



FERTBIO 2012

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

Inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio em arroz de sequeiro (*Oryza sativa*): respostas fisiológicas em estudos *in vitro*.

Claudia Cristina Garcia Martin Didonet⁽¹⁾; Anderson Petrônio de Brito Ferreira⁽²⁾; Maria Berenice Reynaud Steffens⁽³⁾

⁽¹⁾ Professora, pesquisadora. Curso de Farmácia; Universidade Estadual de Goiás (UEG); Br 153, Nº3105 Fazenda Barreiro do Meio-Campus Henrique Santillo, Anápolis, GO, CEP 75132-400, Caixa Postal 459.; ccdidonet@gmail.com; ⁽²⁾ Pesquisador. Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás, GO. anderson@cnpaf.embrapa.br; ⁽³⁾ Professora, pesquisadora; Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Curitiba, PR, Curitiba, PR, CEP 81531-980; Caixa postal 19046. steffens@ufpr.br.

RESUMO – O cultivo de arroz em sistema de sequeiro no Brasil corresponde a 37% da produção nacional e ocorre principalmente no Cerrado. A inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN) no cultivo de arroz pode ser uma tecnologia alternativa sustentável para sua produção. Neste trabalho foram avaliados os efeitos fisiológicos da inoculação com 3 bactérias em 5 variedades de arroz de sequeiro. Os tratamentos utilizados foram sem inoculação (controle), T1 turfa + *Azospirillum brasilense* AbV5, T2 turfa + *Herbaspirillum seropedicae* Smr1; T3 turfa + isolado L5. Os inoculantes foram preparados em veículo turfoso com as bactérias crescidas em meio líquido (1:1). As sementes foram esterilizadas superficialmente e submetidas aos tratamentos e colocadas em placas de petri com papel de filtro por 3 dias. Foi então determinado a taxa de germinação e as plântulas, pré-germinadas foram transferidas para rolo de germinação *in vitro* e foram crescidos sob luz constante a temperatura ambiente por 7 dias. Após o tempo decorrido foram avaliados os parâmetros fisiológicos (comprimento da raiz e parte aérea e número de raízes, massa seca e fresca). Pelos resultados as variedades Curinga e Maravilha se mostraram as mais responsivas e Canastra e Caiapó, foram caracterizadas como não responsiva aos inoculantes testados. Variedades de arroz e as bactérias selecionadas serão, posteriormente, utilizados em ensaios de inoculação à campo com a perspectiva de contribuir para a elaboração de inoculantes adequados a produção sustentável do arroz no Cerrado goiano.

Palavras-chave: o uso de 3 a 5 palavras, sem repetir palavras do título.

INTRODUÇÃO - O arroz (*Oryza sativa* L.) é produzido no Brasil, com produção anual de 11,6 milhões de toneladas (CONAB, 2012). No Brasil, o cultivo de arroz de sequeiro, ou de terras altas, responde em torno de 37% do total (Fornasieri Filho & Fornasieri, 2006). O arroz de sequeiro tem grande vantagem de cultivo no Cerrado brasileiro pela baixa utilização de irrigação, e de insumos, e por apresentar tolerância aos solos ácidos, presentes neste Bioma (Fornasieri Filho & Fornasieri, 2006).

O fertilizante é o insumo que representa uma parcela significativa nos custos de produção da cultura do arroz, apesar de ser industrialmente obtido de fontes não renováveis, e potencialmente poluentes ambientais (Silva & Fay, 2004). Assim a utilização de microrganismos capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) pode fornecer parte do nitrogênio necessário ou ainda promover o crescimento vegetal pela presença de fitohormônios (Silveira, 2008). A busca por bactérias endofíticas associadas naturalmente ao arroz é considerada muito promissora do ponto de vista agrônomo, com promissor impacto na cultura do arroz (Isawa et al., 2010). Os efeitos das interações planta /microrganismos podem depender de múltiplos fatores bióticos e abióticos como tipo e condições do solo, efeitos de clima e tipo de cultivo além da espécie e da variedade da planta utilizada para o cultivo em um determinado local (Krozky; Berggold & Werner, 1986).

Assim este estudo determinou as respostas fisiológicas de 10 variedades de arroz de sequeiro (*Oryza sativa* L.) inoculação utilizando bactérias fixadoras de nitrogênio em ensaios *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias

Foram utilizadas as estirpes padrões de referência *Azospirillum brasilense* (AbV5), *Herbaspirillum seropedicae* (Smr1) obtidas da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, e da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. Ainda foi utilizada o isolado L5 do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos, UEG, Anápolis, GO, que esta sendo caracterizado quanto a sistemática.

Material vegetal e preparo de inoculante

Foram utilizados neste trabalho sementes de 5 variedades de plantas de arroz (*Oryza sativa*), fornecidos pela Embrapa Arroz e Feijão: Caiapó, Maravilha, Soberana, Curinga, Canastra.

Os inoculantes utilizados para os ensaios de inoculação “*in vitro*” foram preparados utilizando solo turfoso estéril

como veículo contendo as bactérias (inóculos). Para a produção dos inóculos as bactérias foram crescidas por 2 dias em 100 mL de meio batata líquido em agitador orbital (140rpm) a temperatura de 27°C. Foi preparada uma diluição de 10⁸, e esta foi misturada com a turfa estéril na proporção 1:1, e permaneceu por dois dias ao abrigo da luz. Este inoculante foi utilizado para misturar com as sementes sendo utilizando 3 g para cada 30 sementes.

Teste de germinação

As sementes foram desinfetadas superficialmente com numa de hipoclorito de sódio (2,5 %), por 15 minutos e depois lavadas dez vezes em água estéril. Foram misturadas 30 sementes com 3 g de cada inoculante e estas transferidas para placas de petri, contendo papel filtro umedecidas com água estéril, sendo todas as manipulações ocorreram sob condições estéreis. Os tratamentos utilizados foram: controle (Controle) sem inoculação tratamento 1 (T1) turfa + *Azospirillum brasilense* AbV5, tratamento 2 (T2) turfa + *Herbaspirillum seropedicae* Smr1; tratamento 3 (T3) turfa + isolado L5. Estas foram mantidas em câmara de germinação, sob luz constante e temperatura ambiente, por 3 dias a 28 °C para germinação. Para as avaliações da germinação as sementes foram avaliadas quanto à porcentagem de germinação seguindo as avaliações padrões determinadas pelo manual de Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). As sementes avaliadas como normais pré-germinadas foram utilizadas nos experimentos posteriores.

Teste de Inoculação *in vitro* em plântulas de arroz

Foram utilizadas 15 sementes, previamente germinadas, como descritas acima, por rolo de germinação, usando papel Germitest®, utilizando o método de folhas sobrepostas –EP segundo a Regra de Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Estes sistemas foram colocadas em câmara de germinação com luz constante a 28 °C por 7 dias. Decorrido o tempo estas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea e da raiz com régua milimetrada e determinado o número de raízes laterais. Depois foram separadas em: parte aérea e raiz, colocadas em sacos de papel e secas em estufa a 65 °C até peso constante e determinada a massa seca em balança analítica.

Análise dos dados

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas com experimentos independentes. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos experimentos foram analisadas pelo teste de médias de Tukey (P<0,05%) o software Sisvar (Ferreira, 2009)

RESULTADOS E DISCUSSÃO - Dentre as variedades avaliadas a menor taxa de germinação foi observada para a variedade maravilha (Tabela 1) e os tratamentos inoculados com as bactérias AbV5 e Smr1, afetaram positivamente a germinação desta. Na variedade Caiapó, foi observado um efeito negativo sendo que todos os tratamentos inoculados apresentaram uma diminuição na taxa de germinação.

Tabela 1 – Taxa de germinação (%) de 5 variedades de arroz não inoculadas (Controle) e inoculadas (T1, T2 e

T3) mantidas em placas de petri com papel de filtro, em câmara de germinação, a 28 °C sob luz constante e temperatura ambiente, por 3 dias.

Variedades	Controle	T1	T2	T3
Curinga	96 (±0)	93(±1,5)	93(±1,1)	97(±0,6)
Canastra	81(±1,1)	84(±1)	84(±2,6)	93(±0,5)
Maravilha	76(±4,3)	88(±1)	89(±1,5)	88(±1)
Caiapó	100(±0)	91(±0,6)	91(±0,6)	96(±1)
Soberana	96(±1)	100(±0)	96(±1,7)	96(±1)

* Controle sem inoculação; tratamento 1 (T1) turfa + *Azospirillum brasilense* AbV5, tratamento 2 (T2) turfa + *Herbaspirillum seropedicae* Smr1; tratamento 3 (T3) turfa + isolado L5. 30 sementes por placa.

Pelos resultados obtidos dos parâmetros avaliados foi observado um aumento na média geral dos tratamentos inoculados quando comparados com o tratamento controle em todas as variedades estudadas. Ainda foi observada uma dependência da variedade utilizada para a resposta à inoculação apresentando uma variação quanto à bactéria utilizada. Considerando as médias gerais para o comprimento de raiz a bactéria *A. brasilense* AbV5 apresentou as melhores respostas com diferenças significativas afetando positivamente o crescimento da raiz nos variedades estudados.

Observando o número de ramificações as variedades Canastra, Soberana e Caiapó não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e o controle (Figura 1). Já para Maravilha os tratamentos com *Azospirillum* e *Herbaspirillum* promoveram aumento no número de ramificações e tratamento com o isolado L5 afetou negativamente este parâmetro. Foi observado para a variedade Curinga um aumento de todos os tratamentos inoculados quando comparados com o controle (Figura 1). O arroz Canastra não foi responsivo aos tratamentos com os inoculantes testados (Figura 2). A maior variação no comprimento da raiz foi obtida para a variedade Soberana onde a inoculação com Smr1 (*H. seropedicae*) promoveu 33% de aumento em relação ao controle (Figura 2). Apesar deste resultado o comprimento da parte aérea não foi afetado para os tratamentos com inoculação, o mesmo sendo observado para Caiapó, Maravilha e Curinga, nesta característica (Figura 2). A resposta a inoculação quanto comprimento da raiz foi negativa para a bactéria *A. brasilense* (AbV5) e positiva para outros inoculantes testados.

As avaliações de massa fresca e seca nas variedades Canastra e Maravilha não houve respostas para a inoculação (Figura 3 e 4). O arroz Curinga foi o mais responsivo a inoculação para estas características sendo que em todos os tratamentos os valores observados foram maiores do que o controle. Na variedade Soberana foram observados efeitos negativos na massa fresca e seca para os tratamentos inoculados. Foi observado um efeito negativo na massa fresca e na massa seca na variedade Caiapó não foi observada diferença na presença dos inoculantes testados.

Alguns tipos de bactérias diazotróficas como as do gênero *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, por exemplo, são capazes de produzir auxinas, citocinas e giberilinas (Dobbelaere; Vanderleyden; Okon, 2003). Estas moléculas podem ser as

responsáveis pelos efeitos positivos observados sobre as raízes das plantas (Tien; Gaskins; Hubbell, 1979). Estes fitohormônios são capazes de influenciar processos fisiológicos nas plantas, sendo eficazes em pequenas concentrações. O mais comum é o ácido indolacético (AIA) responsável por promover respostas rápidas (aumento da elongação) e respostas lentas (divisão e diferenciação celular) (Dobbelaere; Vanderleyden; Okon, 2003).

Ferreira e colaboradores (2003) observaram um aumento na produção de grãos em variedades de arroz em ensaios de campo utilizando inoculante contendo *H. seropedicae* ZAE94. Foi observado um efeito positivo com um aumento de 38% na variedade IR42 e 18% para o arroz IAC4440 em relação ao controle não inoculado. Estudos utilizando 3 variedades de arroz cultivados no Japão indicam que *A. brasilense* B510 afeta positivamente o crescimento e desenvolvimento de plantas com pequenas variações fisiológicas dependendo do cultivar (Isawa et al., 2010). Estes resultados corroboram os resultados obtidos demonstrando que há uma dependência entre o cultivar e a bactéria utilizada.

CONCLUSÕES – As respostas fisiológicas das 5 variedades de arroz estudadas quanto à inoculação foram dependentes do cultivar e das bactérias utilizadas.

- A variedade Curinga foi a mais reponsivas as bactérias testadas

AGRADECIMENTOS – Ao INCT em Fixação Biológica de Nitrogênio, pelo financiamento, e a Embrapa Arroz e Feijão e a Universidade Federal do Paraná pelo fornecimento do material biológico.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009, 399 p.

CONAB. Instrumentos da política. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=42>. Acesso em: 17 abril. 2012

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

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium** (Lavras), 6, 36-41, 2008.

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

ISAWA T, YASUDA M, AWASAKI H, MINAMISAWA K, SHINOZAKI S, NAKASHITA H. *Azospirillum* sp. strain B510 enhances rice growth and yield. **Microbes Environ.** 25, 58-61, 2010.

KROZKY, A.; BERGGOLD, R.; WERNER, D. Analysis of factors limiting associative N₂-fixation (C₂H₂ reduction) with two cultivars of *Sorghum nutans*. **Soil Biol. Biochem.**, 18, 201-207, 1986

SILVA, C. M. M. de S.; FAY, E. F. (Ed.). **Agrotóxicos e ambiente**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 400 p.

SILVEIRA, E. L. da **Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP. Doutor em Microbiologia Agropecuária, Jaboticabal, 2008.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Appl. Environ. Microbiol.**, 37, 1016-1024, 1979.

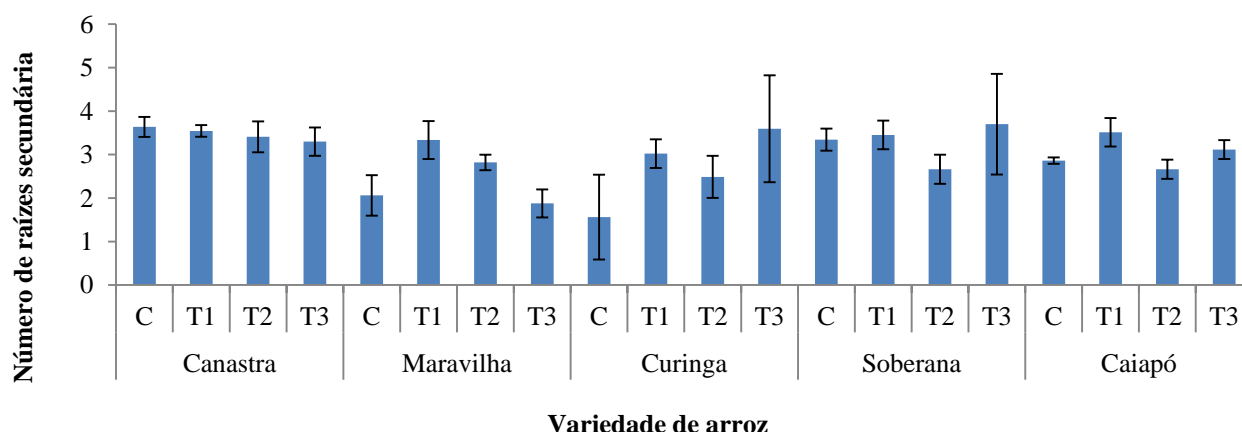
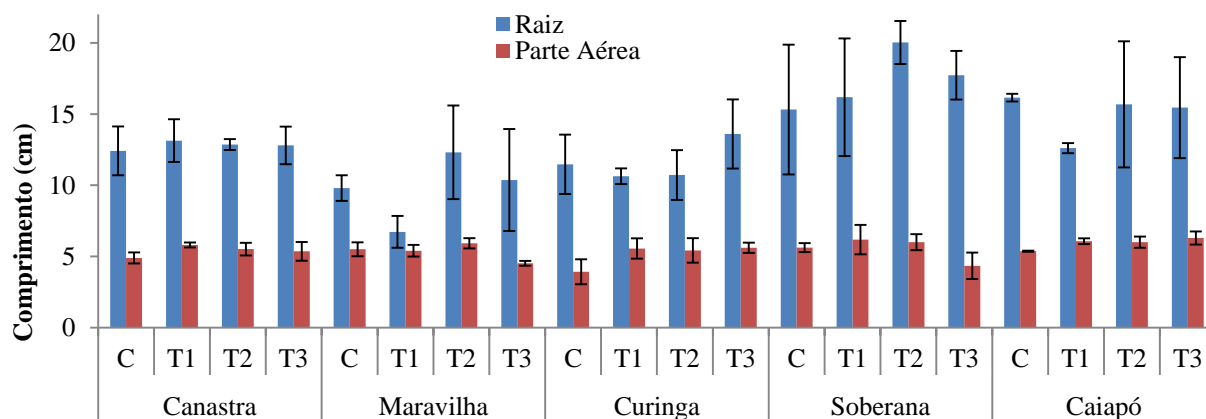
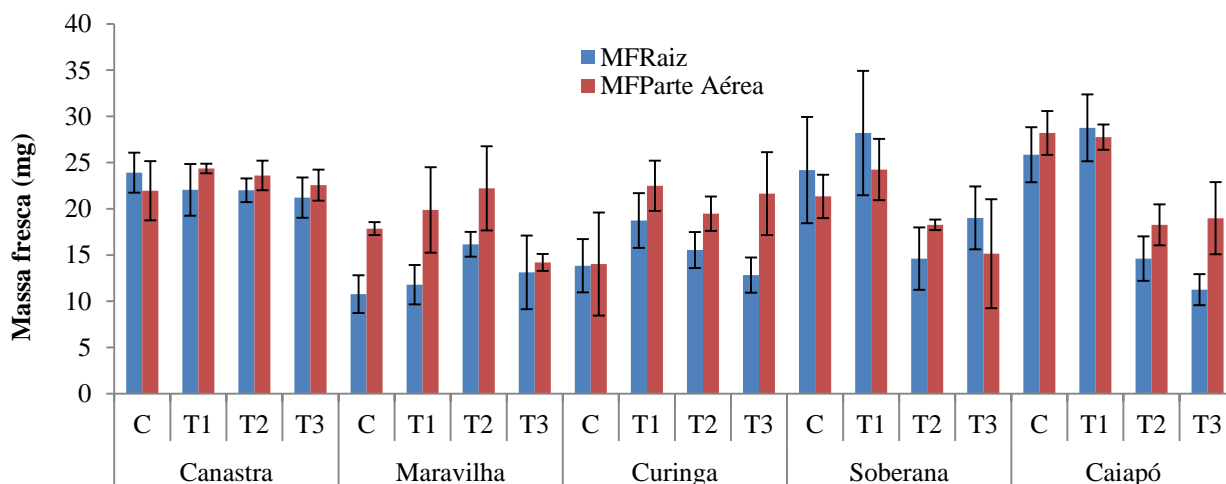


Figura 1 – Número de ramificações em 5 variedades de arroz crescidas por 7 dias em rolo de germinação, sob luz constante a 28 °C, com os tratamentos: controle (Controle) sem inoculação; (T1) turfa + *Azospirillum brasilense* AbV5, (T2) turfa + *Herbaspirillum seropedicae* Smr1; (T3) turfa + isolado L5.



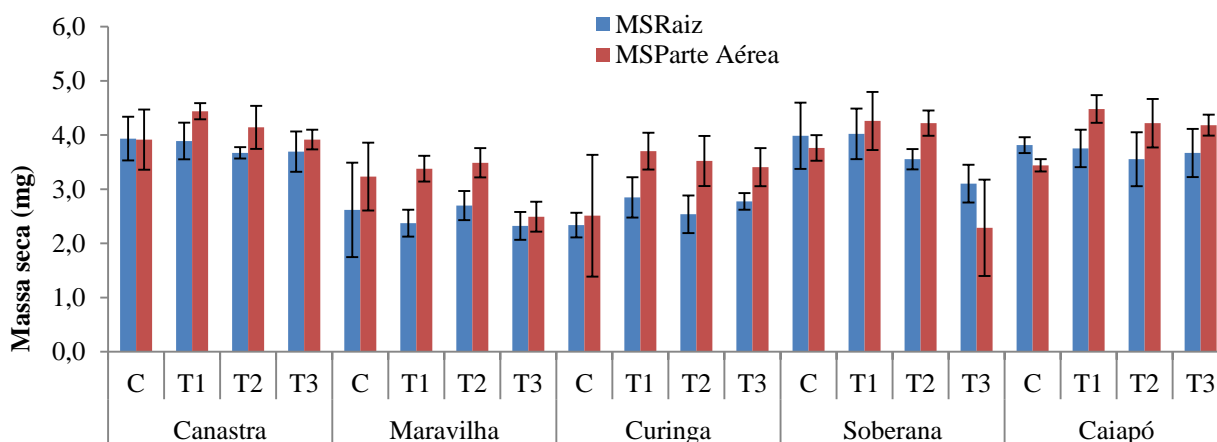
Variedade de arroz

Figura 2 - Avaliação do comprimento de raiz e parte aérea em 5 variedades de arroz crescidas por 7 dias em rolo de germinação, sob luz constante a 28 °C, com os tratamentos: controle (Controle) sem inoculação; (T1) turfa + *Azospirillum brasilense* AbV5, (T2) turfa + *Herbaspirillum seropedicae* Smr1; (T3) turfa + isolado L5.



Variedades de arroz

Figura 3 – Massa fresca da raiz e parte aérea 5 variedades de arroz crescidas por 7 dias em rolo de germinação, sob luz constante a 28 °C, com os tratamentos: controle (Controle) sem inoculação; (T1) turfa + *Azospirillum brasilense* AbV5, (T2) turfa + *Herbaspirillum seropedicae* Smr1; (T3) turfa + isolado L5.



Variedades de arroz

Figura 4 – Massa seca da raiz e parte aérea 5 variedades de arroz crescidas por 7 dias em rolo de germinação, sob luz constante a 28 °C, com os tratamentos: controle (Controle) sem inoculação; (T1) turfa + *Azospirillum brasilense* AbV5, (T2) turfa + *Herbaspirillum seropedicae* Smr1; (T3) turfa + isolado L5.