



FERTBIO 2012

A responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola
17 a 21 de Setembro - Centro de Convenções - Maceió/Alagoas

Seleção de Bactérias Endofíticas Diazotróficas para a Fixação de Nitrogênio na Cultivar de Arroz Irrigado BRS Pampa

Maria Laura Turino Mattos⁽¹⁾; Paulo Ricardo Reis Fagundes⁽¹⁾; Walkyria Bueno Scivittaro⁽¹⁾; Antonio Lourenço Guidoni⁽¹⁾; Liane Aldrigh Galarz⁽²⁾; Morjana Luisa Pereira Facio⁽³⁾

⁽¹⁾ Pesquisador; Embrapa Clima Temperado, Rov. BR 392 km 78, Caixa Postal 403, CEP 96010-971, Pelotas-RS; maria.laura@cpact.embrapa.br, paulo.fagundes@cpact.embrapa.br, walkyria.scivittaro@cpact.embrapa.br; antonio.guidoni@cpact.embrapa.br; ⁽²⁾ Assistente; Embrapa Clima Temperado, Rov. BR 392 km 78, Caixa Postal 403, CEP 96010-971, Pelotas-RS; liane.galarz@cpact.embrapa.br; ⁽³⁾ Estudante; Faculdade de Química Ambiental - UCPel, Campus I, Rua Gonçalves Chaves, 373, CEP 96010-000, Pelotas, RS; morjana_facio@yahoo.com.br.

RESUMO – A fixação biológica de nitrogênio (FBN) assume importante papel em outras plantas que não as leguminosas, como o arroz irrigado, para a redução dos custos com a adubação nitrogenada mineral e a prática de uma agricultura de baixo carbono nas terras baixas do Bioma Pampa. O objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias endofíticas diazotróficas com potencial para a FBN na cultivar de arroz irrigado BRS Pampa. O estudo compreendeu 18 acessos endofíticos diazotróficos oriundos da Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Clima Temperado e a cultivar BRS Pampa. O experimento foi conduzido em bandejas de isopor em casa-de-vegetação, durante a safra agrícola 2010/11. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 20 tratamentos, sendo dois representantes das testemunhas positiva (com nitrogênio) e negativa (sem nitrogênio). Em cada tratamento avaliaram-se, individualmente, 12 repetições de plantas. Avaliaram-se os parâmetros comprimento da parte aérea e de raízes, diâmetro do colmo, teor de clorofila, peso fresco e seco da parte aérea e raízes. Os acessos CMM179, CMM176, CMM178, CMM174, CMM177 e CMM175 têm potencial para a fixação biológica de nitrogênio na cultivar BRS Pampa de arroz irrigado. O acesso CMM179 é associativo ao genótipo.

Palavras-chave: micro-organismo, inoculante, cereal, terras baixas, sustentabilidade

INTRODUÇÃO - A aplicação de fertilizantes nitrogenados minerais ou orgânicos tem um importante papel no aumento da produtividade da cultura de arroz irrigado. Por outro lado, o aumento do custo dos fertilizantes minerais e a lacuna entre o fornecimento e a demanda de N, considerando a possibilidade de lixiviação e escurrimto desse nutriente para o lençol freático e águas superficiais, respectivamente, está gerando preocupações ambientais entre os orizicultores e a sociedade e questionamentos quanto à rentabilidade da prática de adubação. Dessa forma, a fixação biológica de

nitrogênio (FBN) assume um importante papel em outras plantas que não as leguminosas, como o arroz irrigado, para a redução dos custos com a adubação nitrogenada e o desenvolvimento de uma agricultura de baixo carbono nas terras baixas do Bioma Pampa. Diversos estudos têm sido realizados visando avaliar a contribuição da FBN para a cultura de arroz, com o objetivo de selecionar estirpes e quantificar a FBN em genótipos de arroz (Baldani et al., 2000; Sabino et al., 2000; Campos et al., 2003; Rodrigues et al., 2006; Guimarães et al., 2010). Porém, esses estudos envolveram somente genótipos de arroz para o cultivo de arroz de sequeiro.

Bactérias endofíticas diazotróficas associativas foram isoladas de folhas, colmos e raízes da cultivar BRS-7 Taim de arroz irrigado, cultivada nas terras baixas do Rio Grande do Sul. Estirpes diazotróficas apresentaram a habilidade de crescer em meio seletivo NFb (Novo Fábio Pedrosa) (Mattos et al., 2010). Em outro estudo, foram obtidas dezenove bactérias endofíticas diazotróficas de colmos da cultivar BRS Pelota de arroz irrigado (Mattos et al., 2010). Populações de bactérias diazotróficas foram encontradas em número significativo em colmos das cultivares EEA-406 e IRGA 419 de arroz irrigado, sendo importante determinar a real contribuição das mesmas para a cultura quanto ao fornecimento de nitrogênio (Silva et al., 2007). A fixação do nitrogênio por diazotróficos endofíticos tem sido raramente comprovada. Alega-se que esses microrganismos têm uma vantagem sobre os diazotróficos associativos de raízes, uma vez que ocupam espaços mais intimamente ligados ao hospedeiro e, portanto, com maior acesso às fontes de carbono. Além disso, colonizam nichos protegidos do oxigênio, o qual é necessário à expressão e atividade da nitrogenase (Dobbelaere et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias endofíticas diazotróficas com potencial para a fixação biológica de nitrogênio na cultivar de arroz irrigado BRS Pampa, recomendada para o cultivo em terras baixas do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS - O experimento foi realizado em casa-de-vegetação, na Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS, no período de janeiro a fevereiro de 2011. Empregaram-se bandejas de isopor, com dimensões de 67,2 cm x 34,2 cm contendo 72 alvéolos, estabelecendo-se os tratamentos em duas fileiras (12 alvéolos).

Os tratamentos compreenderam a semeadura com a aplicação, desde esta ocasião, de soluções nutritivas com N ou sem N, bem como a semeadura com a aplicação de solução nutritiva sem N, mas com a inoculação com os acessos bacterianos, aplicada por ocasião do desbaste. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 20 tratamentos, sendo dois representantes das testemunhas positiva (com nitrogênio – C/N) e negativa (sem nitrogênio – S/N). Em cada tratamento avaliaram-se, individualmente, 12 repetições de plantas.

Utilizaram-se sementes da cultivar BRS Pampa, de ciclo precoce, recomendada para o cultivo nas terras baixas do Rio Grande do Sul (Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado, 2010). Inocularam-se 18 bactérias endofíticas diazotróficas (BED) oriundas da Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Clima Temperado: CMM174, CMM175, CMM176, CMM177, CMM178, CMM179, CMM180, CMM192, CMM193, CMM194, CMM171, CMM199, CMM173, CMM172, CMM201, CMM202, CMM198, CMM170, isoladas de colmos, folhas e raízes das cultivares BRS Pelota e BRS- 7 Taim (Mattos et al., 2010).

As sementes foram esterilizadas superficialmente por meio da imersão em uma solução de álcool 70% (v/v), por um minuto, seguido de uma solução de hipoclorito de sódio 2,5%, por três minutos, e lavadas dez vezes em água destilada estéril. Posteriormente, as sementes foram colocadas em placas de Petri para secar, em câmara de fluxo laminar, durante duas horas. Semearam-se três sementes em cada alvéolo de bandejas de isopor, contendo uma mistura (2:1) de areia + vermiculita estéreis. Regaram-se diariamente as sementes com 10 mL de uma solução nutritiva descrita por Vahl et al. (1993) (sem açúcares e aminoácidos em todos os tratamentos). Desbastaram-se as plantas aos sete dias após o início da emergência, mantendo-se uma planta por alvéolo. Após, inocularam-se as plantas com um volume de 0,4 mL de um cultivo (caldo NFb, 33 °C, 100 rpm, 24 h) dos acessos bacterianos com uma faixa de concentração celular de 10^5 – 10^8 UFC mL⁻¹. As plantas dos tratamentos C/N e S/N receberam o volume igual da solução nutritiva. Aos 30 dias após a emergência, avaliaram-se as seguintes variáveis: comprimento da parte aérea (cpaérea) e das raízes (craízes), diâmetro do colmo (dcolmo), índice relativo de clorofila (IRC) da folha, peso de matéria fresca da parte aérea (pfaérea) e de raízes (pfraízes), peso de matéria seca da parte aérea (pspaérea) e das raízes (psraízes).

Adotou-se um modelo de análise de variância para o delineamento inteiramente casualizado com 20 tratamentos. Além das análises univariadas envolvendo oito variáveis caracterizadoras do desenvolvimento vegetativo, pressupôs-se uma estrutura com distribuição de probabilidade conjunta multinormal 8 e realizou-se uma análise de variância multivariada (MANOVA),

envolvendo simultaneamente as oito variáveis para testar as mesmas hipóteses consideradas nas análises univariadas. Complementarmente à MANOVA, gerou-se a primeira função discriminante Canônica de Fisher, denominada nesse trabalho de desenvolvimento vegetativo multivariado (DVM), tal que: $DVM = 0.082404 * cpaeréa - 0.125243 * craízes + 0.538628 * dcolmo - 0.131923 * IRC + 35.161907 * pffolhas - 1.755914 * pfraízes - 57.469483 * pspaeréa - 241.988668 * psraízes$

Usou-se o teste de Tukey a 5%, para as comparações múltiplas de médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO - As bactérias endofíticas diazotróficas diferiram na capacidade de promover o crescimento da cultivar BRS Pampa. A função discriminante Canônica de Fischer, com base na síntese das informações contidas nas oito variáveis, permitiu formar três grupos, cujas médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% (Tabela 1). No grupo I, os maiores estímulos para o crescimento, em relação ao tratamento C/N (T1), foram obtidos com os acessos CMM179 (T8), CMM176 (T5), CMM178 (T7), CMM174 (T3), CMM177 (T6), CMM175 (T4). No grupo II, em relação ao tratamento S/N (T2), os acessos CMM180 (T9), CMM192 (T10), CMM193 (T11), CMM194 (T12), CMM171 (T13) apresentaram DVM inferiores. No grupo III, houve contribuição negativa das BED (CMM199 (T14), CMM173 (T15), CMM172 (T16), CMM201 (T17), CMM202 (T18), CMM198 (T19) e CMM170 (T20) para o crescimento da cultivar BRS Pampa. A importância de cada variável de resposta que compõe a variável DVM é avaliada por meio da correlação dessa variável com cada uma das respostas: pfaérea ($r=0,90$), cpaérea ($r=0,88$), dcolmo ($r=0,79$), IRC ($r=0,35$) e craízes ($r=-0,34$).

Verificou-se uma contribuição significativa de seis acessos CMM179, CMM176, CMM178, CMM174, CMM177, CMM175, isolados do colmo da cultivar BRS Pelota (Mattos et al., 2010), no DVM da cultivar BRS Pampa. Observaram-se, também, efeitos positivos dos acessos CMM171, CMM180, CMM192, CMM193 e CMM194 no DVM, onde as variáveis referentes às raízes indicaram que houve um estímulo ao crescimento radicular, induzido, provavelmente, pela produção de fitormônios (Sabino et al., 2000).

O acesso CMM179 endofítico diazotrófico do colmo destacou-se como associativo à cultivar, incrementando em 354,54% o DVM quando comparado ao tratamento S/N. Em colmos da cultura do arroz irrigado, são encontradas bactérias diazotróficas em número significativo, constituindo-se em um ambiente muito propício para o desenvolvimento de bactérias endofíticas diazotróficas (Silva et al., 2007).

Os efeitos estimulatórios e/ou inibitórios do crescimento de plantas de arroz variam em função da bactéria diazotrófica e do parâmetro analisado (Sabino et al., 2000). Um consórcio das bactérias *Burkholderia brasiliensis* (M130/BR11181) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z95/BR11340) promoveu o crescimento de plântulas de arroz da cultivar Guarani, indicado pelo grande acúmulo de matéria seca na parte aérea (Sabino et al., 2000).

É comum detectar grandes diferenças na FBN entre genótipos de plantas, sugerindo que o genótipo influencia a população de bactérias diazotróficas a ele associada. Além disso, o estabelecimento de um bom inóculo endofítico em plantas de arroz é dependente da relação bactéria/genótipo (Baldani et al., 2000). Em experimento de campo, conduzido em Planossolo Háptico, obteve-se respostas diferenciais de 48 genótipos de arroz irrigado à FBN. Observou-se um associativismo entre as linhagens AB10005, AB09021, AB09006, AB09002 e AB09044 e um consórcio bacteriano constituído com os acessos CMM174, CMM 175 e CMM 179, constatado pelo aumento da produção da matéria seca da parte aérea das plantas e alterações positivas no Índice Relativo de Clorofila das folhas. Isso é um indicativo de que essas BED são capazes de contribuir para a FBN (Fagundes et al., 2011). Além dos estudos das bactérias fixadoras de N₂ e do mecanismo de suas associações com plantas, é muito importante a seleção e o melhoramento genético de gramíneas, observando-se a capacidade de sustentar a FBN, além das características agrônomicas (Döbereiner, 1992).

Um número relevante de gêneros de bactérias associadas com a rizosfera do arroz tem sido reportado (*Azospirillum*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*), com destaque para contribuição da espécie *Klebsiella oxytoca*, para a fixação de N₂, beneficiando as plantas de arroz (Kennedy e Tchan, 1992). A espécie endofítica *Herbaspirillum seropedicae* associada às folhas, colmos e raízes de arroz, fixa de 31 a 54% do nitrogênio total acumulado pelo vegetal, indicando que o interior da planta foi colonizado (Baldani et al., 2000). Assim, os acessos promissores desse trabalho, CMM179, CMM176, CMM178, CMM174, CMM177, CMM175, por demonstrarem uma diversidade em função de pertencerem aos grupos de bactérias Gram-negativo e positivo, de exibirem características bioquímicas diferenciadas (Mattos et al., 2010) e por apresentarem os maiores DVM, serão identificados por métodos moleculares em continuidade à esse estudo.

CONCLUSÕES - Os acessos CMM179, CMM176, CMM178, CMM174, CMM177, CMM175 têm potencial para a fixação biológica de nitrogênio na cultivar de arroz irrigado BRS Pampa. O acesso CMM179 é associativo ao genótipo.

REFERÊNCIAS

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of Rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biol. Fertil. Soils**, 30:485-491, 2000.

CAMPOS, D. V. B de; ALEXANDER, S. R.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura de arroz sob inundação. **Agronomia**, 37:2:41-46, 2003.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant-growth-promoting effects of diazotrophs in the

rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, 22:22, 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992, p.173-179.

FAGUNDES, P. R. R.; MATTOS, M. L. T.; MAGALHÃES Jr., A. M. de **Genótipos de arroz irrigado responsáveis à fixação biológica de nitrogênio**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011. 7 p. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, No prelo).

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

KENNEDY, I. R.; TCHAN, Y.-T. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Recent advances. In: LADHA, J. K.; GEORGE, T.; BOHLOOL, B. B. (Ed.). **Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture**. Kluwer Academic Publishers, 1992, p.93-118.

MATTOS, M. L. T.; FAGUNDES, P. R. R.; SANTOS, I. B. dos; ALMEIDA, B. M. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura do arroz irrigado por inundação: parte I: bactérias endofíticas diazotróficas isoladas das cultivares BRS 7 “Taim” e BRS Pelota / Maria Laura Turino Mattos ... [et al.].** – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 22 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 303).

RODRIGUES, L. da S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesq. Agropec. Bras.**, 41:2:275-284, 2006.

SABINO, D. C. C.; FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Avaliação da capacidade das bactérias *Burkholderia brasilensis* e *Herbaspirillum seropedicae* em promover o crescimento de plântulas de arroz**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 3 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 45).

SILVA, D. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S.; VOSS, M. Bactérias diazotróficas nas folhas e colmos de plantas de arroz irrigado (*Oryza sativa*). **R. Bras. Agrocência**, 13:2:181-187, 2007.

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO (SOSBAI). **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Porto Alegre: SOSBAI, 2010. 188 p.

VAHL, L. C.; ANGHINONI, I.; VOLKWEISS, S. J. sensibilidade à toxicidade de ferro. **R. Bras. Ci. Solo**, Cinética de absorção de potássio afetada por ferro, cálcio e magnésio em genótipos de arroz de diferentes 17:269-273, 1993.

Tabela 1 – Comparação dos tratamentos inerentes às variáveis comprimentos da parte aérea (cpaérea) e raízes (craízes), diâmetro do colmo (dcolmo), índice relativo de clorofila (IRC), pesos frescos da parte aérea (pfpaérea) e raízes (pfraízes), pesos secos da parte aérea (pspaérea) e raízes (psraízes) e desenvolvimento vegetativo multivariado (DVM) da cultivar BRS Pampa de arroz irrigado com nitrogênio (C/N), sem nitrogênio (S/N) e inoculada com bactérias endofíticas diazotróficas acessos CMM.

Tratamento	Variáveis								
	cpaérea	craízes	dcolmo	IRC	pfpaérea	pfraízes	pspaérea	psraízes	DVM
	(cm)		(mm)		(g)				
C/N	38,49 a	7,09 bcd	2,96 a	27,27 a	0,282 a	0,022 de	0,052 a	0,0077 a	5,76 a
CMM179	27,18 b	6,18 cd	2,20 b	20,83 b	0,151 b	0,031 cde	0,046 ab	0,0054 ab	2,73 b
CMM176	24,52 bc	5,52 d	2,02 bc	18,87 b	0,115 bc	0,021 de	0,023 bc	0,0056 ab	1,55 bc
CMM178	23,50 bcd	6,73 bcd	1,94 bc	19,85 b	0,112 bcd	0,064 a	0,021 bc	0,0058 ab	1,03 cd
CMM174	21,03bcdefg	7,27 abcd	1,99 bc	18,92 b	0,101 bcd	0,034 bcde	0,018 c	0,0049 b	0,97 cde
CMM177	20,88bcdefg	6,97 bcd	1,93 bc	17,35 b	0,097 cd	0,045 abc	0,019 bc	0,0052 b	0,95 cde
CMM175	21,65 bcdef	7,50 abcd	2,04 bc	16,93 b	0,106 bcd	0,031 cde	0,020 bc	0,0066 ab	0,88 cde
S/N	23,84 bc	8,03 abcd	1,73 c	20,93 b	0,104 bcd	0,023 de	0,019 bc	0,0051 b	0,77 cdef
CMM180	22,33 bcde	6,87 bcd	1,93 bc	19,53 b	0,101 bcd	0,051 ab	0,019 bc	0,0057 ab	0,74 cdef
CMM192	20,03 cdefg	6,55 cd	1,88 bc	20,15 b	0,098 bcd	0,040 bcd	0,019 bc	0,0064 ab	0,44 cdefg
CMM171	22,08 bcde	7,20 bcd	1,92 bc	21,30 b	0,078 cd	0,022 de	0,029 abc	0,0052 b	0,16cdefgh
CMM194	22,03 bcde	7,20 bcd	1,92 bc	21,30 b	0,096 cd	0,039 bcd	0,020 bc	0,0065 ab	0,14cdefgh
CMM193	20,39 cdefg	6,96 bcd	1,80 c	18,22 b	0,082 cd	0,022 de	0,018 bc	0,0057 ab	0,14cdefgh
CMM170	18,26 cdefg	7,94 abcd	1,95 bc	18,91 b	0,083 cd	0,031 bcde	0,018 c	0,0064 ab	-0,15defghi
CMM202	18,09 cdefg	9,04 abcd	1,91 bc	20,94 b	0,086 cd	0,035 bcde	0,017 c	0,0066 ab	-0,49 efghi
CMM199	15,36 fg	7,23 abcd	1,70 c	18,68 b	0,061 d	0,019 e	0,027 abc	0,0056 ab	-0,63 fghi
CMM172	16,57 efg	8,80 abcd	1,73 c	19,86 b	0,069 cd	0,030 cde	0,015 c	0,0057 ab	-0,77 ghi
CMM173	17,04 defg	10,50 ab	1,80 c	20,34 b	0,070 cd	0,019 e	0,015 c	0,0062 ab	-1,01 ghi
CMM198	17,09 defg	10,99 a	1,84 bc	20,20 b	0,072 cd	0,026 cde	0,025 abc	0,0072 ab	-1,15 hi
CMM201	14,88 g	9,83 abc	1,79 c	21,03 b	0,066 cd	0,030 cde	0,013 c	0,0068 ab	-1,45 i

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).