *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection thread development in white clover root hairs. **J. Bacteriol.**, v.173, pp.5371–5384, 1991.

DODD, I.C.; ZINOVKINA, N. Y.; SAFRONOVA, V. I.; BELIMOV, A. A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals of Applied Biology**, 157 (3):361-379, 2010.

ELBADRY, M., TAHA, R.M., ELDOUGDOUG, K.A., GAMAL ELDIN, H. Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.113, pp.247–251, 2006.

EHTESHAMUL-HAQUE, S. AND GHAFFAR, A. Use of Rhizobia in the Control of Root Rot Diseases of Sunflower, Okra, Soybean and Mungbean. **Journal of Phytopathology**, 138: 157–163, 1993.

ERCAN, A. G.; TASKIN, K. M.; TURGUT, K.; YUCE, S. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. populations grown in Turkey. **Tr. J. of Botany**, v. 23, pp.373-377, 1999.

FUHRMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean Bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.224-229, 1990.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: George, E. F.; Hall, M. A.; De Klerk, G. J., Editors, . **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht, Netherlands: Springer, p.29-64, 2008

GIACOBBO, C. L.; GOMES, F. R. C.; KROTH, L. L.; CONCEIÇÃO, M. K.; FORTES, G. R. de L. multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* willd, borkh) com diferentes níveis de benzilaminopurina e ácido naftalenacético. **R. bras. Agrociência**, v. 9, n. 1, p. 31-33, jan-mar, 2003.

GONTANG, E. A.; FENICAL, W.; JENSEN P. R. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, 73, 3272-3282, 2007.

GOSAL, S. K.; KARLUPIA, A.; GOSAL, S. S.; CHHIBA, I. M.; VARMA, A. Biotization with *Piriformospora indica* and *Pseudomonas fluorescens* improves survival rate, nutrient acquisition, field performance and saponine content of micropropagated *Chlorophytum* sp. **Indian Journal of Biotechnology**, v.9, p.289-297, 2010.

GRANADA, C. E. **Seleção de rizóbios e estudo da compatibilidade simbiótica em *Desmodium incanum* e *Lotus* spp.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e Ambiental, pp. 70, 2010.

HAFEEZ, F. Y., SAFDAR, M. E., CHAUDHRY, A. U., MALIK, K. A. Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 44:617-622, 2004.

HAZARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stamford, v.85, n.12, p.1704-1712, 2003.

HEATH, K. D.; TIFFIN, P. Stabilizing mechanisms in a legume–rhizobium mutualism. **Evolution**, v.63, n.3, pp. 652–662, 2009.

HILALI, .; PRÉVOST, D.; BROUGHTON, W. J.; ANTOUN, H. Effets de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, n.6, p. 590-593, 2001.

HUANG, H.C.; ERICKSON, R.S.; HSIEH, T.F. Control of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) by seed treatment with *Rhizobium leguminosarum*. **Crop Protection**, v.26, pp. 1055–1061, 2007<sup>a</sup>.

HUANG, H.C.; ERICKSON, R. S. Effect of Seed Treatment with *Rhizobium leguminosarum* on *Pythium* Damping-off, Seedling Height, Root Nodulation, Root Biomass, Shoot Biomass, and Seed Yield of Pea and Lentil. **Journal of Phytopathology**, v.155, n.1, pp.31-37, 2007<sup>b</sup>.

HUNGRIA, M. Coleta de Nódulos e Isolamento de Rizóbios. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S.(Ed.). **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. EMBRAPA: Brasília, pp.157-170,1994.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in south America. **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress**, v.4, p.25-42, 2005.

IBGE. Produção agrícola municipal. [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). 2010.

IMHOFF, J. F.; CAUMETTE, P. Recommended standards for the description of new species of anoxygenic phototrophic bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, pp. 1415-1421, 2004.

LARRABURU, E. E.; CARLETTI, S.M.; CÁCERES, E. A. R.; LLORENTE, B. E. Micropropagation of photinia employing rhizobacteria to promote root development. **Plant Cell Reports**, v.26, p.711-717, 2007.

LIMA-NISHIMURA, N.; QUOIRIN, M.; NADDAF, Y. G.; WILHELM, H. M.; RIBAS, L. L. F.; SIERAKOWSKI, M.-R.. A xyloglucan from seeds of the native Brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of Marubakaido and Jonagored apples. **Plant Cell Reports**, v.21, p.402-407, 2003.

LIU, Z.; PILLAY, V.; NOWAK, J. In vitro culture of watermelon and cantaloupe with and without beneficial bacterium. **Acta Horticulturae (ISHS)**, v. 402, pp.58-60, 1995.

LOCATELLI, L. M.; LOVATO, P. E. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de macieira micropropagados. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.37, n.2, p.177-184, 2002. LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, pp.541–556, 2009.

MARTINS, L.; PEDROTTI, E.L. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* dos porta-enxertos de macieira M7, M9 e Marubakaido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1., p.11-16, 2001.

MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G.. *Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "rizóbio"*. Seropédica. Embrapa Agrobiologia. 14p. (Embrapa-CNPAB. **Comunicado Técnico** no 19), 1997.



MATHESIUS, U.; MULDER, S.; GAO, M.; TEPLITSKI, M.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; ROLFE, B. G.; BAUER, W. D. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. **PNAS**, v.100, n.3, pp.1444-1449, 2003.

MATHESIUS, U. The role of auxin in root-symbiont and root-pathogen interactions – from development to defense. **Progress in Botany**, v. 71, pp. 185-210, 2010.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Syst. Appl. Microbiol.**, 29:315-332, 2006.

MIHALJEVIC, S.; KATAVIC, V.; JELASKA, S. Root formation in micropropagated shoots of *Sequoia sempervirens* using *Agrobacterium*. **Plant Science**, v.141. , pp. 73-80, 1999.

MIOTTO, S.T.S.; LEITÃO FILHO, H.F. Leguminosae-Faboideae- Gênero *Adesmia* DC. **Boletim do Instituto de Biociências**, n.52, p.1-157, 1993.

MULLEN, B. F.; FRANK, V.E.; DATE, R. A. Specificity of rhizobial strains for effective N<sub>2</sub> fixation in the genus *Leucaena*. **Tropical Grasslands**, v.32, pp.110-117, 1995.

MUNIZ, A. W. ; DALLA COSTA, M. ; SÁ, E. L. S. ; OLIVEIRA, V. A. F. .Selection of rhizobia strains for *Adesmia latifolia*. In: **1st International INCT Symposium on Biological Nitrogen Fixation**, Curitiba-PR. , Único. p. 40-40, 2009.

MUNIZ, A. W. ; BROSE, Edegar ; SÁ, E. L. S. *In Vitro* Selection of Rhizobia Strains for *Adesmia tristis* Vogel. In: **1st International INCT Symposium on Biological Nitrogen Fixation**, Curitiba-PR. v. Único. p. 39-39, 2009.

MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiology plant**, Waterbury, v.15, p. 473-497, 1962.

NORRIS, D.O., DATE, R.A. Legume bacteriology. In: SHAW, NJL, BRYAN, W.W. ed.. **Tropical pasture research, principles and methods**. Hurley: CAB, pp. 234-274, 1976.

NOVAK, J. Benefits of in vitro "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.34, p.122-130, 1998.

ORTIZ-CASTRO, R.; MARTINEZ-TRUJILLO, M.; LOPEZ-BUCIO, J.N-acyl-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Environ**, v.31, pp.1497–1509, 2008.

OSÓRIO FILHO, B. D. **Rizóbios eficientes em lotus como promotores de crescimento em arroz irrigado**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, *Tese de Doutorado*, 114 p., 2009.

PEYVANDI, M.; FARAHANI, F.; MAZINANI, M. H.; NOORMOHAMADI, Z.; ATAIL, S.; ASGHARZADE, A. Pseudomonas fluorescent and its ability to promote root formation of olive microshoots. **International Journal of Plant Production**, v.4, n.1, pp. 63-66, 2010.

PUPPO, A.; RIGAUD, J. Cytokinins and morphological aspects of French-bean roots in the presence of *Rhizobium*. **Physiol. Plant.**, v.42, pp. 202-206, 1978.

REMANS, R.; BEEBE, S.; BLAIR, M.; MANRIQUE, G.; TOVAR, E.; RAO, I.; CROONENBORGH, A.; TORRES-GUTIERREZ, R.; EL-HOWEITY, M.; MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, 302:149–161, 2008.

REUHS, B.L.; GELLER, D.P.; KIM J.S.; FOX, J.E.; KOLLI, V.S.; PUEPPKE, S.G. *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, pp.4930–38, 1998.

ROGALSKI, M.; MORAES, L.K.A. de.; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M.P.; SILVA, A.L. Aclimatização de portaenxertos de *Prunus* sp. micropropagados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 279-281, 2003.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Diazotrophic Bacterial Endophytes in *Gramineae* and Other Plants. **Microbiol Monogr.**,v.8,pp. 273–302, 2009.

SANTILLANA, N.; FREIRE, J. R. J.; de SÁ, E. L. S.; SATO, M. Avaliação de estirpes de rizóbio para a produção de inoculantes para trevo vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 22:231-237, 1998.

SCHEFFER-BASSO, S.M.; CARNEIRO, C. M. ; VOSS, M. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio em *Adesmia araujo* Bur.. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 6, n. 1, p. 16-18, 2000.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; JACQUES, A. V. A.; DALL'AGNOL, M.; RIBOLDI, J.; CASTRO, S. M. J. Disponibilidade e Valor Nutritivo de Forragem de

Leguminosas Nativas (*Adesmia* DC.) e Exóticas (*Lotus* L.). **Revista Brasileira de zootecnia**, v.30, n.3, p.975-982, 2001.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; VENDRUSCOLO, M. C.; CECCHETTI, D.. Desempenho de leguminosas nativas (*Adesmia*) e exóticas (*Lotus*, *Trifolium*), em função do estágio fenológico no primeiro corte **Revista Brasileira de zootecnia**,v.34, n.6, p.1871-1880, 2005.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alfaca. **Ciência Rural**, v.38, n.3, pp.658-664, 2008.

SIMPFENDORFER, S.; HARDEN, T.J.; MURRY, G.M. The *in vitro* inhibition of *Phytophthora clandestina* by some rhizobia and the possible role of *Rhizobium trifolii* in biological control of Phytophthora root rot of subterranean clover. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.50, pp.1469–1474, 1999.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M .A. Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance. **Biometrics**, Vol. 30, No. 3, pp. 507-512, 1974.

SOKAL, R.R. ; SNEATH, P.H.A. Principles of Numeric Taxonomy. W.H. Freeman & Co., San Francisco and London, 359 p., 1963.

TAN, I. K .P.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes—XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 13, n. 5, p. 389-393, 1981.

TAN, Z.Y.; XU, X. D.; WANG, E. T.; GAO, J.L.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CHEN, W. X. Phylogenetic and Genetic Relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and Related Rhizobia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, pp. 874-879, 1997.

TAN, Z.Y.; KAN, F. L.; PENG, G. X.; WANG, E. T.; REINHOLD-HUREK, B.; CHEN, W. X. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, pp. 909-914, 2001.

TEIZ, I.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4ª. Ed., Ed. Artmed, Porto Alegre, RS, Brasil, 848 p., 2009.

TENNANT, D.A. Test of a modified line intersect method of estimating root length. **Journal of Ecology**, Oxford, v.63, n.3, p.995-1001, 1975.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v. 255, pp.571-586, 2003.

VILLALOBOS-AMADOR, E.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, G.; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. Organogenesis and *Agrobacterium rhizogenes*-induced rooting *Pinus maximartinezii* Rzedowski and *P. pineceana* Gordon. **Plant Cell Reports**, v.20, pp. 779-785, 2002.

VINCENT, J. M. **Manual practico de rizobiologia**. 1º ed. Buenos Aires, Argentina, Hemisferio Sur, 1975, 200p.

VOSS, M.; BROSE, E.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; JACQUES, A.V.A. Recomendação de estirpes de rizóbio para *Adesmia latifolia*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 4p.html. 1 ilustr. (Embrapa Trigo. **Comunicado Técnico Online**, 52). Disponível:[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_co52.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co52.htm)

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

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; ABD EL-FATTAH, F.K. et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Funct Plant Biol**, 28:845–870, 2001.

ZAKHIA, F., DE LAJUDIE, P. Taxonomy of Rhizobia. Minireview. **Agronomie**, v.21, pp. 569–576, 2001.

ZYMORESEARCH. ZR Fungal/ Bacterial DNA midprep. **Instruction Manual**, pp.1-7, 2010.

## 7. RESUMO BIOGRÁFICO

Aleksander Westphal Muniz nasceu em Lages, Santa Catarina, Brasil em 15 de agosto de 1971. É filho de Célio Nelcy Moraes Muniz e Dalva Westphal Muniz. Em 1991 ingressou no curso de agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina. Durante a graduação no período de 1992 a 1993 realizou estágio extracurricular centro de processamento de dados e documentos do Banco do Brasil. De 1994 a 1997 foi bolsista de iniciação científica do laboratório de microbiologia e parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Recebeu o título de Engenheiro Agrônomo em fevereiro de 1998. De março de 1998 a dezembro de 1999 prestou serviços na elaboração de projetos de reflorestamento de pinus e corte seletivo de araucária e foi professor substituto de biologia no Colégio Governador Ivo Silveira no município de Palhoça. Em 2000 ingressou no curso de mestrado em engenharia de produção e sistemas da Universidade Federal de Santa Catarina sob orientação do professor Dr. Francisco José Kliemann Neto na área de gestão ambiental. De março de 2000 a agosto de 2002 prestou serviços de engenheiro agrônomo na prefeitura do município de Rio do Campo, SC. De março de 2001 a agosto de 2002 foi professor das disciplinas de planejamento ambiental e ecologia humana do curso de ecologia na Universidade para o Desenvolvimento do Vale do Itajaí no município de Ituporanga, SC. Em fevereiro de 2002 foi aprovado no concurso público da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri). A partir de setembro de 2002 foi contratado pela Epagri e trabalhou como extensionista rural no município de Imbuia até abril de 2004. Em abril de 2003 recebeu o título de mestre em engenharia de produção e sistemas. Em maio de 2004 iniciou suas atividades de pesquisa no laboratório de biotecnologia da Epagri de Lages, SC. De agosto de 2004 a fevereiro de 2007 foi professor das disciplinas de anatomia e fisiologia vegetal do curso de graduação em biologia e da disciplina de microbiologia geral do curso de especialização em biotecnologia da Universidade do Planalto Catarinense em Lages. De maio de 2004 a dezembro de 2010 participou de projetos de pesquisa para seqüestro de carbono em bracatinga, avaliação biológica da qualidade do solo, desenvolvimento da agropecuária, desenvolvimento da biotecnologia para agricultura, produção de mudas de alto potencial genético e produtivo em Santa Catarina. Em 2008 foi selecionado na Epagri para realizar seu doutoramento em microbiologia e foi contemplado com uma bolsa de estudos da Embrapa. Em março de 2009 ingressou no curso de doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente na Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação do professor Enilson Luiz Saccol de Sá. Atualmente atua como pesquisador da Epagri na área de microbiologia do solo com ênfase em microrganismos promotores de crescimento vegetal.